

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
SUBDIRECCION GENERAL ADJUNTA DE ENSEÑANZA
PROGRAMA DE POSGRADO

EFECTO DE ENMIENDAS SOBRE BACTERIAS ANTAGONICAS A *Alternaria solani* EN TOMATE (*Lycopersicon esculentum* Mill).

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

Magister Scientiae

Por


SHUICHI OKUMOTO

CATIE
Turrialba, Costa Rica
1992

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

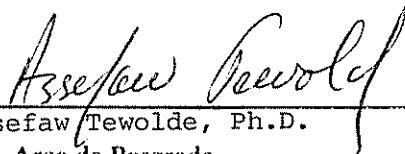
MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:



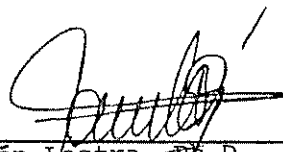
Elkin Bustamante, Ph.D.

Profesor Consejero



Assefaw Tewolde, Ph.D.

Jefe, Area de Posgrado



Ramón Lastra, Ph.D.

Director, Programa de Enseñanza



Shuichi Okumoto

Candidato

DEDICATORIA

A mi esposa: YUKIKO OKUMOTO

A mis padres: KAZUSHIGE OKUMOTO

SHYOKO OKUMOTO

A mi hermano: EIGI OKUMOTO

RECONOCIMIENTO

Este trabajo de tesis hace parte de la investigación desarrollada por el Proyecto MIP de las plagas del suelo en América Central financiado por Natural Resources Institute (NRI) de Gran Bretaña, de acuerdo al Contrato Extra-Mural EMCX-0179 y en colaboración con el proyecto MIP-RENARM del CATIE.

AGRADECIMIENTO

Deseo expresar mi sincero agradecimiento:

Al Proyecto MIP de las plagas del suelo financiado por el Natural Resources Institute (NRI) de Gran Bretaña por el apoyo financiero brindado durante el ejecución del trabajo de tesis.

Al Proyecto MIP-RENARM del CATIE, por la cooperación adicional para la consecución de los objetivos planteados durante la investigación.

Al Dr. Elkin Bustamante, por su excelente labor como profesor consejero, en el trabajo de tesis.

Al Dr. Mario Pareja, por sus orientaciones en el área de fisiología vegetal y en la revisión del manuscrito.

Al Dr. Pedro Ferreira, por sus orientaciones estadísticas y en la revisión del manuscrito.

Al Dra. Gilda Piaggio, por sus orientaciones estadísticas, quien siempre lo hizo de buena voluntad.

Al M.Sc. Philip Shannon, líder del proyecto MIP de las plagas del suelo, por su apoyo incondicional, sin el cual la realización de este tesis no hubiera sido posible.

A los Dr. Franklin Jimenez y Lic. Dagmar Utzings, por sus orientaciones en el área de bacteriología.

A los señores Walter Bermúdez, Arturo Gamboa y Mario Cervantes, por su colaboración y amistad.

Al M.Sc. Julio Marshall, por sus orientaciones y amistad, así como las facilidades en la obtención de materiales provenientes de la finca ganadera.

Al señor Joaquin Salazar, por su valiosa colaboración en el trabajo de tesis, especialmente el procesamiento de quitina.

Al señor Arnoldo Barrantes y al personal de la montaña por sus colaboración y acertadas sugerencias en el trabajo de campo.

A los M.Sc. Fernando Carrera y Jorge Rodríguez, por su apoyo brindado para la redacción del manuscrito y amistad.

A la Lic. Marcela Vitola de Talmana S.A. por las facilidades en la obtención de materiales para la extracción de quitina.

A la Lic. Theresa Jiménez, por su colaboración para la elaboración del resumen en inglés.

A los Dr. Ramiro de la Cruz, M.Sc. Wilberth Phillips, M.Sc. Nelly Vásquez y Señor Manrique González, por la colaboración brindada en todo momento.

A mis compañeros y amigos de la promoción 1990-1992, gracia por su amistad.

A mis amigos y compañeros: William Aréas, Felix Pedro, Juan Adrián, Arnulfo Monzón y Rosa María Méndez gracia por su amistad y momento gratos compartidos.

Al personal de Posgrado especialmente el Dr. Ramón Lastra por su gestión y apoyo.

Al personal de Proyecto Manejo Integrado de Plagas (MIP) por sus atenciones.

A todas aquellas personas que de una u otra forma tuvieron que ver con las realización de este trabajo.

BIOGRAFIA

El autor nació en la ciudad de Kamaishi, Iwate, Japón, el 13 de noviembre de 1965.

En el año 1984 inició sus estudios universitarios en la Facultad de Agronomía, Universidad de Yamaguchi en Japón, obteniendo en el año 1988 el título de Ingeniero Agronomo.

Durante el período de 1988-1990 trabajó como voluntario japonés de la Misión Japonesa (JICA), en el laboratorio de fitopatología del Proyecto Demostrativo Agrícola de la Esperanza, Ministerio de Recursos Naturales en Honduras.

En septiembre de 1990, ingresó al Programa de Posgrado del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) en Turrialba, Costa Rica. Realizó su trabajo de tesis con el Proyecto de Manejo Integrado de Plagas (MIP) y se graduó de *Magister Scientiae* en Septiembre de 1992.

Sus estudios de maestría fueron financiados parcialmente por el Proyecto MIP de las plagas del suelo, patrocinado por Natural Resources Institute (NRI) de Gran Bretaña, y el apoyo del CATIE.

INDICE

RESUMEN.....	xi
SUMMARY.....	xiii
LISTA DE CUADROS.....	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xviii
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	3
2.1. La enfermedad.....	3
2.1.1. Importancia económica.....	3
2.1.2. Sintomatología.....	4
2.2. Forma y característica del organismo causal.....	4
2.3. Epidemiología.....	5
2.4. Medidas de combate.....	6
2.5. Microorganismos epífitos en relación con las enfermedades.....	8
2.6. Efecto de agroquímicos sobre la microbiología de la superficie aérea de las plantas.....	8
2.6.1. Efecto de fungicidas.....	8
2.6.2. Efecto de insecticidas y nematicidas.....	10
2.6.3. Efecto de herbicidas.....	10
2.7. Enmiendas foliares en control biológico.....	11
2.7.1. Uso de quitina.....	11
2.7.2. Uso de leche.....	13
2.8. Control biológico de fitopatógenos con bacterias antagónicas.....	14
2.8.1. Estudios sobre <i>Bacillus</i> spp.....	14
2.8.2. Estudios sobre <i>Pseudomonas</i> spp.....	16
2.9. Control Integrado.....	17
3. MATERIALES Y METODOS.....	20
3.1. Localización.....	20
3.2. Material y metodología utilizada en campo y laboratorio.....	22
3.2.1. Efecto de enmiendas sobre la enfermedad en el campo: Ensayo 1.....	22

3.2.1.1.	Material experimental usado en campo.....	22
3.2.1.2.	Tratamientos.....	23
3.2.1.3.	Descripción de la unidad experimental.....	23
3.2.1.4.	Diseño experimental.....	24
3.2.1.5.	Procedimiento experimental.....	24
3.2.1.6.	Variables evaluadas y análisis estadístico.....	25
3.2.1.6.1.	Estimación de la enfermedad.....	25
3.2.1.6.2.	Evaluación de rendimiento.....	27
3.2.1.6.3.	Análisis económico.....	28
3.2.1.7.	Manejo del experimento.....	28
3.2.1.7.1.	Semillero.....	28
3.2.1.7.2.	Preparación de suelo.....	28
3.2.1.7.3.	Trasplante.....	29
3.2.1.7.4.	Fertilización.....	29
3.2.1.7.5.	Control de malezas.....	29
3.2.1.7.6.	Control de insectos.....	30
3.2.1.7.7.	Control de enfermedades.....	30
3.2.2.	Efecto de enmiendas sobre la población de bacterias, <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes y <i>Bacillus</i> spp. en las superficies foliares: Ensayo 2.....	31
3.2.2.1.	Procedimiento experimental.....	31
3.2.2.2.	Análisis estadístico.....	32
3.2.3.	Selección in vitro de bacterias antagónicas a <i>A. solani</i> : Ensayo 3.....	34
3.2.3.1.	Tratamientos.....	34
3.2.3.2.	Procedimiento experimental.....	35
3.2.3.2.1.	Aislamiento de la bacteria.....	35
3.2.3.2.2.	Preparación de suspensión bacteriana y conidial.....	36
3.2.3.2.3.	Instalación de experimento.....	37
3.2.3.3.	Variables evaluadas y análisis estadístico.....	37
3.2.4.	Estudio de procedimientos para el aislamiento y detección de <i>Bacillus</i> sp.: Ensayo 4.....	39
3.2.4.1.	Tratamientos.....	39
3.2.4.2.	Procedimiento experimental.....	40
3.2.4.3.	Análisis estadístico.....	41
4.	RESULTADOS.....	42
4.1.	Efecto de enmiendas sobre la enfermedad en el campo.....	42
4.1.1.	Efecto de los tratamientos sobre el tizón temprano.....	42
4.1.2.	Evaluación del rendimiento.....	47
4.1.3.	Evaluación económica.....	52
4.2.	Evaluación de la población de bacterias, <i>Bacillus</i> spp. y <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes.....	53
4.3.	Selección in vitro de bacterias antagónicas a <i>A. solani</i>	59

4.4. Estudio de procedimiento para el aislamiento y detección de <i>Bacillus</i> spp.....	73
5. DISCUSION GENERAL.....	75
5.1. Efecto de los tratamientos sobre la enfermedad y la población de bacterias.....	75
5.2. Rendimientos y evaluación económica.....	78
5.3. Selección <i>in vitro</i> de bacterias antagónicas a <i>A.</i> <i>solani</i>	79
5.4. Estudio de procedimientos para el aislamiento y detección de <i>Bacillus</i> spp.....	83
6. CONCLUSIONES.....	85
7. BIBLIOGRAFIA.....	88
8. ANEXOS.....	96

OKUMOTO, S. 1992. Efecto de enmiendas sobre bacterias antagónicas a *Alternaria solani* en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill).

Palabras claves: tomate, *Alternaria solani*, control biológico, quitina, leche, *Bacillus* spp. *Pseudomonas* spp. fluorescentes.

RESUMEN

El tizón temprano del tomate causado, por *Alternaria solani* es una de las enfermedades críticas en producción de tomate. En la actualidad, los fungicidas usados no son tan efectivos para controlar la enfermedad y existe también la posibilidad de que algunos sean retirados por la agencia para protección ambiental (EPA) en Los Estados Unidos.

En el año 1991, el efecto de enmiendas foliares, especialmente la quitina y la celulosa sobre la modificación de la ecología microbial y el control de la enfermedad fue reportado.

Los objetivos del presente trabajo fueron: a) Evaluar el efecto de enmiendas sobre el desarrollo de la enfermedad en el campo. b) Estudiar el incremento de la población bacteriana con la aplicación de enmiendas en las hojas de tomate. c) Evaluar el efecto de bacterias antagónicas sobre el desarrollo del hongo *in vitro*. d) Evaluar un procedimiento alternativo para mejorar la detección de *Bacillus* spp..

La investigación se realizó en el laboratorio de Fitopatología y en la Estación Experimental 'La montaña' del CATIE, Turrialba, Costa Rica.

En el experimento de campo, se utilizó el cultivar de tomate 'Dina', moderadamente susceptible a este patógeno. Los tratamientos usados fueron 8 en total, correspondientes a los tres factores (quitina, leche y fungicida) con dos niveles (aplicar o no aplicar). El diseño experimental utilizado fue de bloques completos al azar con tres repeticiones.

De acuerdo a los resultados obtenidos, la aplicación de quitina sola y leche sola no mostró efecto significativo con respecto a la severidad de la enfermedad y el rendimiento de frutos de tomate.

Se observó fitotoxicidad en las plantas asperjadas en la combinación de quitina con fungicida solo y con leche. La aplicación de quitina más fungicida también causó una disminución significativa en el rendimiento de frutos de tomate y afectó al ambiente microbial con una disminución en la población bacteriana.

Durante el período experimental de campo, los cambios en la población de bacterias, *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. fluorescentes no se debieron a la aplicación de las enmiendas, sino al tiempo de muestreo.

En el experimento de laboratorio, las cepas de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. fluorescentes previamente aisladas del campo fueron probadas por su antagonismo a *A. solani*. Varias de ellas lo mostraron al disminuir el crecimiento de tubos germinativos del hongo. Las cepas antagónicas redujeron simultáneamente el crecimiento de tubos germinativos y número de ramificaciones de éstos. Sin embargo, no disminuyeron el número de tubos germinativos. Las cepas evaluadas de *Bacillus* spp. fueron más antagónicas y numerosas que las de *Pseudomonas* spp. fluorescentes. Algunas de las cepas de *Pseudomonas* spp. fluorescentes estimularon el crecimiento de tubos germinativos.

Algunas de las cepas antagónicas presentan la característica de producción de quitinasa, la cual puede degradar la pared celular del hongo. La mayoría de las cepas quitinolíticas se aislaron del tratamiento de campo de quitina sola o combinada con otros productos.

El procedimiento a 80 °C fue el más específico para la detección de *Bacillus* spp..

OKUMOTO, S. 1992. Effect of amendment on antagonistic bacteria to *Alternaria solani* in the tomato crop (*Lycopersicon esculentum* Mill).

Key words: tomato, *Alternaria solani*, biocontrol, chitin, milk, *Bacillus* spp., fluorescent *Pseudomonas* spp..

SUMMARY

The early blight of the tomato crop caused by *Alternaria solani* is one of the critical diseases which affects tomatoes production. Fungicides are not very effective to control the disease and there is also the possibility that they may be banned by the U.S. Environmental Protection Agency (EPA) at the present time.

In 1991, the effect of foliar amendments, especially chitin and cellulose, on the modification of the microbial ecology and disease control was reported.

The objectives of the present study were: a) to evaluate the effect of amendments on development of the disease in the field; b) to study the variation of the bacterial population; c) to evaluate the effect of antagonistic bacteria on fungi growth *in vitro*; d) to evaluate a procedure to improve *Bacillus* spp. detection.

This investigation was carried out at CATIE's laboratory and La Montaña Experimental Station in Turrialba, Costa Rica.

The tomato cultivar moderately susceptible to early blight 'Dina', was utilized in the field experiment. Eight experimental treatments corresponding to the three factors (chitin, milk and fungicide) were used with the two levels (apply or not apply). The experimental design used was that of completely random blocks with three repetitions.

According to the results obtained, chitin or milk application did not show any significant effect with respect to disease severity and tomato yield.

Phytotoxicity was observed on the plants sprayed with the combination of chitin with fungicide alone and with milk. The chitin plus fungicide application caused a significant decrease in the tomato fruit yield and affected the microbial environment with a decrease in the bacterial population.

The changing population of total bacteria, *Bacillus* spp. and fluorescent *Pseudomonas* spp. was not due to the amendment application, but to the sampling time during the field experimental periods.

In the laboratory experiment, *Bacillus* spp. and fluorescent *Pseudomonas* spp. isolates previously collected from the field were tested for their antagonism to *A. solani*. Various of these showed antagonism when the fungus's germ-tubes growth was decreased. Antagonistic isolates simultaneously reduced the growth of germ-tubes and number of

their ramifications. However, they did not reduce the number of germ-tubes. The *Bacillus* spp. isolates evaluated were more antagonistic and numerous than those of the fluorescent *Pseudomonas* spp.. Some of the fluorescent *Pseudomonas* spp. isolates stimulated the growth of germ-tubes.

Some of the antagonistic isolates presented the characteristic of chitinase production, which can degrade the fungi cell wall. The majority of the chitinolytic isolates were collected from the field treatment, with chitin alone or combined with other products.

The procedure at 80 °C was the most specific for *Bacillus* spp. detection.

LISTA DE CUADROS

En el texto	Página
Cuadro 1. Datos climáticos de marzo a julio, 1992. Estación Experimental La Montaña, CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	21
Cuadro 2. Estructura de los tratamientos en el Ensayo 4...	40
Cuadro 3. Efecto de los tratamientos sobre la severidad de <i>A. solani</i> , en los diferentes parámetros. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	45
Cuadro 4. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos, con la tasa de infección aparente (r). CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	45
Cuadro 5. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos con respecto al área debajo de la curva de progreso de la enfermedad (ACPE). CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	46
Cuadro 6. Rendimiento total y porcentaje de frutos dañados por tratamiento de acuerdo a la calidad. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	47
Cuadro 7. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos en la clase 1. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	49
Cuadro 8. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos en la clase 2. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	50
Cuadro 9. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos en la clase 3. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	50
Cuadro 10. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos en rendimiento total. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	51
Cuadro 11. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos en el porcentaje de frutos dañados en la producción total. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	51
Cuadro 12. Análisis de presupuesto parcial de tratamientos aplicados en el experimento de campo. CATIE, Turriaba, Costa Rica. 1992.....	52

Cuadro 13.	Análisis de varianza para la población bacteriana, respecto a la aplicación de los tratamientos. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	55
Cuadro 14.	Mejores cepas de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes antagónicas a <i>A. solani</i> , de acuerdo a su tratamiento de origen y el porcentaje de inhibición de la longitud del tubo germinativo. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	71
Cuadro 15.	Mejores cepas de <i>Bacillus</i> spp. antagónicas a <i>A. solani</i> , de acuerdo a su tratamiento de origen y el porcentaje de inhibición de la longitud del tubo germinativo. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	71
Cuadro 16.	Respuesta a la producción de quitinasa de capas bacteriales antagónicas de acuerdo a su tratamiento de origen y a la formación de zonas transparentes en el medio agar nutriente+ quitina. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992....	72
Cuadro 17.	Aislamiento de <i>Bacillus</i> spp. por el efecto de los procedimientos. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	73
Cuadro 18.	Análisis de varianza del efecto de los diferentes procedimientos. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	74
Cuadro 19.	Efecto de los medios para aislar <i>Bacillus</i> spp.. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	74
 En el anexo		
Anexo 1.	Metodología para obtener quitina a partir de caparazones de camarones.....	97
Anexo 2.	Análisis del suelo del área del experimento de campo. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	99
Anexo 3.	Análisis de varianza para los inóculos iniciales por tratamiento, estimados mediante el modelo logístico. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992....	99
Anexo 4.	Precios de venta de tomate al mayor en El Centro Nacional de Abastecimiento y Distribución de Alimentos (CENADA). Costa Rica. 1992.....	100
Anexo 5.	Análisis de varianza para la población de <i>Bacillus</i> spp., respecto a la aplicación de los tratamientos. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	101

Anexo 6.	Análisis de varianza para la población de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes, respecto a la aplicación de los tratamientos. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	102
Anexo 7.	Efecto de inhibición o estímulo del crecimiento de <i>A. solani</i> , debido a las 33 cepas de bacterias aisladas el 9 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	103
Anexo 8.	Efecto de inhibición o estímulo del crecimiento de <i>A. solani</i> , debido a las 60 cepas de bacterias aisladas el 17 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	104
Anexo 9.	Efecto de inhibición o estímulo del crecimiento de <i>A. solani</i> , debido a las 16 cepas aisladas el 24 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica.....	106
Anexo 10.	La correlación entre el número de tubos germinativos, longitud de tubo germinativo más largo y número de ramificaciones de esto, en la presencia de las diferentes cepas de <i>Bacillus</i> spp., aisladas el 9 (a), 17 (b) y 24 (c) de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	107
Anexo 11.	La correlación entre el número de tubos germinativos, longitud de tubo germinativo más largo y número de ramificaciones de esto, en la presencia de las diferentes cepas de <i>Pseudomonas</i> spp. fluorescentes, aisladas el 9 (a), 17 (b) y 24 (c) de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	108
Anexo 12.	Porcentaje de inhibición sobre la longitud de tubo germinativo debido a las cepas aisladas el 9 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	109
Anexo 13.	Porcentaje de inhibición sobre la longitud de tubo germinativo debido a las cepas aisladas el 17 de enero de 1992. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1992.....	110
Anexo 14.	Porcentaje de inhibición sobre la longitud de tubo germinativo debido a las cepas aisladas el 24 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	112
Anexo 15.	Producción de quitinasa, de acuerdo a la transparencia del medio ANQ, de algunas cepas antagonicas estudiadas. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....	113

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Efecto de los tratamientos sobre el desarrollo de la enfermedad. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....43
- Figura 2. Efecto de los tratamientos, respecto a la tasa de infección aparente (r). CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....44
- Figura 3. Rendimiento total por tratamiento en el experimento de campo. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....48
- Figura 4. Población de bacterias por tratamiento en el experimento de campo. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....54
- Figura 5. Interacción entre quitina y fungicida en la población bacteriana. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....56
- Figura 6. Variación de las condiciones climáticas (radiación solar, horas de sol, precipitación, horas de humedad relativa mínima y promedio) y población de bacterias, *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. fluorescentes durante el período del ciclo de cultivo del tomate. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....58
- Figura 7. Inhibición del crecimiento de los tubos germinativos del hongo, debido a las cepas bacteriales (Testigo: 185.6 micras), aisladas el 9 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....60
- Figura 8. Inhibición del crecimiento de los tubos germinativos del hongo, debido a las cepas bacteriales (Testigo: 130.5 micras), aisladas el 17 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....61
- Figura 9. Inhibición o estímulo del crecimiento de los tubos germinativos del hongo, debido a las cepas bacteriales (Testigo: 97.0 micras), aisladas el 24 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....62
- Figura 10. Inhibición o estímulo del número de ramificaciones en el tubo germinativo más largo del hongo, debido a las cepas bacteriales (Testigo: 5.0 ramif.), aisladas el 9 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....63

- Figura 11. Inhibición o estímulo del número de ramificaciones en el tubo germinativo más largo del hongo, debido a las cepas bacteriales (Testigo: 5.9 ramif.), aisladas el 17 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992...64
- Figura 12. Inhibición o estímulo del número de ramificaciones en el tubo germinativo más largo del hongo, debido a las cepas bacteriales (Testigo: 4.2 ramif.), aisladas el 24 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992....65
- Figura 13. Número de tubos germinativos producidos por el hongo, debido a las cepas bacteriales (Testigo: 3.6 tubos), aisladas el 9 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....66
- Figura 14. Número de tubos germinativos producidos por el hongo, debido a las cepas bacteriales (Testigo: 4.9 tubos), aisladas el 17 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....67
- Figura 15. Número de tubos germinativos producidos por el hongo, debido a las cepas bacteriales (Testigo: 3.1 tubos), aisladas el 24 de enero de 1992. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1992.....68
- Figura 16. Correlación entre la longitud de tubo germinativo más largo y número de ramificaciones en el tubo germinativo del hongo, debido al género de bacterias aisladas el 9 (a), 17 (b) y 24 (c) de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.....70

1. INTRODUCCION

El tomate es originario de la zona Andina (Perú, Bolivia, Ecuador), aunque la zona de domesticación fue el sur de México y norte de Guatemala, donde existe el mayor grado de diferenciación varietal de la planta. Los nativos lo cultivaban antes que llegaran los conquistadores a América. Sin embargo, es sólo a partir del siglo XIX cuando adquiere gran importancia económica a nivel mundial, hasta llegar a ser, junto con la papa, la hortaliza más difundida y predominante en el mundo (CATIE, 1990).

Hoy en día, el tomate es conocido como una de las hortalizas más importantes por su popularidad, su amplia adaptación y por constituir una fuente de ingresos en el comercio de productos comestibles frescos e industrializados, además tiene un alto valor nutritivo. Dicha planta es succulenta y carnosa, lo cual la hace hospedera de diversos patógenos, como el hongo *Alternaria solani*, que es causante de la enfermedad conocida como "tizón temprano". La pérdida de producción del tomate por dicha enfermedad es uno de los problemas más serios con que se enfrenta el productor en diferentes países.

Las medidas de control más comunmente utilizadas contra esta enfermedad se han basado en el uso exclusivo de fungicidas. En muchas ocasiones esta medida llega a ser inefectiva, por lo que es necesario un mayor número de aplicaciones para poder contrarrestar la enfermedad, lo cual

incrementa los costos de producción, y puede hacer el cultivo no rentable.

En el año 1991, el efecto de enmiendas foliares, especialmente la quitina, la celulosa, y otras, sobre la modificación de la ecología microbial y el control de la enfermedad fue reportado por varios fitopatólogos, y su efecto exitoso para el manejo de la enfermedad ha recibido considerable atención.

Es importante por consiguiente tratar de encontrar si en las condiciones del trópico húmedo existe alguna relación entre las enmiendas y la severidad de enfermedades de importancia económica, como el tizón temprano en el tomate con el fin de buscar alternativas de control que disminuyan el número de aplicaciones de fungicidas, obteniéndose con ello un impacto favorable económico y ambiental.

Por este motivo, se proyectó un estudio a nivel de laboratorio y campo en el CATIE, Turrialba, Costa Rica, con los siguientes objetivos específicos:

- 1). Evaluar el efecto de enmiendas sobre el desarrollo de la enfermedad en el campo y sus costos.
- 2). Estudiar la variación de la población bacteriana con la aplicación de enmiendas en las hojas de tomate.
- 3). Evaluar el efecto de bacterias antagónicas sobre el desarrollo del hongo *in vitro*.
- 4). Evaluar un procedimiento para mejorar la detección de *Bacillus spp.*

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. La enfermedad

2.1.1. Importancia económica

La producción de tomate en Centroamérica es destinada principalmente para consumo fresco. En los últimos años, el uso del tomate en la industria ha aumentado considerablemente, produciendo un incremento en el área de siembra. La mayor parte de los 21,000 ha cultivadas se siembra en Guatemala (9,600 ha) y Honduras (3,500 ha), representando el 62 % del total del área sembrada en Centroamérica (CATIE, 1990).

Una de las fuentes de riesgo más importantes para el productor son las plagas insectiles y las enfermedades, que pueden ocasionar pérdidas en el rendimiento y calidad del producto, reduciendo los ingresos del agricultor (CATIE, 1990).

A. solani causa daño en todos los países de Centroamérica, provocando pérdidas de un 15 % de la producción total; sin embargo, en algunos casos puede ser de hasta el 50 %. En Costa Rica, la enfermedad se encuentra generalizada en la meseta central occidental, central oriental, pacífico sur y la región central del país, y es considerada de importancia fitopatológica (CATIE, 1986).

Respecto a problemas patológicos, se reportan para Costa Rica pérdidas de un 10-15 % debido a enfermedades del frutos, entre ellas *Alternaria* (CATIE, 1990).

2.1.2. Sintomatología

El tizón temprano (*Alternaria solani*) afecta principalmente a las hojas, tallos, flores y frutos (Agrios, 1986). Por lo general, la afección foliar aparece en forma de manchas irregulares constituidas por anillos concéntricos (CATIE, 1990). Los primeros síntomas aparecen como pequeñas manchas, las que se desarrollan rápidamente (Alas, 1989).

Los frutos de tomate presentan en el cáliz manchas con anillos concéntricos. Los frutos infectados pueden caer al suelo, lo que disminuye sensiblemente la calidad y cantidad de la cosecha (Léon y Arosemena, 1980).

2.2. Forma y características del organismo causal

El tizón temprano del tomate, causado por el hongo *A. solani* (Ellis et Martin) Sorauer, pertenece al orden Moniliales y a la clase Deuteromicetes (hongos imperfectos), por lo que carecen de estructura de reproducción sexual. *A. solani* tiene el micelio de color obscuro y en los tejidos viejos infectados produce conidióforos cortos, simples y erectos que portan cadenas simples o ramificadas de conidias (Agrios, 1986).

Los conidióforos son cilíndricos, erectos y tabicados, o en forma de raqueta de tenis (Lucas et al, 1985), miden entre 50 y 90 micras de largo por 8 a 9 micras de ancho (Sherf y Macnab, 1986).

Los conidios están en cadenas, su color es pardo claro o pardo oscuro (Gonzales, 1981), y son grandes, alargados y

oscuros, o bien multiselulares y en forma de pera y presentan septas tanto transversales como longitudinales (Agrios, 1986). En su parte terminal son prolongados en un apéndice delgado y hialino, tan largo como el resto del cuerpo y también son tabicados o muriformes (Gonzales, 1981), miden de 145 a 370 micras de largo por 16 a 18 micras de ancho (Alas, 1989).

2.3. Epidemiología

Los conidios germinan en una o dos horas a temperaturas entre 6 y 34 °C, y en 35 a 45 minutos a la temperatura óptima de 28 a 30 °C. La temperatura mínima para cultivo puro va de 1 a 2 °C con un óptimo de 26 a 28 °C y un máximo de 37 a 45 °C.

El hongo penetra en los tejidos de la hoja y del tallo directamente a través de la epidermis. En condiciones favorables de temperatura y humedad, las manchas son visibles al cabo de dos o tres días, y pueden aparecer esporas dentro de los tres o cuatro días siguientes. La producción de esporas se inicia por lo general cuando las manchas foliares tienen un diámetro aproximado de 3 mm. El rocío fuerte, unido a lluvia frecuente, son esenciales para una esporulación abundante (Walker y Azpeitia, 1965).

Las esporas que producen las plantas infectadas se diseminan por el aire, lluvia, implementos agrícolas y por el hombre al realizar labores de cultivo (Léon y Arosemena, 1980).

La radiación solar en general, y en particular su porción de luz ultravioleta, es el mayor factor de mortalidad para el patógeno (Rotem et al, 1985).

La necrosis del follaje y la podredumbre en el cuello son más agudas a temperaturas bajas, decreciendo progresivamente desde los 13 a 28 °C, a menos que la cantidad inóculo sea muy grande, en cuyo caso la gravedad de la necrosis foliar es tan importante a los 13 como a los 25 °C (Walker y Azpeitia, 1965).

El hongo produce ácido alternárico que es la toxina causante de los efectos patológicos en el hospedero (Léon, 1982; Pound y Stahmann, 1951).

Las plantas jóvenes de tomate presentan un alto grado de resistencia a tizón temprano, la cual disminuye con la madurez de la planta. Por lo tanto las hojas bajas son las más susceptibles durante todo el ciclo (Bedi y Dhiman, 1980).

2.4. Medidas de combate

Generalmente los agricultores utilizan en mayor medida los productos químicos (fungicidas) . Entre los más usados están: clorotalonil, maneb, captafol y una mezcla de maneb y zinc. Las aspersiones se inician tan pronto como las plántulas emergen o han sido trasplantadas y se repiten a intervalos de 1 a 2 semanas dependiendo de la prevalencia de la enfermedad y de la cantidad y frecuencia de las lluvias (Agrios, 1986).

Otra medida importante es el uso de variedades resistentes. Aunque se ha encontrado que ésta sólo es factible de obtener para la fase de podredumbre basal del fruto (Kranz, 1982). En la actualidad, a nivel comercial no existen cultivares tolerantes o resistentes para condiciones de Costa Rica (Alas, 1989), no obstante en evaluaciones realizadas por el Proyecto MIP-CATIE, se ha encontrado resistencia intermedia en las líneas 14667 y 117-21 (Jiménez et al, 1988). También se reporta que las variedades Floradel, Manalucie e Inmokalee son moderadamente tolerantes a esta enfermedad (Léon, 1982).

Se ha estudiado el efecto de la nutrición en la defensa de las plantas contra *A. solani*. El Proyecto MIP-CATIE ha encontrado que la aplicación de 1,0 a 2,5 toneladas de cal por ha es aconsejable para reducir la enfermedad e incrementar la producción del cultivo (CATIE, 1990). Con una alta y adecuada fertilidad en los suelos, se reduce la severidad del tizón temprano causada por *A. solani* (Chase y Poole, 1986). Las plantas con un nivel adecuado de N, P, K presentan tolerancia a la enfermedad, pero al adicionar calcio la tolerancia es mayor y los rendimientos se incrementan (Alas, 1989).

2.5. Microorganismos epífitos en relación con las enfermedades

El mayor número de microorganismos sobre plantas son bacterias, siguiendo en orden, levaduras y actinomicetes (Etchells et al, 1961; Hislop y Cox, 1969).

Se ha encontrado que la aplicación de alcohol etílico 70 % en hojas de tabaco reduce la microflora de bacterias y hongos residentes en un 91 y 100 %, respectivamente y además aumenta la enfermedad causada por *A. alternata* (Spurr, 1979).

2.6. Efecto de agroquímicos sobre la microbiología de superficie aérea de las plantas

Los agroquímicos utilizados en el control de plagas pueden reducir las poblaciones de microorganismos en el filoplano (Andrews y Kenerley, 1978; Hislop, 1976).

Por lo tanto, un programa de control integrado de enfermedades debe considerar el espectro de acción del fungicida o bactericida para que pueda ser útil y compatible con otros factores de manejo (Blakeman y Fokkema, 1982).

2.6.1. Efecto de fungicidas

Las fungicidas de amplio espectro tales como el captan y los ditiocarbamatos inhiben fuertemente el crecimiento de hongos saprófitos, sin embargo, las bacterias por lo general no son afectadas (Fokkema, 1981).

Se ha observado que los fungicidas a base de cobre usados para el control de *Clasterosporium corpophilum* en Australia pueden causar la intensificación de la enfermedad debido a la disminución de las poblaciones de antagonistas superficiales (Carte, 1971).

Por el contrario tridemorf tuvo un efecto relativamente específico y menor sobre la población no objetivo, a diferencia del zineb y benomil los cuales inhiben muchas levaduras y hongos filamentosos (Dickinson y Wallance, 1976). Dichlone, ferbam y thiram dieron buena protección contra *Botritis cinerea*, pero al compararse con las plantas de testigos, reducen las poblaciones de los hongos saprófitos, lo cual disminuye el control natural de este hongo (Newhook, 1975).

Hill y Lacey (1974; citado por Hislop, 1976) reportan que el captafol al compararse con benomil y tridemorf redujo considerablemente la microflora en cereales.

El espectro fungitóxico de los fungicidas sistémicos benzimidazoles tales como benomil y tiabendazol han demostrado efectos similares, controlando patógenos tan importantes como *Alternaria*, *Drechslera*, *Curvularia* y *Stemphylium*, y además ciertas levaduras saprófitos comunes en las plantas (Edgington y Barron, 1971).

Los patógenos como *Phoma*, *Drechslera*, y *Alternaria*, los cuales son susceptibles a benomil, pueden ser antagonizados por saprófitos comunes (Warren, 1972; Pace y Campbell, 1974; Fokkema, 1973).

Por el contrario, el ethirimol y dimethirimol dado sus características se aproximan a fungicidas ideales, ya que son extremadamente efectivos contra patógenos causantes de los mildiu y no afectan al resto de saprófitos y parásitos (Dickinson, 1973).

2.6.2. Efecto de insecticidas y nematicidas

El efecto de insecticidas y nematicidas sobre la microflora de las plantas ha recibido poca atención ,por lo cual se requiere más investigación para explicar el impacto directo e indirecto sobre la epiflora.

Schumean y Thurston (1976) demostraron que *Phytophthora infestans* causó pocas lesiones cuando el follaje de la papa se asperjó con malathion o resmethrina. Además se ha observado que heptachloro disminuye la flora fungosa del suelo y aumenta la flora bacterial (Shamiyeh y Johnson, 1973).

Minton et al (1977) reporta que al tratar el follaje de soya con el nematicida oxamyl, se incrementa la incidencia de mildiu .

2.6.3. Efecto de herbicidas

Mullins (1975; citado por Andrews, 1981) reporta que cuando las hojas de maíz son tratadas con dalapon, la flora bacteriana se reduce significativamente y ocurren alteraciones cualitativas sobre la hoja de maíz .

Algunos herbicidas pueden reducir la severidad de las enfermedades. Se ha encontrado que la infestación de trigo por el mildiu es modificada por la acción de herbicidas derivados de la urea y por uno derivado de las triazinas (Ibenthal y Heitefess, 1979.; citado por Andrews, 1981).

2.7. Enmiendas foliares en control biológico

2.7.1. Uso de quitina

El uso de enmiendas como agente para modificar la ecología microbial se ha investigado para el manejo de hongos fitopatógenos del suelo en los últimos años.

Mitchell y Alexander (1961) reportaron que la adición de quitina al suelo infestado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* estimuló a bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas*, las cuales controlaron al patógeno debido a la digestión de las paredes del hongo, que también contienen quitina.

Algunos organismos aparentemente afectan a los hongos debido a la digestión de la quitina en la pared de hifas (Mitchell y Alexander, 1962).

La población de microorganismos que descompone la pared celular de las hifas de *Fusarium spp.* se incrementa con la adición de quitina al suelo. Los microorganismos que producen lisis y antibióticos pueden ser estimulados por enmiendas como quitina. Algunos microorganismos que producen quitinasa son capaces de descomponer a hongos susceptibles (Mitchell, 1963).

Maurer y Baker (1964, 1965) sugieren que el control de patógenos , por las enmiendas al suelo implica competencia por nutrientes. Estos autores demostraron que en la pudrición de la raíz de frijol, causada por *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*, la severidad de la enfermedad disminuyó en el suelo enmendado con quitina y lignina.

Recientemente, algunos fitopatólogos han estudiado el efecto de enmiendas al follaje sobre la modificación de la ecología microbial y del control de enfermedades.

Kokalis-Burelle et al (1991) reportan que al aplicar una suspensión amorfa de quitina al follaje de cacahuate ocurre un cambio altamente significativo en la población de microorganismos epífitos, incrementándose los quitinolíticos de menos del 1 % hasta más del 40 % en la población total de microorganismos. La aplicación de una cepa quitinolítica de *Bacillus cereus* más quitina al follaje de cacahuate, produjo un 60 % de reducción de manchas foliares causada por *Cercospora arachidicola*. Según observaciones bajo el microscopio electrónico, se encontró que la quitina depositada funciona como una barrera física contra la germinación de las esporas y la penetración del tubo germinativo.

Evaluaciones en hojas y frutos de tomate, papa y manzana indican un cambio significativo en la población microbial como resultado de enmiendas tales como polímeros de quitina insoluble, quitosan y celulosa, etc. El tizón temprano (*A.*

solani) de tomate y papa es reducido con la aplicación de estos productos (Ploper y Backman, 1991).

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

2.7.2. Uso de leche

La leche es usada para control de enfermedades, por algunos agricultores costarricenses, sin embargo, se desconoce el mecanismo de acción. En El Salvador la aplican para evitar la infección de virus transmitidos por vectores.

Las bacterias que forman esporas, principalmente *Bacillus subtilis* y *B. cereus*, siempre están presentes en leche cruda, aunque por lo general, en número reducido (Foster et al, 1965). Estas bacterias están recibiendo últimamente atención como agentes antagónicos a fitopatógenos con la ventaja de ser capaces de descomponer la caseína, uno de los componentes principales de la leche (Gordon et al, 1973).

2.8. Control biológico de fitopatógenos con bacterias antagónicas

El control biológico puede ser inducido directamente mediante la inoculación en masa del antagonista, o indirectamente por cambios en las condiciones prevalentes sobre el ambiente de la planta y del equilibrio microbial del ecosistema (Henis y Chet, 1975).

Hasta la fecha, se han realizado muchos estudios con microorganismos antagónicos para el combate de enfermedades en la planta. Algunos de los microorganismos más utilizados como antagonistas son bacterias, ya que éstas constituyen el grupo más numeroso de organismos en la microflora de la hoja. Además de la gran velocidad de crecimiento y habilidad para utilizar diferentes formas de nutrimentos en diversas condiciones, sin ser superado por ningún otro grupo.

El control biológico de enfermedades foliares, por medio de bacterias, es una estrategia con gran potencial, reportándose varios ejemplos exitosos mediante su uso (Windels y Lindow, 1985).

2.8.1. Estudios sobre *Bacillus spp.*

Bacillus spp. se encuentran frecuentemente distribuidos en el suelo, aire y agua (Collins, 1969; Jordan, 1908).

Una cepa de *Bacillus subtilis* produce antibióticos que inhiben algunos fitopatógenos fungosos importantes tales como *Rhizoctonia solani*, *R. bataticola*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium udum* y *Colletotricum falcatum*. Se

ha encontrado que el principal antibiótico producido por *B. subtilis* es fungitoxico y fungistático. Esto influye en la formación muy característica de 'bulbo' sobre las esporas y tubos germinativos de *A. solani* (Vasudeva y Chakravarthi, 1954).

En frijol se reporta que la cepa APPL-1 de *B. subtilis* asperjada de dos a doce horas antes de la inoculación con *Uromyces phaseoli* en el invernadero, redujo más de 95 % el número de pústulas de roya (Baker et al, 1983; Henis y Chet, 1975).

La severidad de la roya del frijol es reducida hasta un 75 % mediante tres aplicaciones por semana con la cepa PPL-3 de *B. subtilis*, lo cual representa un efecto significativo en el crecimiento de la planta, mostrando un color más verde y mayor succulencia (Baker et al, 1985).

Estudios efectuados por Fravel y Spurr (1977), muestran que *B. cereus* redujo la mancha café causada por *Alternaria alternata* en hojas de tabaco.

Morgan (1963) encontró que la roya de los cereales puede ser combatida con aspersiones de *B. pumilus* en trigo y avena.

Según Pusey y Wilson (1984), aparentemente el mecanismo de acción de la bacteria *B. cereus* sobre la superficie de algunos frutos ocurre durante la germinación de esporas en la etapa inicial del desarrollo del tubo germinativo, inhibiendo consecuentemente el crecimiento del hongo.

Observaciones microscópicas realizadas por Baker et al (1985), muestran que el desarrollo del tubo germinativo no es normal, y que algunas uredosporas desarrollan protuberancias protoplasmáticas anormales al estar en presencia de células de *B. subtilis*. Se cree que sustancias antibióticas producidas por *B. subtilis* en contra de *Monilinia fructicola* actúan sobre la germinación de esporas y el crecimiento de hifas, a través de un mecanismo de supresión que todavía no es conocido (Mckeen et al, 1986).

2.8.2. Estudios sobre *Pseudomonas* spp.

Las *Pseudomonas* spp. fluorescentes son conocidos por su capacidad para producir antibióticos antimicrobiales (Leisinger y Margraff, 1979).

Kloepper et al (1980) reportaron que las cepas de *Pseudomonas fluorescens* producen sideroforos que inhiben el crecimiento de otros microorganismos de las raíces.

P. fluorescens está distribuida ampliamente como epífita en la superficie del área foliar y puede ser útil como antagonista. *P. fluorescens* aislada de la rizosfera produce dos antibióticos, uno de los cuales inhibe ficomicetes (Teliz-Ortiz y Burkholder, 1960).

Diversas bacterias, inclusive las cepas de *P. fluorescens*, han sido reportadas como inhibidoras de la germinación de esporas de carbones (Johnson, 1931); otras como PF5 y HV37 son capaces de producir varias sustancias

antibióticas (Howell y Stipanovic, 1979, 1980,; James y Guttererson, 1986).

2.9. Control integrado

El control biológico en la parte aérea de las plantas está menos desarrollado que en el ambiente del suelo (rizósfera) por dos razones principales: (a) Los antagonistas pueden mantenerse por sí mismos en el suelo debido a la mayor supervivencia en este ambiente y (b) por la disponibilidad de fungicidas baratos, efectivos y fácil de aplicar al follaje, desalentando así el uso de control biológico (Blakeman y Fokkema, 1982).

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

Carter y Price (1974, 1975) reportan un ejemplo interesante de control integrado de enfermedades, mediante el uso de benomil y el hongo saprófito *Fusarium lateritium*

para la protección de heridas causadas por la poda en albaricoque contra *Eutypa armenicae* siendo más efectivo que la aplicación de uno sólo de ellos. *F. lateritium* como antagonista fué diez veces menos susceptibles a benomil que *E. armenicae* como patógeno, por lo tanto, la acción de fungicidas y antagonistas sobre el patógeno fue complementaria.

En el futuro, el control biológico sobre la superficie aérea dependerá no sólo de la efectividad, sino también del costo competitivo con fungicidas convencionales y de la ausencia de efectos secundarios de organismos aplicados tal como toxicidad contra mamíferos.

Otros beneficios del control biológico, como oposición al control químico, debe incluir una disminución del daño al ambiente a largo plazo por el uso de químicos persistentes, y ausencia de residuos químicos en las partes comestibles de cultivo (Blakeman y Fokkema, 1982)

Para la comercialización, es ideal que los antagonistas presenten las siguientes características: no patogénicos a plantas, genéticamente estables, efectivos a baja concentración, eficientes contra un amplio rango de patógenos en varias plantas, compatibles con agroquímicos comerciales, fácil de producir en medios baratos, preparados en forma que puedan ser almacenados y distribuidos, y capaz de sobrevivir bajo condiciones desfavorables (Pusey, 1990)

Cuando se dispone del antagonista deseable, pero no se ha obtenido un nivel satisfactorio de control de la

enfermedad es deseable que el uso del antagonista vaya acompañado por una o más de las siguientes practicas: rotación de cultivos para reducir la cantidad de inóculo inicial de patógeno, selección de fecha de siembra, emplear prácticas de irrigación, adición de antagonistas suplementarios, manipulación del ambiente para producir máxima resistencia de los hospederos, transferencia de resistencia genética de progenitores silvestres a cultivares domésticos, creación de cultivares mejor adaptados.

(Baker y Cook, 1974; Cook y Baker, 1983).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización.

El trabajo se realizó en la sede del CATIE, en el laboratorio de Fitopatología y en la Estación Experimental 'La Montaña' del CATIE.

El CATIE se encuentra ubicado en el cantón de Turrialba, Costa Rica a 590 m.s.n.m. con 9° 52' latitud norte y 83° 38' longitud oeste. Presenta una precipitación media anual de 2640 mm, con una temperatura promedio anual de 21.6 °C, máxima de 26.5 °C, y una mínima de 18.0 °C. La humedad relativa es de 87 %, y la radiación solar promedio mensual de 17 KJ.m⁻².día⁻¹.

Durante la fase experimental en el campo (30 de marzo a 26 de julio, 1992), los valores promedios de temperatura y humedad relativa que se presentaron fueron de 22.3 °C y 85.0 %, respectivamente con una temperatura mínima de 18.8 °C y una máxima de 27.5 °C, la humedad relativa mínima que se presentó fue de 54.1 %.

Cuadro 1. Datos climáticos de marzo a julio, 1992. Estación Experimental La Montaña, CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Elementos climáticos	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio
Temp. media mensual (°C)	21.6	22.5	22.4	23.0	21.9
Precipitación media mensual (mm/mes)	68.6	196.4	271.3	235.4	240.9
Humedad relativa (%)	83.9	83.7	85.9	84.7	86.7
Radiación solar (cal/cm ² /día)	17.4	17.8	16.7	18.2	15.1
Brillo solar (hr.)	5.2	4.9	4.5	5.6	3.4

3.2. Material y metodología utilizada en campo y laboratorio.

3.2.1. Efecto de las enmiendas sobre la enfermedad en el campo: Ensayo 1.

Este experimento se realizó con el fin de conocer el efecto de las enmiendas sobre la enfermedad bajo condiciones de campo

3.2.1.1. Material experimental usado en campo

Los materiales usados en la prueba de campo fueron los siguientes:

- Tomate cultivar 'Dina', el cual presenta las siguientes características: crecimiento semideterminado, de buena producción y cobertura foliar, resistente a marchitez bacterial, fruto grande (8-10 cm), peso de fruto entre 140 y 160 g (León, 1985).

- Enmiendas: a) quitina, se considera el polímero de la monoacetilglucosamina y soluble en ácido sulfúrico o clorhídrico concentrado.

b) leche, con un contenido de 87 % agua , 5 % proteínas, 4 % grasa, lactosa, vitaminas, sales minerales, etc..

- Fungicida clorotalonil, comunmente usado para el control de *A. solani* en tomate.

3.2.1.2. Tratamientos.

Los tratamientos evaluados en el campo correspondientes a los tres factores (quitina, leche y fungicida) con dos niveles (aplicar o no aplicar) fueron:

- T1: Testigo absoluto (agua).
- T2: Aplicación de fungicida.
- T3: Aplicación de leche.
- T4: Aplicación de leche + fungicida.
- T5: Aplicación de quitina.
- T6: Aplicación de quitina + fungicida.
- T7: Aplicación de quitina + leche.
- T8: Aplicación de quitina + leche + fungicida.

3.2.1.3. Descripción de la unidad experimental.

La unidad experimental estuvo constituida por cuatro surcos de 4.5 m de largo incluyendo 0.25 m de borde en ambos extremos de cada surco con un total de 36 plantas. Los surcos fueron espaciados a 1.2 m y con una distancia entre plantas de 0.5 m (21.6 m^2 por cada unidad experimental). La parcela útil se estableció en los dos surcos centrales, tomando 7 plantas por surco para un total de 8.4 m^2 .

3.2.1.4. Diseño experimental.

El diseño experimental utilizado fue de bloques completos al azar con tres repeticiones, se analizaron ocho tratamientos, correspondientes a un arreglo factorial de tres factores por dos niveles.

3.2.1.5. Procedimiento experimental.

Se utilizó como fungicida el clorotalonil (75 % de 2,4,5,6,-tetracloroisofaltonitrio), a una concentración de 500 g/200 L de agua.

La suspensión coloidal de quitina fue aplicada a una concentración de 0.5 %. La formulación con quitina para la primera aplicación fue ajustada aproximadamente a un pH de 7, agregando solución de NaOH 1N. De inmediato apareció un síntoma de fitotoxicidad en las plantas asperjadas con la quitina y fungicida. A partir de la segunda aplicación se modificó el pH a 8. La quitina coloidal fue preparada mediante el método de Backman modificado por Salazar y Okumoto (Anexo 1). Las conchas de camarones se consiguieron de la Talmana S.A. Punto Arenas, Costa Rica.

La leche cruda utilizada procedía de la finca de ganadería, CATIE. y se aplicó a una concentración de 4.8 L/200 L de agua.

Las aplicaciones se iniciaron al observar las primeras manchas de tizón temprano (37 días después del transplante) y a partir de ese momento se hicieron aplicaciones cada 10 u 11 días en el transcurso del ciclo de cultivo.

3.2.1.6. Variables evaluadas y análisis estadístico.

3.2.1.6.1. Estimación de la enfermedad.

Las variables evaluadas fueron la severidad de *A. solani*, iniciando las lecturas al aparecer las primeras manchas y continuando con lecturas cada 7 a 10 días durante el ciclo del cultivo.

La severidad del patógeno se evaluó con base en la escala de Horsfall-Barratt modificada por Large(1966).

0: Planta sana.

1: 0-1 % de área foliar infectada.

2: 1-3 % de área foliar infectada.

3: 3-9 % de área foliar infectada.

4: 9-24 % de área foliar infectada.

5: 24-50 % de área foliar infectada.

6: 50-76 % de área foliar infectada.

7: 76-91 % de área foliar infectada.

8: 91-99 % de área foliar infectada.

9: Planta muerta.

Todas las observaciones ubicadas entre dos porcentajes representados en la escala, se evaluaron como porcentaje intermedio entre dos marcas de clase. Esto permite calcular el porcentaje de área foliar infectada en una parcela determinada con la siguiente fórmula:

Índice de intensidad(%)

$$= \frac{\sum (\text{porcentaje de grado} * \text{frecuencia de cada grado})}{\text{(número total de plantas observadas)}}$$

Para el análisis de la información se hizo un análisis de varianza, conteniendo las correspondientes pruebas de los efectos de los factores e interacciones.

Los datos obtenidos fueron transformados utilizando la función logística $\text{logit} = \ln[y/(100-y)]$, donde Y = porcentaje de índice de intensidad. La tasa de infección aparente(r) fue calculada para cada tratamiento mediante el modelo logístico del porcentaje de la enfermedad a través del tiempo(Van der Plank, 1963). El área debajo de la curva de progreso de la enfermedad(ACPE) fué calculado según lo descrito por Shaner y Finney (1977).

$$\text{ACPE} = \sum_{i=1}^n [(X_{i+1} + X_i)/2][t_{i+1} - t_i]$$

donde:

X_i = Proporción de la enfermedad en la enésima observación.

t_i = Tiempo en la enésima observación.

n = Número total de observaciones.

La tasa de infección aparente (r) y el área debajo de la curva de progreso de la enfermedad (ACPE) son los dos parámetros generalmente usados en epidemiología comparativa.

Sin embargo, Hernández y Montoya (1987) recomiendan usar el ACPE cuando la cantidad de inóculo inicial difiera significativamente entre tratamientos.

3.2.1.6.2. Evaluación de rendimiento.

Los rendimientos se midieron por categorías de calidad de la fruta, mediante la siguiente escala (Sterlin, 1986):

Clase I: Frutos con peso superior a 160 g y con diámetro mayor a 7.0 cm; fruta con buena sanidad y apariencia.

Clase II: Frutos con peso entre 120 y 160 g y diámetro entre 5.5 a 7 cm; frutas con buena apariencia.

Clase III: Frutos con peso inferior a 120 g y con diámetro menor a 5.5 cm; por lo general no presenta grado de madurez definido.

Además se midieron la cantidad de frutas dañadas y luego se calculó el porcentaje de estas en la producción total.

Para cada clase de tomate fueron evaluadas la producción total y porcentaje de frutas dañadas, las variables mediante análisis de varianza, conteniendo las correspondientes pruebas de los efectos de los factores e interacciones.

3.2.1.6.3. Análisis económico.

El análisis económico se realizó por medio de presupuestos parciales, considerando los datos de ingresos y costos variables de los diferentes tratamientos

3.2.1.7. Manejo de experimento.

Las labores realizadas en el invernadero y el campo fueron los siguientes:

3.2.1.7.1. Semillero.

El suelo utilizado se desinfectó con bromuro de metilo en dosis de 454 g por m³. El 27 de febrero, 1992 las semillas de tomate fueron sembradas en vasos plásticos No.16 (Proplax, Productos Plasticos,S.A. San Jose, Costa Rica.). Se sembró 4-5 semillas en un vaso plástico y luego se raleó a una planta por vaso.

3.2.1.7.2. Preparación del suelo.

Se realizó un pase de arado, uno de rotovador y por último se surcó a distancia de 1.2 m.

Se realizaron análisis de suelo en el laboratorio de suelo del CATIE, tomando muestras en cada bloque del ensayo. Los resultados se presentan en el Anexo 2.

3.2.1.7.3. Trasplante.

Cuando las plantas alcanzaron una altura de 12-15 cm (30 de marzo, 1992) fueron llevadas al campo preparado y se trasplantaron sobre el lomo del camellón a una distancia de 50 cm entre plantas.

3.2.1.7.4. Fertilización.

La primera fertilización se realizó 7 días después del trasplante, aplicando alrededor de la planta la fórmula completa 12-24-12, en dosis de 250 Kg/ha en la forma de media luna. A los 30 días después del trasplante, al momento de aporque, se aplicó urea a razón de 400 Kg/ha. A los 56 días después del trasplante se aplicó al follaje multiminerales en dosis de 0.45 L/ha. El Carsil (cloruro de calcio) se aplicó a los 68 y 86 días después del trasplante a la concentración de 5 Kg/ha. A los 77 días se aplicó la fórmula completa 12-24-12 en dosis de 400 Kg/ha.

3.2.1.7.5. Control de malezas.

Se efectuaron dos limpiezas manuales durante la etapa de evaluación a los 30 y 71 días después del trasplante. Después de la primera limpieza, se procedió al aporque de las plantas de tomate.

3.2.1.7.6. Control de insectos.

Se hizo una aplicación de Volaton granulado (foxim) a razón de 25 Kg /ha al momento del trasplante y un día después Volaton líquido (foxim) a razón de 1 L/ha, para combatir gusanos trozadores (*Agrotis sp.*). Se aplicó Tamaron 600 (metamidofós) a razón de 1 L/ha a los 14 y 43 días después del trasplante con el propósito de controlar el ataque de *Diabrotica sp.*.

3.2.1.7.7. Control de enfermedades.

Con el fin de combatir el ataque de enfermedades causadas por bacterias, especialmente marchitez bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*), se hizo una aplicación de formalina a razón de 20 ml/L de agua en la postura de las pocas plantas afectadas después de haber sido arrancadas a los 25 y 28 días después del trasplante. Además se aplicó al suelo Agrimicin 500 en dosis de 500 g/200 L de agua a los 29 y 31 días después del transplante.

Para el combate de enfermedades fungosas sobre todo el tizón tardío causado por *Phytophthora infestans* se aplicó Ridomil (metalaxil) y Aliette (fosetyl-Al), a razón de 1.6 Kg /ha y 1.5 Kg /ha, a los 44 y 46, 50, 56 y 77 días después del transplante, respectivamente.

Debido a las contínuas precipitaciones presentadas en el período del experimento se agregó al preparado de los fungicidas el adherente Pegafix en 0.2 L/ha.

3.2.2. Efecto de enmiendas sobre la población de bacterias, *Pseudomonas* spp. fluorescentes y *Bacillus* spp. en las superficies foliares: Ensayo 2.

La estimación de la población bacteriana, además de los dos géneros de bacterias que representan el mayor potencial de control biológico, se llevó a cabo con el fin de conocer la reacción microbiana ante cada tratamiento en la superficie foliar de las plantas de tomate durante el período del ensayo 1.

3.2.2.1. Procedimiento experimental.

La población total de bacterias, *Pseudomonas* spp. fluorescentes y *Bacillus* spp. en la superficie de las hojas de tomate fueron estimadas entre los 7 y 10 días después de la aplicación de los tratamientos mediante la técnica de dilución (Leben, 1961) en agar nutriente (AN) y B de King (King et al, 1954.) en placa petri.

De acuerdo a cada tratamiento, los 15 discos de los cinco folíolos cortados fueron colocados en un Erlenmayer de 125 ml con 50 ml de agua destilada estéril. Posteriormente se agitó por 30-45 min. en el agitador (reciprocal shaker). Luego se colocó 1 ml de dicha solución en un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua destilada estéril, haciéndose diluciones decimales hasta 10^4 . Para el conteo de número de bacterias, las diluciones de 10^{-2} y 10^{-4} fueron sembradas cada una en tres platos de AN, colocándose posteriormente en

una incubadora a 30 °C . La colonia de bacterias se contó entre 48 y 96 horas, estimándose el número de unidades formadoras de colonia por un área de cm^2 (cfu/ cm^2).

Los tres platos con el medio de B de King, en los cuales se efectuó el conteo de *Pseudomonas* sp. fluorescente fueron inóculados con la dilución de 10^{-1} . Posteriormente se colocaron en una incubadora a la temperatura de 30 °C entre 48 y 96 horas. Luego se contó el número de colonias fluorescentes bajo luz ultravioleta, estimándose el número de cfu/ cm^2 .

Para la estimación de la población de *Bacillus* spp., los tres platos de AN fueron sembrados con la dilución original. Posteriormente se colocaron en una incubadora a 41 °C por 24 a 48 horas (Rytter et al, 1989). Seguidamente se contó el número de colonias de *Bacillus* sp., tomando en cuenta a la morfología de colonia, tinción de Gram y observación de la presencia de esporas (Gordon et al, 1973).

3.2.2.2. Análisis estadístico.

Las observaciones tomadas en diferentes tiempos fueron analizadas considerando el diseño experimental como de bloques completos al azar con las parcelas divididas en el tiempo.

El análisis de la información se realizó mediante un análisis de varianza, conteniendo las correspondientes pruebas de los efectos de los factores e interacciones. Previamente se probó la validez de incluir en el modelo como

covariable el número de bacterias totales, *Pseudomonas* spp. fluorescentes y *Bacillus* spp. antes de aplicar los tratamientos. Sin embargo, no fue válido incluirlo como covariable en el modelo.

Para ejecutar el análisis de varianza, los datos obtenidos fueron transformados con $\ln(x+1)$ para reducir la heterogeneidad de la varianza (Steel y Torrie, 1980).

3.2.3. Selección *in vitro* de bacterias antagónicas: Ensayo 3.

Se efectuó el ensayo con el propósito de seleccionar bajo condiciones de laboratorio algunas cepas de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. fluorescentes, que fueran antagónicas a *Alternaria solani*. Además se quería conocer si hay algunos efectos de las enmiendas foliares sobre la presencia de antagonistas. Adicionalmente se probó para las cepas antagónicas la producción de quitinasa para lo cual se consideró la característica bioquímica de estas.

3.2.3.1. Tratamientos.

Las cepas evaluadas, que se consideraron como tratamientos de este experimento fueron 15 de *Bacillus* spp. y 18 de *Pseudomonas* spp. fluorescentes aisladas el 9 de enero de 1992, 11 de *Bacillus* spp. y 49 de *Pseudomonas* spp. fluorescentes aisladas el 17 de enero y el 24 de enero se aislaron 8 de *Bacillus* spp. y 8 de *Pseudomonas* spp. fluorescentes las cuales provenían de hojas de tomate con tratamientos iguales a los descritos en 3.2.1.2., en el cultivo sembrado de 3 de septiembre de 1991.

3.2.3.2. Procedimiento experimental.

3.2.3.2.1. Aislamiento de la bacteria.

Las cepas de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. fluorescentes se aislaron de acuerdo al siguiente procedimiento:

En cada parcela se recolectaron 5 folíolos, una de las 5 plantas de tomate seleccionadas al azar, juntando las tres repeticiones de cada tratamiento. Con los folíolos por no presentar síntomas visibles de *Alternaria* se utilizó la técnica de diluciones para aislar las bacterias antagónicas.

Seguidamente se añadió una alícuota de 0.05 ml de las diluciones, rayandola en el medio de B de King y AN. Los medios B de King y AN se colocaron inmediatamente en una incubadora a 27 y 41 °C, respectivamente. Las cepas de *Pseudomonas* spp. fluorescentes fueron aisladas en el medio B de King, detectando el pigmento fluorescente bajo la luz ultravioleta. Las cepas de *Bacillus* spp. fueron aisladas en el medio AN con el mismo método que se ha mencionado en el primer experimento.

Las cepas seleccionadas fueron purificadas y posteriormente transferidas a tubos con tapas de rosca con AN inclinado. Estos sirvieron de fuente de inóculo para las pruebas sucesivas. Los tubos se conservaron en el refrigerador a 10 °C.

3.2.3.2.2. Preparación de suspensión bacterial y conidial.

Las suspensiones bacteriales fueron preparadas de cultivos ya crecidos por 24 horas en AN a la temperatura de 30 °C y se ajustó a 10^9 células con la ayuda de la cámara de conteo Petroff-Hausser (French y Hebert, 1982).

La esporulación conidial de *A. solani* fue inducida mediante el método de luz ultravioleta, combinado con el método de Dhingra y Sinclair (1985). Los aislamientos de *A. solani* obtenidos por 7 a 10 días de cultivo (creciendo en V-8 agar a 21 °C) fueron colocados bajo un chorro de agua suave durante 24 horas. Esto con la finalidad que se lavara todo lo que estaba adherido al medio de cultivo. Después de 24 horas se eliminó toda el agua de las cajas y se expuso por un periodo de 12 horas a luz ultravioleta y 12 horas a la oscuridad. Este tratamiento se mantuvo durante 3 días. Una vez que las esporas del hongo presentaron suficiente desarrollo, fueron cosechadas, lavando la superficie del medio con agua destilada estéril, se colectaron en un beaker, para luego preservarlas en el refrigerador.

Para obtener la suspensión a la concentración requerida el inóculo se centrifugó en el momento de la inoculación a 3000 rpm durante 20 min.. Posteriormente se realizó el conteo de las esporas de *A. solani* usando un hematocímetro. La concentración de esporas se ajustó a 20,000 conidias/ml e inmediatamente se mezcló con igual volumen de suspensión bacterial o con agua (testigo). Resultando en una concentración final de 10,000 conidias/ml.

3.2.3.2.3. Instalación del experimento.

El porta-objeto cubierto con agar-agua (AA) fue colocado en una placa petri que disponía en su base de papel filtro mojado y un tubo de vidrio en forma V. Se colocó una gota (0.01 ml) de cada suspensión bacterial o agua destilada estéril, (anteriormente mezclado con igual volumen de cada suspensión conidial) en la superficie del dicho porta-objeto, incubando a la temperatura ambiente (25-28 °C).

Después de 24 horas, las conidias y el tubo germinativo fueron teñidos con azul de algodón en lactofenol (Fravel y Spurr, Jr., 1977).

3.2.3.3. Variables evaluadas y análisis estadístico.

Las mediciones microscópicas que se tomaron en cuenta fueron: porcentaje de germinación, número de tubos germinativos por conidia, longitud del tubo germinativo más largo de la conidia y número de ramificaciones principales del tubo germinativo más largo. Las repeticiones fueron tres para cada cepa de bacteria.

Para evaluar la germinación, se observó en el microscópio cada porta-objeto con 5 campos al azar al menos 20 esporas. El número total y el número de conidios germinados fueron contados para cada campo microscópico. Y fue calculado el porcentaje de germinación de conidios.

Se midió el número de tubos germinativos, la longitud de los tubos germinativos y el número de ramificaciones en 30 esporas por cada porta-objeto con la ayuda de un micrómetro.

Para la determinación de posibles bacterias antagonistas, se compararon los tratamientos contra el testigo, mediante la prueba de Dunnette, de acuerdo a cada categoría de medición en diferentes periodos.

La transformación de $\sqrt{(100-X)}$ fué utilizadas para los datos de porcentaje de germinación (Steel y Torrie, 1980).

3.2.4. Estudio de procedimientos para el aislamiento y detección de *Bacillus* spp.: Ensayo 4.

El presente experimento se realizó con el fin de conocer el procedimiento más adecuado para el aislamiento y conteo de *Bacillus* spp., y además, se intentó detectar algunas cepas de esta bacteria que tengan características proteolíticas, quitinolíticas y como medio descomponedor de fungicidas.

3.3.4.1. Tratamientos.

Los tratamientos que se evaluaron correspondieron a dos factores (medio y temperatura). La temperatura tuvo dos niveles (41 y 80 °C). Los medios evaluadas fueron agar nutriente, agar-quitina, agar-leche y agar-fungicida (Cuadro 2).

Cuadro 2. Estructura de los tratamientos en el Ensayo 4.

FUENTE DE INOCULO	TEMPERATURA (°C)	MEDIO DE CULTIVO
TESTIGO	80	AGAR NUTRIENTE
	41	AGAR NUTRIENTE
QUITINA	80	AGAR NUTRIENTE
		AGAR-QUITINA
	41	AGAR NUTRIENTE
		AGAR-QUITINA
LECHE	80	AGAR NUTRIENTE
		AGAR-LECHE
	41	AGAR NUTRIENTE
		AGAR-LECHE
FUNGICIDA	80	AGAR NUTRIENTE
		AGAR-FUNGICIDA
	41	AGAR NUTRIENTE
		AGAR-FUNGICIDA

3.3.4.2. Procedimiento experimental.

Las parcelas aplicadas con el testigo, quitina, leche y fungicida en el primer experimento fueron utilizadas para llevar a cabo este ensayo 4. Se recolectarán 5 folíolos de tomate en cada parcela. Se cortó un total de 15 discos de los folíolos con la ayuda del sacabocado No. 4, colocándolos en un Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de agua destilada estéril. Posteriormente se agitó por 30-45 min. en un agitador (Reciprocal shaker).

Una parte de esa solución fué colocada en baño maría a la temperatura de 80 °C por 10 min. para matar las células bacteriales que no tiene esporas. Seguidamente se tomó una gota (0.05 ml), colocándola en una placa pétri y

extendiéndola con auxilio de una aza para uniformizar la distribución de bacterias. Después se guardó a temperatura ambiente (Backman, 1991).

Una gota de otra parte de dicha solución fué depositada en una placa pétri y luego se extendió y se colocó en un incubador a 41 °C (Ryter, 1989).

Las pruebas fueron realizadas en el 11, 17 y 26 de julio de 1992.

3.3.4.3. Análisis estadístico.

El diseño experimental fue de bloques completos al azar con la parcela sub-subdividida en el tiempo. Entre dos y cinco días después de la instalación de experimento, se contó el número de colonias de *Bacillus* spp. en cada tratamiento. Se determinó la influencia de la temperatura y la diferencia de los medios de cultivo sobre el crecimiento de *Bacillus* spp. mediante un análisis de varianza. Para análisis de la información, los datos obtenidos fueron transformados por $\ln(X + 1)$ para reducir la heterogeneidad de varianza (Steel y Torrie, 1980).

4. RESULTADOS

4.1 Efecto de enmiendas sobre la enfermedad en el campo.

4.1.1 Efecto de los tratamientos sobre el tizón temprano.

Los factores analizados para este experimento fueron el efecto de la aplicación de quitina, leche, fungicida y todas las posibles combinaciones de estas. La variable evaluada fue la severidad de *A. solani*, expresado como % de área foliar infectada, tomando las lecturas en los 30, 37, 45, 61, 68, 75, 82, 90, 97, 104, 111 y 118 días después del transplante.

La Figura 1 presenta el comportamiento de la severidad de la enfermedad por tratamiento en el ciclo del cultivo. Se calculó la tasa de infección aparente (r) y el área debajo de la curva de progreso de la enfermedad (ACPE) según los datos obtenidos (Cuadro 3). La r por tratamiento como coeficiente de regresión y el inóculo inicial como intercepto (Anexo 3), se presenta en la figura 2.

El análisis de la tasa de infección aparente (r), presentó una diferencia estadística altamente significativa ($p < 0.01$) en el efecto positivo de fungicida (cuadro 4).

Con respecto al ACPE, también hubo una diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) para el efecto positivo del fungicida. Además, se encontró diferencias significativas ($p < 0.05$) en el efecto negativo de la aplicación de leche (Cuadro 5).

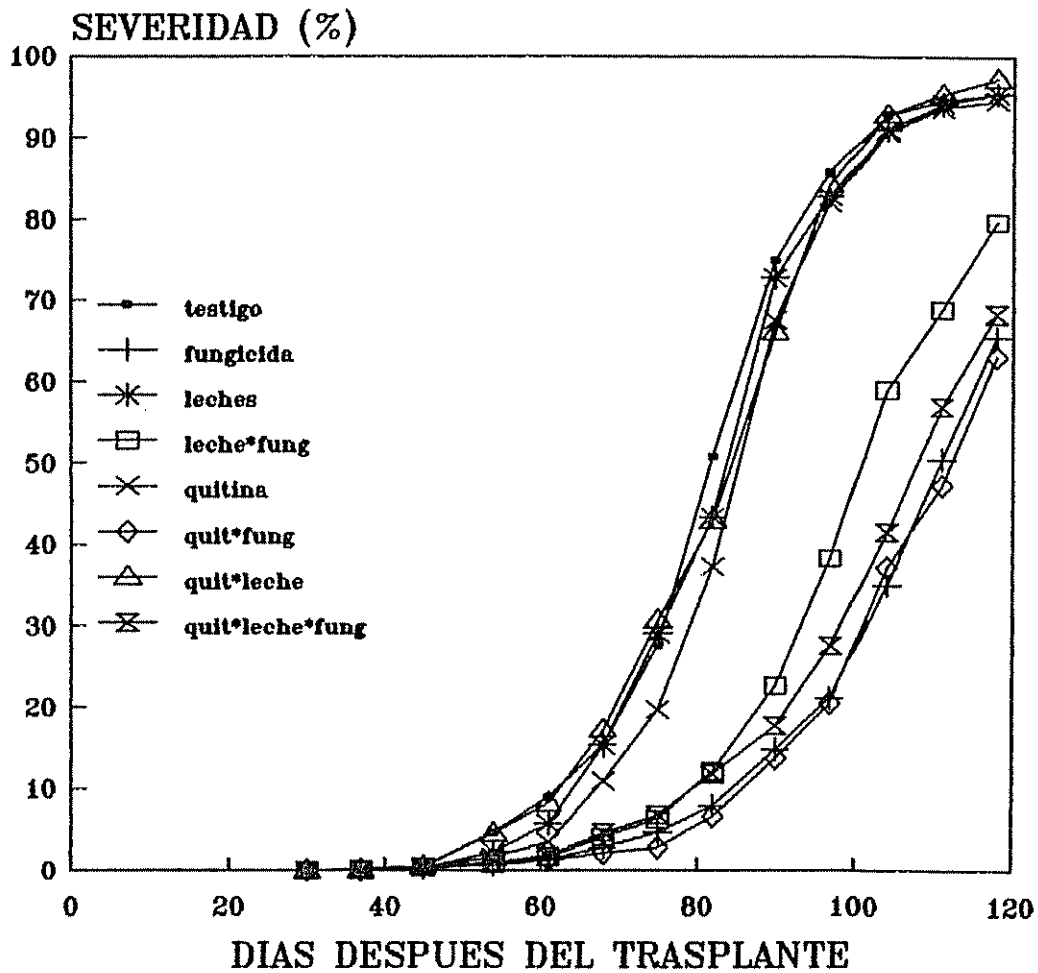


Figura 1. Efecto de los tratamientos sobre el desarrollo de la enfermedad. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

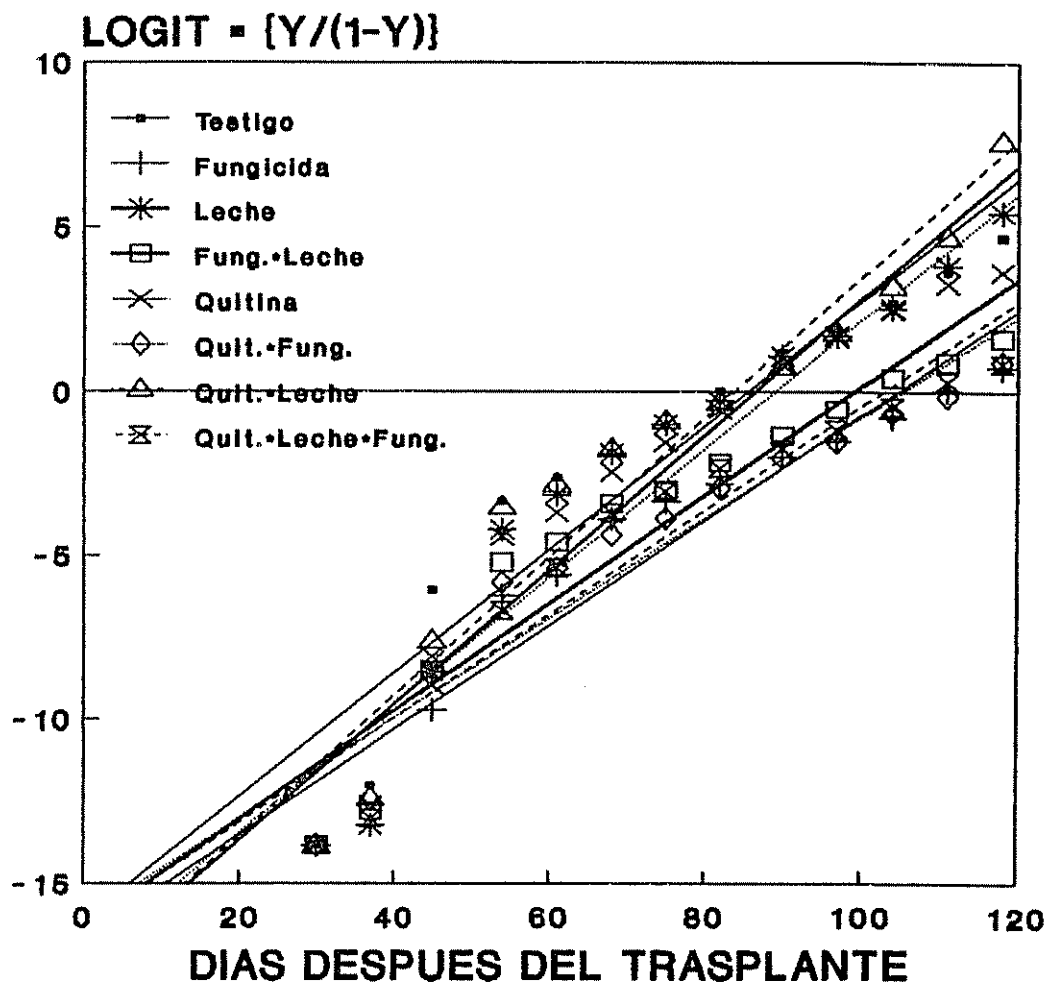


Figura 2. Efecto de los tratamientos, respecto a la tasa de infección aparente (r). CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

Cuadro 3. Efecto de los tratamientos sobre la severidad de *A. solani*, en los diferentes parámetros. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

Codigo	Tratamiento ^a			% infección ^b final	tasa de ^c infección aparente (r)	ACPE ^c
	Quit	Leche	Fung			
T1	0	0	0	95.3	0.188	71.9
T2	0	0	1	65.5	0.160	24.3
T3	0	1	0	95.4	0.205	69.0
T4	0	1	1	79.7	0.165	36.0
T5	1	0	0	94.5	0.195	64.7
T6	1	0	1	63.1	0.153	23.3
T7	1	1	0	97.1	0.212	69.9
T8	1	1	1	68.3	0.158	28.9

a: 0 = no aplicar, 1 = aplicar.

b: datos obtenidos al 118 días después del trasplante.

c: El cálculo de tasa de infección aparente (r) y área debajo de la curva de progreso de la enfermedad (ACPE) están descritos en el capítulo de materiales y métodos.

Cuadro 4. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos, con la tasa de infección aparente (r). CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

F.V.	G.L.	S.C	C.M.	F.c.
Bloque	2	0.00051618	0.00025809	0.69ns.
Quitina	1	0.00000001	0.00000001	0.00ns.
Leche	1	0.00076041	0.00076041	2.03ns.
Quit*Leche	1	0.00000001	0.00000001	0.00ns.
Fungicida	1	0.01022958	0.01022958	27.27**
Quit*Fung	1	0.00025931	0.00025931	0.69ns.
Leche*Fung	1	0.00020703	0.00020703	0.55ns.
Quit*Leche *Fung	1	0.00000051	0.00000051	0.00ns.
Error	14	0.00525116	0.00037508	
Total	23		C.V. = 10.79	

** : nivel de significancia al 1 %.

ns. : no significativo.

Cuadro 5. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos con respecto a el área debajo de la curva de progreso de la enfermedad (ACPE). CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.
Bloque	2	1123.6796	561.8398	6.06*
Quitina	1	272.3715	272.3715	2.94ns.
Leche	1	505.6011	505.6011	5.46*
Quit*Leche	1	5.7822	5.7822	0.06ns.
Fungicida	1	34891.1051	34891.1051	376.62**
Quit*Fung	1	4.4984	4.4984	0.05ns.
Leche*Fung	1	291.3647	291.3647	3.15ns.
Quit*Leche *Fung	1	261.3120	261.3120	2.82ns.
Error	14	1296.9957	92.6426	
Total	23		C.V. = 13.03	

*: nivel de significancia al 5 %.

** : nivel de significancia al 1 %.

ns.: no significativo.

4.1.2. Evaluación del rendimiento.

El tratamiento con fungicida solo obtuvo el rendimiento total más alto, con 34.5 ton/ha de tomate, seguido por el de fungicida con leche, con un rendimiento de 27.5 ton/ha, con quitina se alcanzó una producción de 15.5 ton/ha y por último el tratamiento de la aplicación de leche presenta el rendimiento más bajo con 12.1 ton/ha (Cuadro 6 y Figura 3).

El testigo presentó el mayor % de frutos dañados con respecto a los otros tratamientos evaluados (Cuadro 6). Las causas principales de los frutos dañados fueron: daños por pajaros, la pudrición suave del fruto (*Erwinia carotovora*), tizón tardío (*Phytophthora infestans*) y la pudrición del extremo apical por deficiencia de calcio.

Cuadro 6. Rendimiento total y porcentaje de frutos dañados por tratamiento de acuerdo a la calidad. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

	Tratamiento ^a			Rendimiento(ton/ha)				%dañados ^c
	Quit	Leche	Fung	I ^b	II	III	Total	
T1	0	0	0	6.5	3.8	3.9	14.2	48.6
T2	0	0	1	16.5	10.8	7.2	34.5	22.2
T3	0	1	0	5.2	3.2	3.7	12.1	44.8
T4	0	1	1	11.8	8.5	7.2	27.5	25.7
T5	1	0	0	8.0	4.2	3.3	15.5	38.6
T6	1	0	1	9.3	6.8	5.4	21.5	31.4
T7	1	1	0	7.4	4.3	3.9	15.6	39.6
T8	1	1	1	10.9	5.4	6.7	23.0	29.0

a: 0 = no aplicar, 1 = aplicar.

b: La clasificación de la calidad de los frutos, por peso y tamaño, está descrito en el texto

c: %dañados= frutos dañados/(total de frutos)*100

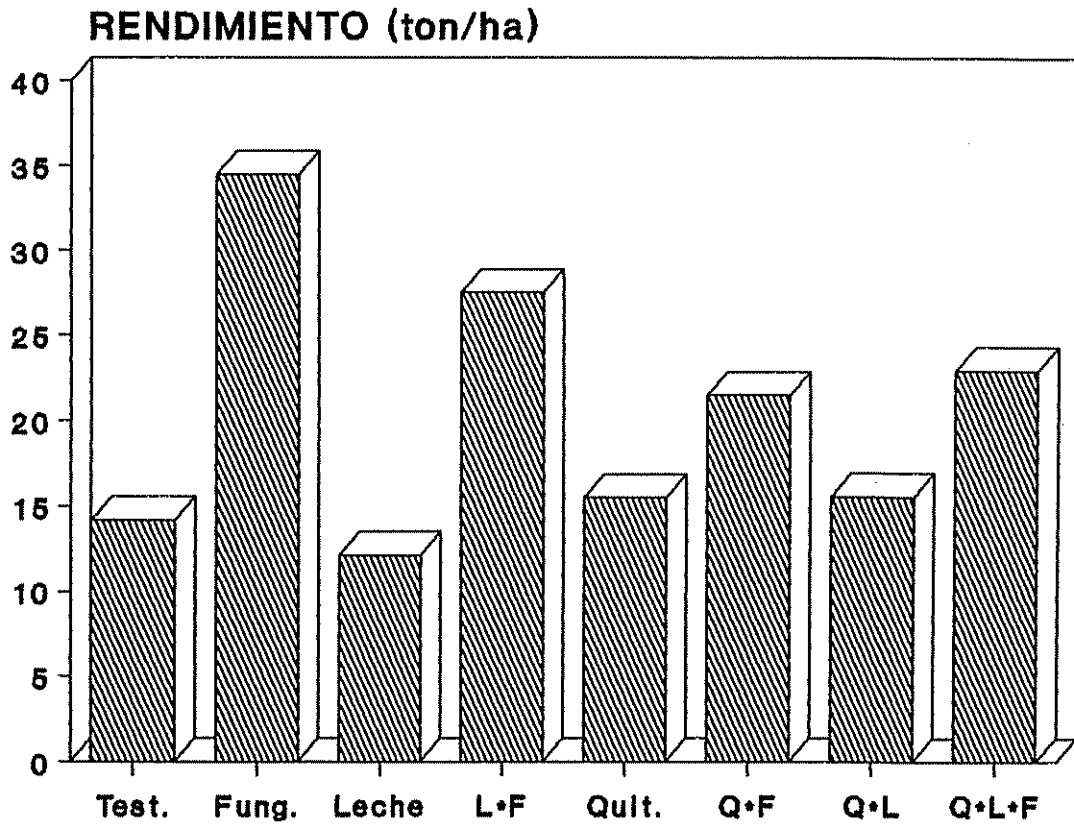


Figura 3. Rendimiento total por tratamiento en el experimento de campo. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

El análisis de varianza de los rendimientos mostraron una interacción significativa ($p < 0.05$) entre el efecto de fungicida y quitina en la primera y segunda clase como en el rendimiento total (Cuadro 7, 8, 9 y 10).

El análisis de varianza para el porcentaje de frutos dañados presentó una interacción altamente significativa ($p < 0.01$) entre el efecto de fungicida y quitina (Cuadro 11).

Cuadro 7. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos en la clase 1. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.
Bloque	2	87478035.2	43739017.6	6.80**
Quitina	1	7308580.0	7308580.0	1.14ns.
Leche	1	9349779.3	9349779.3	1.45ns.
Quit.*Leche	1	17868242.2	17868242.2	2.78ns.
Fungicida	1	173108182.8	173108182.8	26.91**
Quit.*Fung.	1	51679391.7	51679391.7	8.03*
Leche*Fung.	1	704086.7	704086.7	0.11ns.
Quit.*Leche *Fung.	1	11715118.0	11715118.0	1.82ns.
Error	14	90076293.7	6434021.0	
Total	23		C.V. = 23.08	

*: nivel de significancia al 5 %.

** : nivel de significancia al 1 %.

ns.: no significativo.

Cuadro 8. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos en la clase 2. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.
Bloque	2	12445510.96	6222755.48	3.39ns.
Quitina	1	11765075.83	11765075.83	6.40*
Leche	1	6280626.99	6280626.99	3.42ns.
Quit.*Leche	1	1232750.77	1232750.77	0.67ns.
Fungicida	1	96053002.83	96053002.83	52.28**
Quit.*Fung.	1	28257197.63	28257197.63	15.38**
Leche*Fung.	1	3697560.57	3697560.57	2.01ns.
Quit.*Leche *Fung.	1	35285.15	35285.15	0.02ns.
Error	14	25722513.9	1837322.4	
Total	23		C.V. = 23.08	

*: nivel de significancia al 5 %.

** : nivel de significancia al 1 %.

ns.: no significativo.

Cuadro 9. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos en la clase 3. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.
Bloque	2	5994554.73	2997277.37	1.02ns.
Quitina	1	2772475.23	2772475.23	0.94ns.
Leche	1	981072.98	981072.98	0.33ns.
Quit.*Leche	1	1340221.16	1340221.16	0.46ns.
Fungicida	1	51515310.80	51515310.80	17.51**
Quit.*Fung.	1	1295587.47	1295587.47	0.44ns.
Leche*Fung.	1	365539.00	365539.00	0.12ns.
Quit.*Leche *Fung.	1	82223.69	82223.69	0.03ns.
Error	14	41198551.53	2942753.68	
Total	23		C.V. = 33.20	

*: nivel de significancia al 5 %.

** : nivel de significancia al 1 %.

ns.: no significativo.

Cuadro 10. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos en el rendimiento total. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.
Bloque	2	195532969.4	97766484.7	9.18**
Quitina	1	60817215.6	60817215.6	5.71*
Leche	1	20915690.4	20915690.4	1.96ns.
Quit.*Leche	1	42185761.3	42185761.3	3.96ns.
Fungicida	1	908126566.2	908126566.2	85.28**
Quit.*Fung.	1	186126720.5	186126720.5	17.48**
Leche*Fung.	1	4654395.1	4654395.1	0.44ns.
Quit.*Leche *Fung.	1	15189147.0	15189147.0	1.43ns.
Error	14	149076638	10648331	
Total	23		C.V. = 15.93	

*: nivel de significancia al 5 %.

** : nivel de significancia al 1 %.

ns.: no significativo.

Cuadro 11. Análisis de varianza para el efecto de los tratamientos en el porcentaje de frutos dañados en la producción total. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.
Bloque	2	338.909858	169.454929	6.70**
Quitina	1	2.835250	2.835250	0.11ns.
Leche	1	1.215450	1.215450	0.05ns.
Quit*Leche	1	0.429605	0.429605	0.02ns.
Fungicida	1	1497.919001	1497.919001	59.20**
Quit*Fung	1	287.629884	287.629884	11.37**
Leche*Fung	1	6.041070	6.041070	0.24ns.
Quit*Leche +Fung	1	42.776070	42.776070	1.69ns
Error	14	354.211187	25.300799	
Total	23		C.V. = 14.37	

*: nivel de significancia al 5 %.

** : nivel de significancia al 1 %.

ns.: no significativo.

4.1.3. Evaluación económica.

El análisis de presupuesto parcial en el cuadro 12 presenta el ingreso bruto más alto, en el tratamiento de fungicida solo con un beneficio neto de 1,617,100 colones y el más bajo en el de quitina y leche con una pérdida de 34,500 colones, debido a alto costo para la preparación de quitina. El ingreso bruto fue calculado con los precios de venta de tomate en el CENADA, Costa Rica (Anexo 4).

Cuadro 12. Análisis de presupuesto parcial de costos de tratamientos aplicados en el experimento de campo. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8
Quit.	0	0	0	0	1	1	1	1
Leche	0	0	1	1	0	0	1	1
Fung.	0	1	0	1	0	1	0	1
Rend. ¹	14.2	34.5	12.1	27.5	15.5	21.5	15.6	23.0
I.B. ²	566.0	1624.0	468.0	1167.0	662.0	985.0	641.0	1008.0
Costos variables (miles de colones)								
Quit.	0.0	0.0	0.0	0.0	673.0	673.0	673.0	673.0
Leche	0.0	0.0	0.6	0.6	0.0	0.0	0.6	0.6
Fung.	0.0	5.0	0.0	5.0	0.0	5.0	0.0	5.0
Costo aplic.	0.0	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9
T.C.V. ³	0.0	6.9	2.5	7.5	674.9	679.9	675.5	680.5
B.N. ⁴	566.0	1617.1	465.5	1159.5	-12.9	305.1	-34.5	327.5

1: Rendimiento (ton/ha).

2: Ingreso bruto (miles colones/ha).

3: Total de costo variable/ha.

4: Beneficio neto/ha.

4.2. Evaluación de la población de bacterias, *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. fluorescentes.

La evaluación de la población de bacterias, *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. fluorescentes se realizó a los 35, 44, 53, 72, 82, 92, 106 y 115 días después del trasplante. El comportamiento de la población se presenta en la Figura 4.

El análisis de la varianza, con respecto a la población bacteriana muestra una diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) en el tiempo de muestreo y una interacción significativa ($p < 0.05$) entre quitina y fungicida (Cuadro 13).

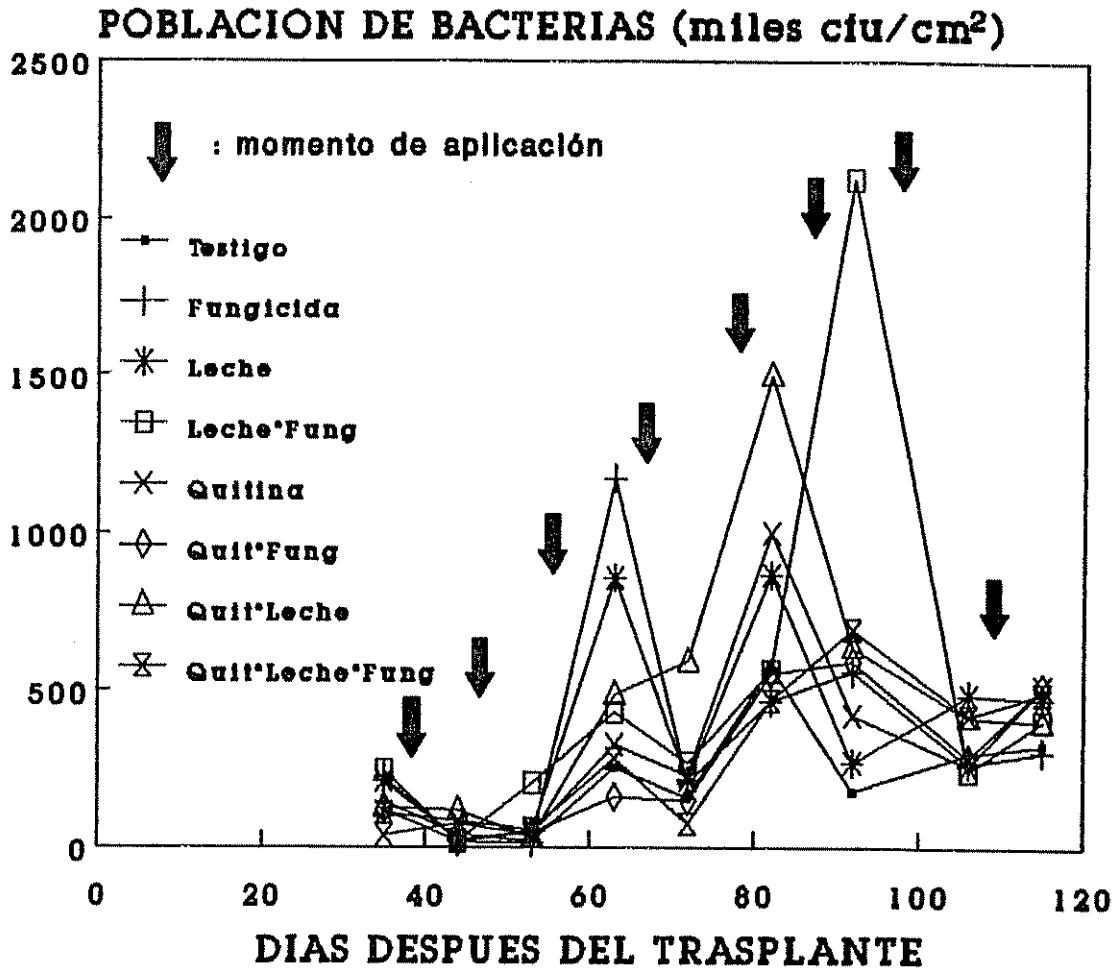


Figura 4. Población de bacterias por tratamiento en el experimento de campo. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

Cuadro 13. Análisis de varianza para la población bacterial, respecto a la aplicación de los tratamientos. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

F.V.	G.L.	S.L.	C.M.	Fc.
Bloque	2	0.17722	0.08861	0.64ns
Quitina	1	0.22139	0.22139	1.60ns
Leche	1	0.49026	0.49026	3.54ns
Quit.*Leche	1	0.04760	0.04760	0.34ns
Fungicida	1	0.18997	0.18997	1.37ns
Quit.*Fung.	1	1.03406	1.03406	7.47*
Leche*Fung.	1	0.01647	0.01647	0.12ns
Quit.*Leche*Fung.	1	0.00289	0.00289	0.02ns
Error(a)	14	1.93824	0.13845	
Tiempo	7	54.95271	7.85039	24.62*
Quit.*Tiempo	7	1.21775	0.17396	0.55ns
Leche*Tiempo	7	0.62965	0.08995	0.28ns
Quit.*Leche*Tiempo	7	1.47639	0.21091	0.66ns
Fung.*Tiempo	7	1.70019	0.24288	0.76ns
Quit.*Fung.*Tiempo	7	2.25330	0.32190	1.01ns
Leche*Fung.*Tiempo	7	1.00437	0.14348	0.45ns
Quit.*Leche*Fung. *Tiempo	7	0.86024	0.12289	0.39ns
Error(b)	112	35.71093	0.31885	
Total	191		C.V. = 10.88	

*: nivel de significancia al 5 %.
ns.:no significativo.

La Figura 5 muestra la interacción entre quitina y fungicida.

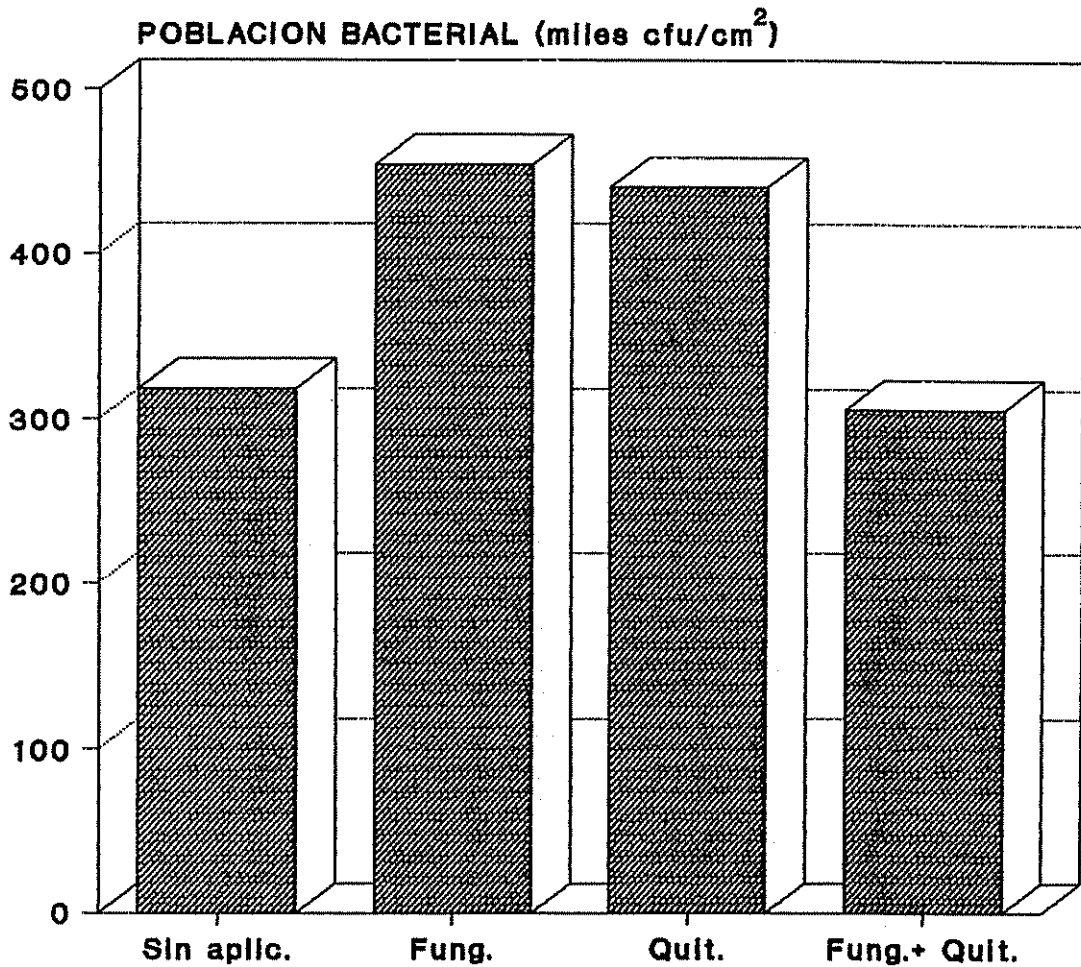


Figura 5. Interacción entre quitina y fungicida en la población bacteriana. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

La población de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. fluorescentes cambió en el tiempo. El análisis de varianza arroja diferencia altamente significativa al 1 % (Anexo 5 y 6).

La Figura 6 muestra la población de bacterias, *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. fluorescentes, en relación a ciertos factores climáticos.

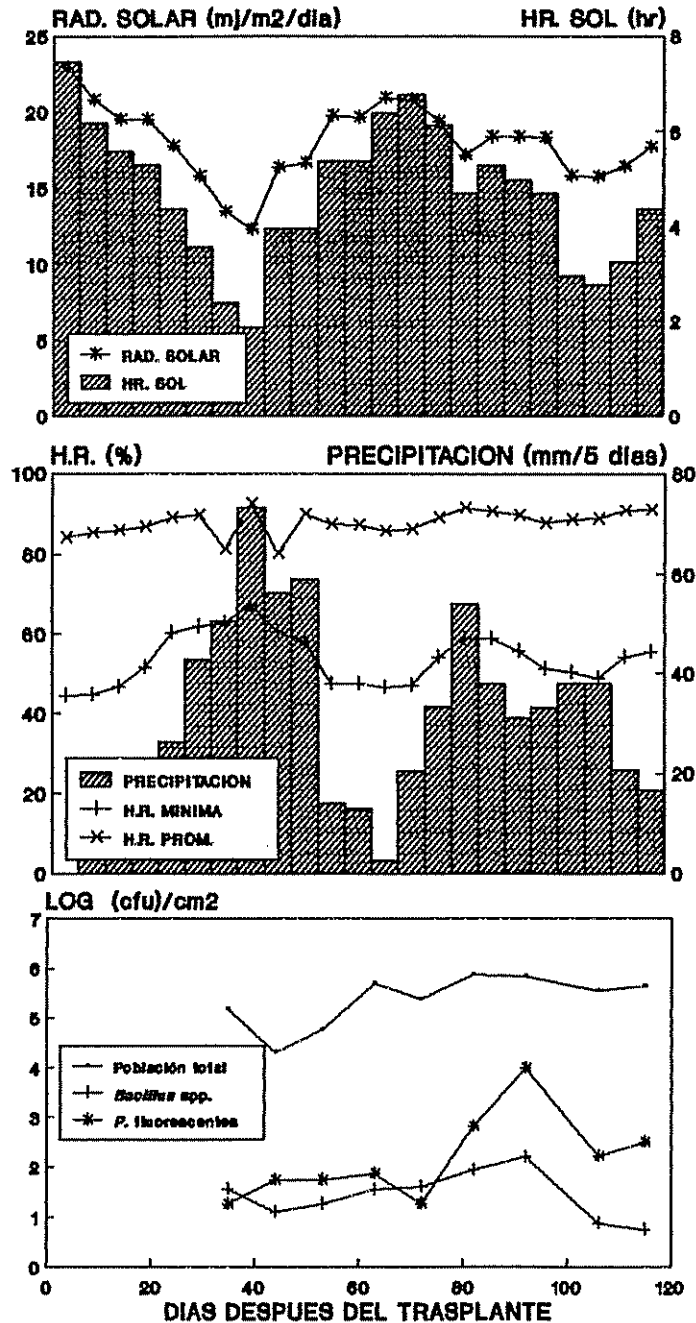


Figura 6. Variación de las condiciones climáticas (radiación solar, hr. de sol, precipitación, hr. de H.R. mínima y promedio) y población de bacterias, *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. fluorescentes durante el período del ciclo de cultivo del tomate. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

4.3. Selección *in vitro* de bacterias antagónicas a *A. solani*.

Los Anexos 7, 8 y 9 presentan el efecto antagónico de las cepas aisladas el 9, 17 y 24 de enero de 1992, respectivamente. La mayoría de los tratamientos presenta más de 90 % de germinación de las conidias del hongo. Sin embargo, muchas cepas bacteriales mostraron el antagonismo a *A. solani* en el crecimiento del tubo germinativo, especialmente afectando a su longitud, de acuerdo a la prueba de Dunnett.

Las Figuras 7 y 8, muestran el grado de antagonismo sobre el crecimiento de los tubos germinativos del hongo debido a las diferentes cepas bacteriales. Algunas de las cepas de *Pseudomonas* spp. fluorescentes estimularon el crecimiento de tubos germinativos (Figura 9).

Las cepas de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. fluorescentes presentan un diferente grado de antagonismo sobre el número de ramificaciones del tubo germinativo. Algunas de las cepas de *Pseudomonas* spp. fluorescentes también presentaron un estímulo sobre el número de ramificación del tubo germinativo (Figuras 10, 11 y 12).

Las figuras 13, 14 y 15 muestran el efecto de las cepas bacteriales sobre el número de tubos germinativos.

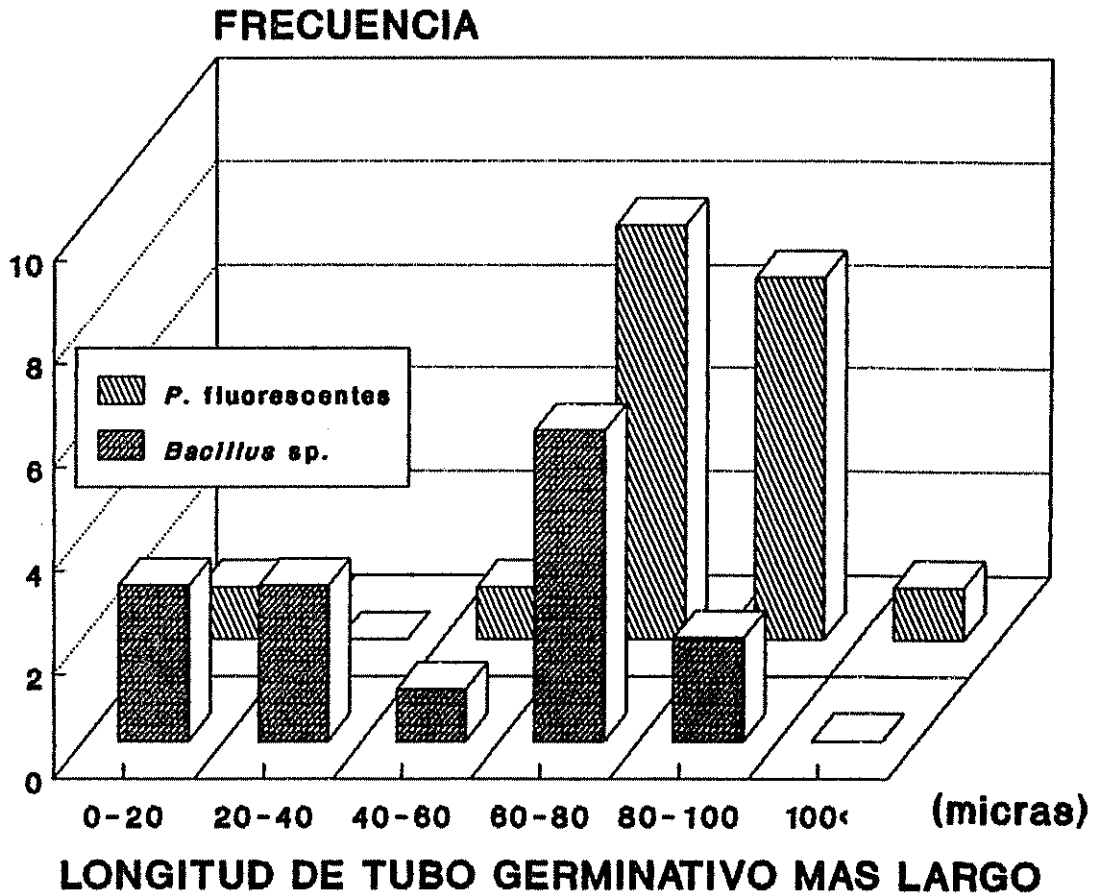


Figura 7. Inhibición del crecimiento de los tubos germinativos del hongo, debido a las cepas bacteriales (Testigo: 185.6 micras), aisladas el 9 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

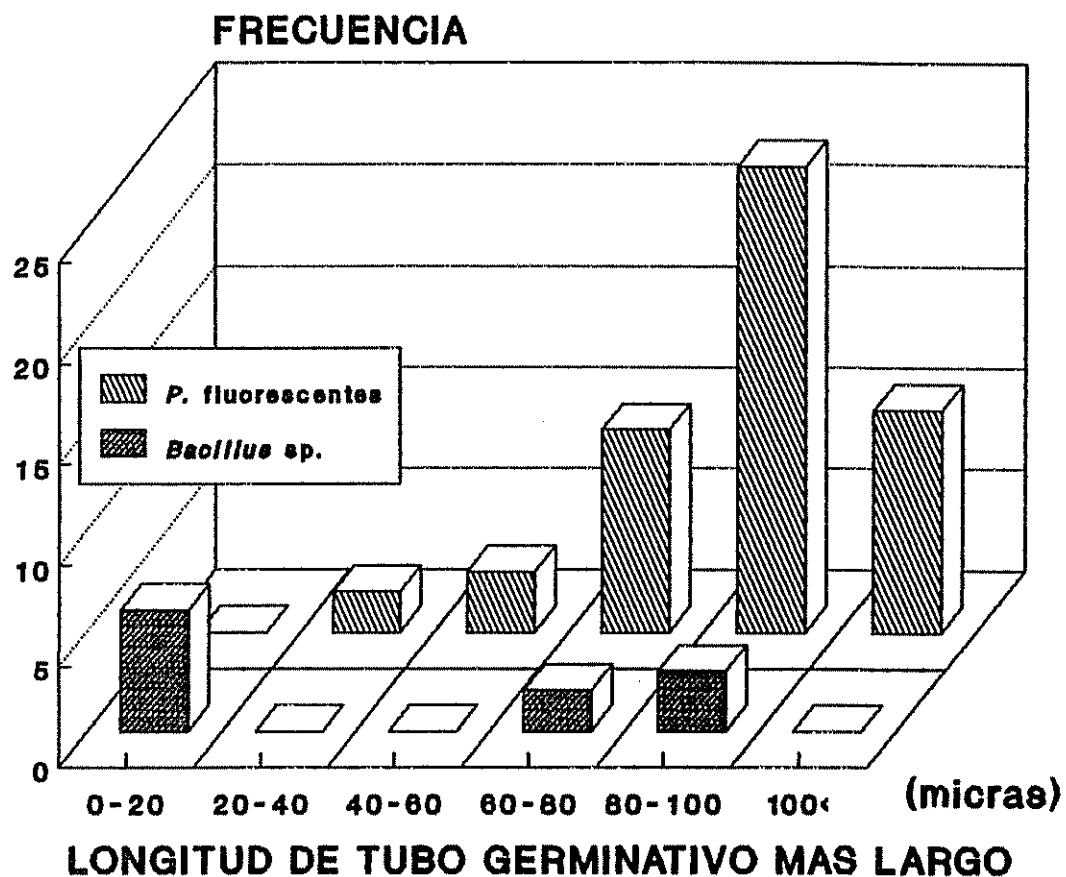


Figura 8. Inhibición del crecimiento de los tubos germinativos del hongo, debido a las cepas bacteriales (Testigo: 130.5 micras), aisladas el 17 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

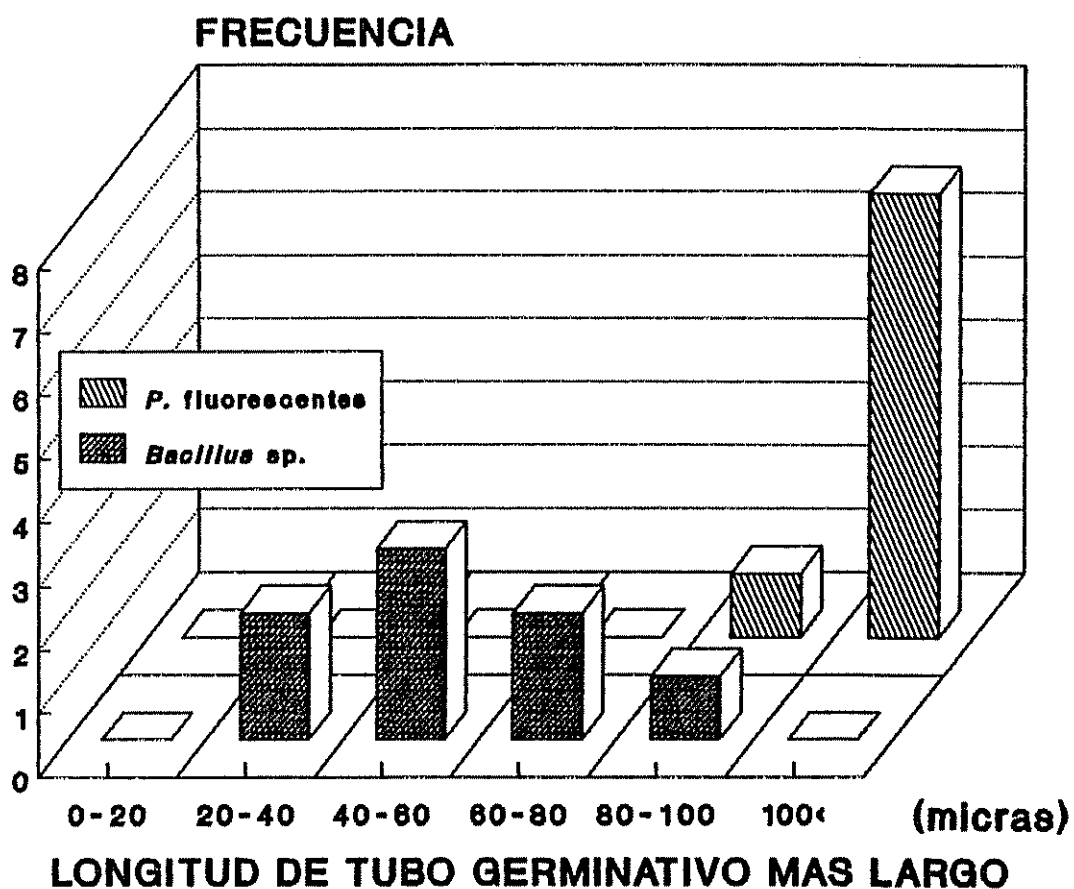


Figura 9. Inhibición o estímulo del crecimiento de los tubos germinativos del hongo, debido a las cepas bacteriales (Testigo: 97.0 micras), aisladas el 24 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

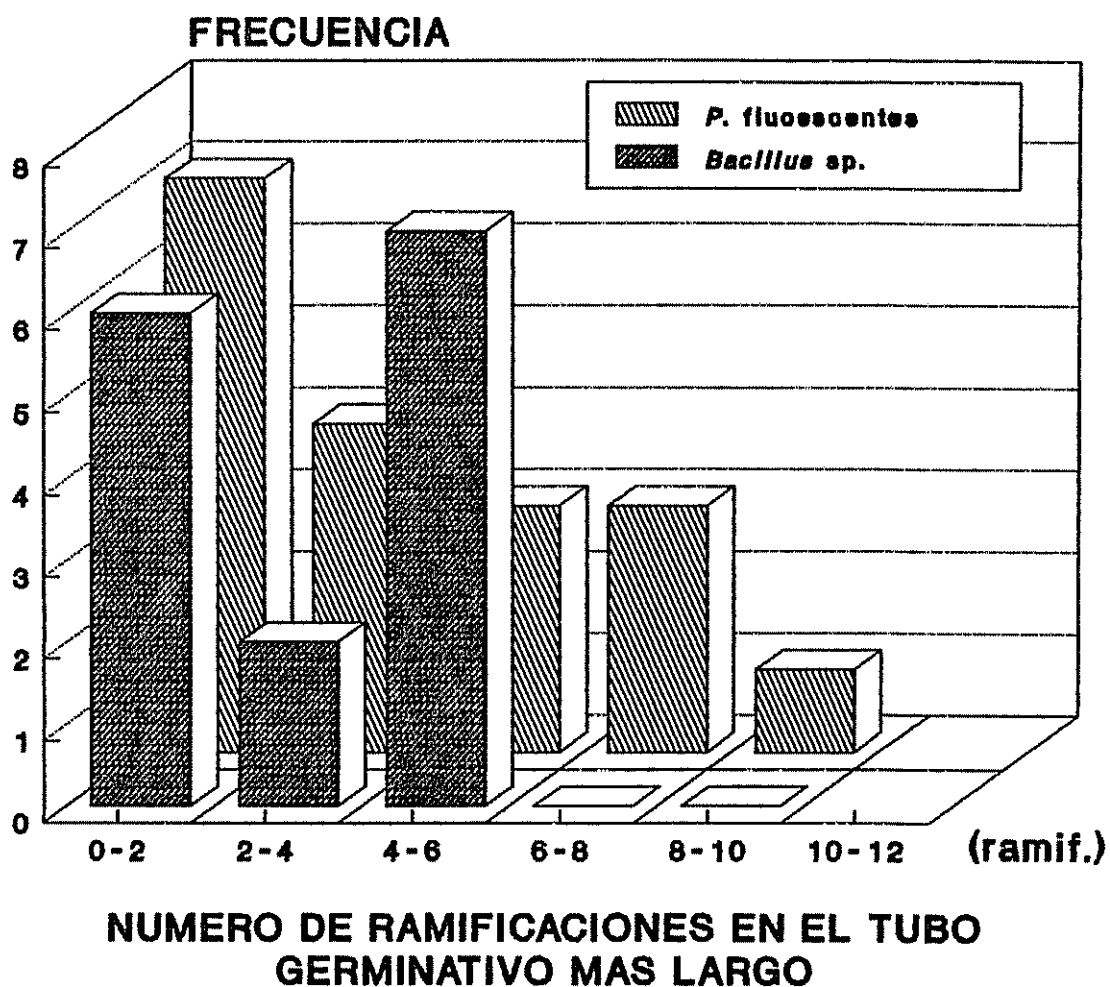


Figura 10. Inhibición o estímulo del número de ramificaciones en el tubo germinativo más largo del hongo, debido a las cepas bacteriales (Testigo: 5.0 ramif.), aisladas el 9 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

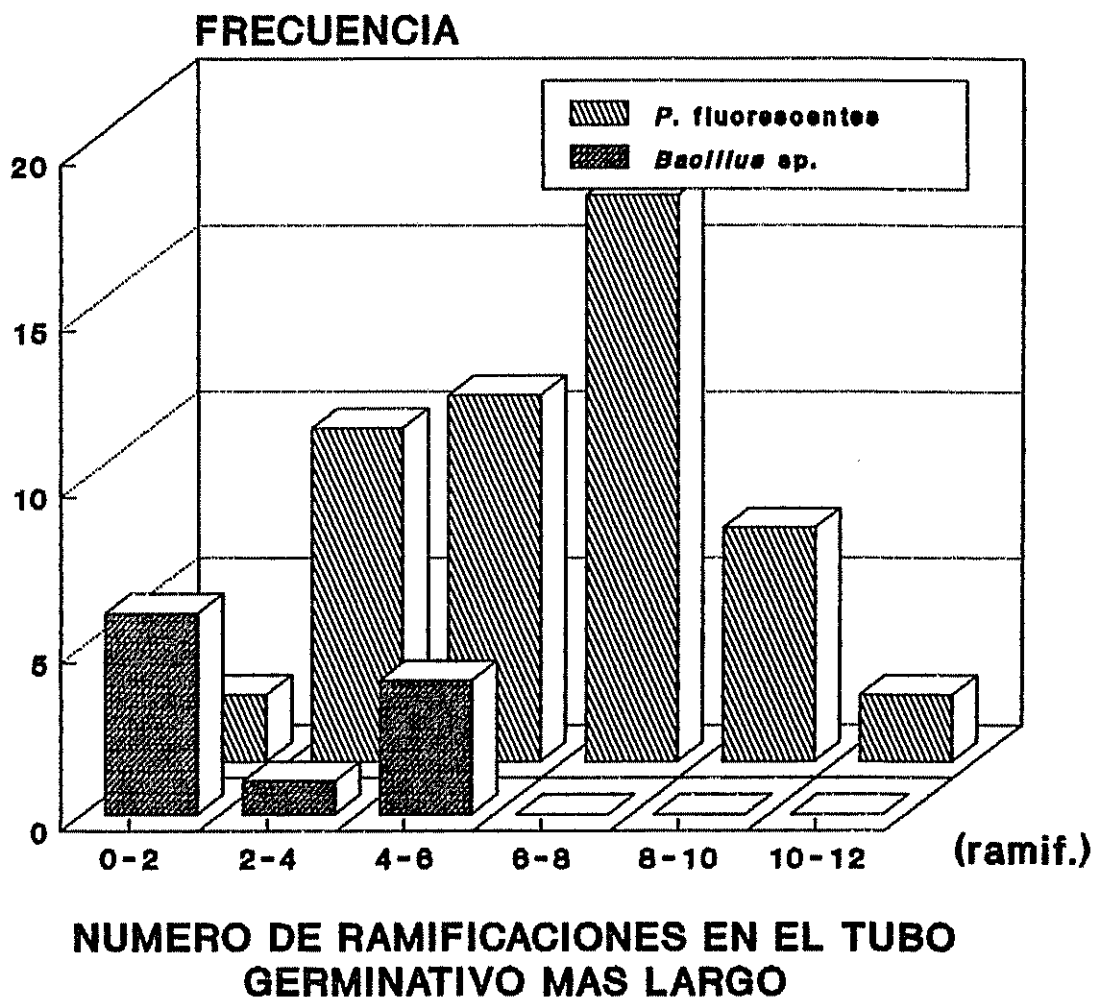


Figura 11. Inhibición o estímulo del número de ramificaciones en el tubo germinativo más largo del hongo, debido a las cepas bacteriales (Testigo: 5.9 ramif.), aisladas el 17 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

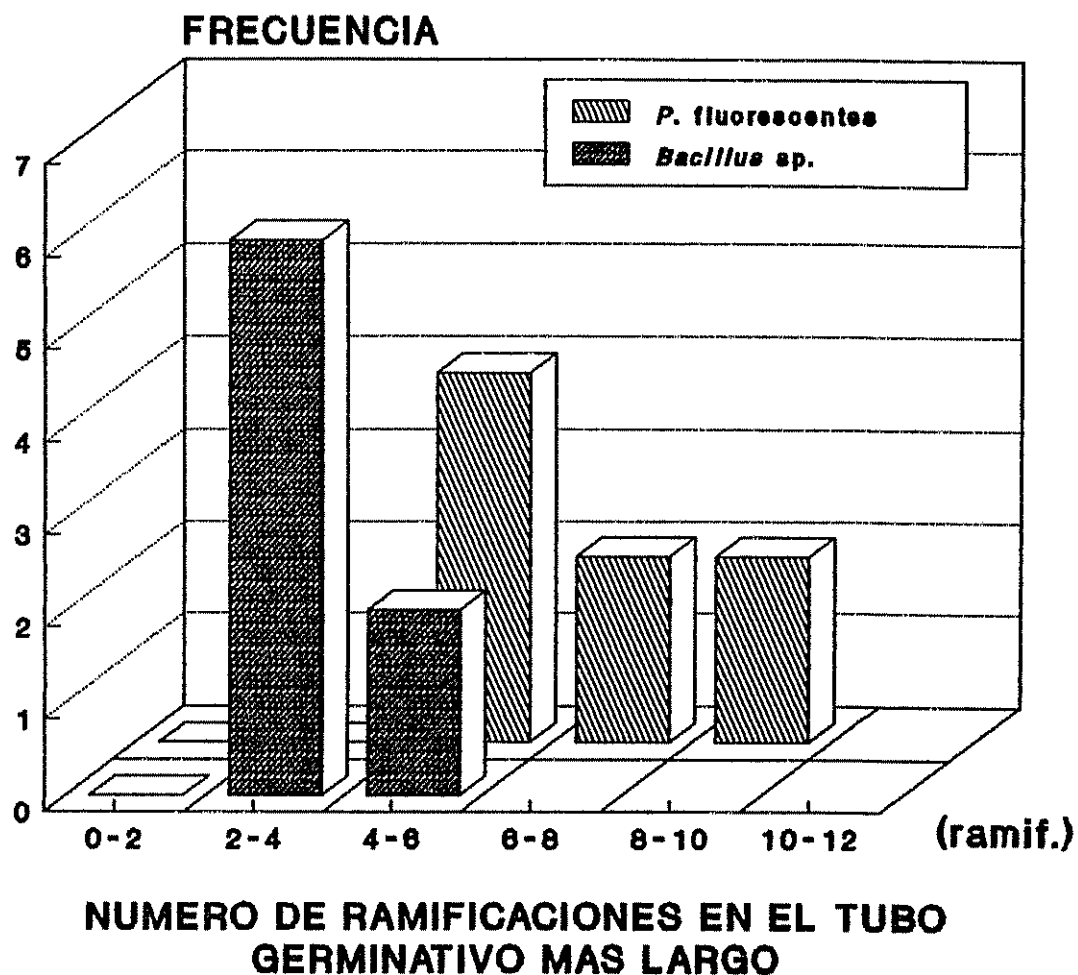


Figura 12. Inhibición o estímulo del número de ramificaciones en el tubo germinativo más largo del hongo, debido a las cepas bacteriales (Testigo: 4.2 ramif.), aisladas el 24 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

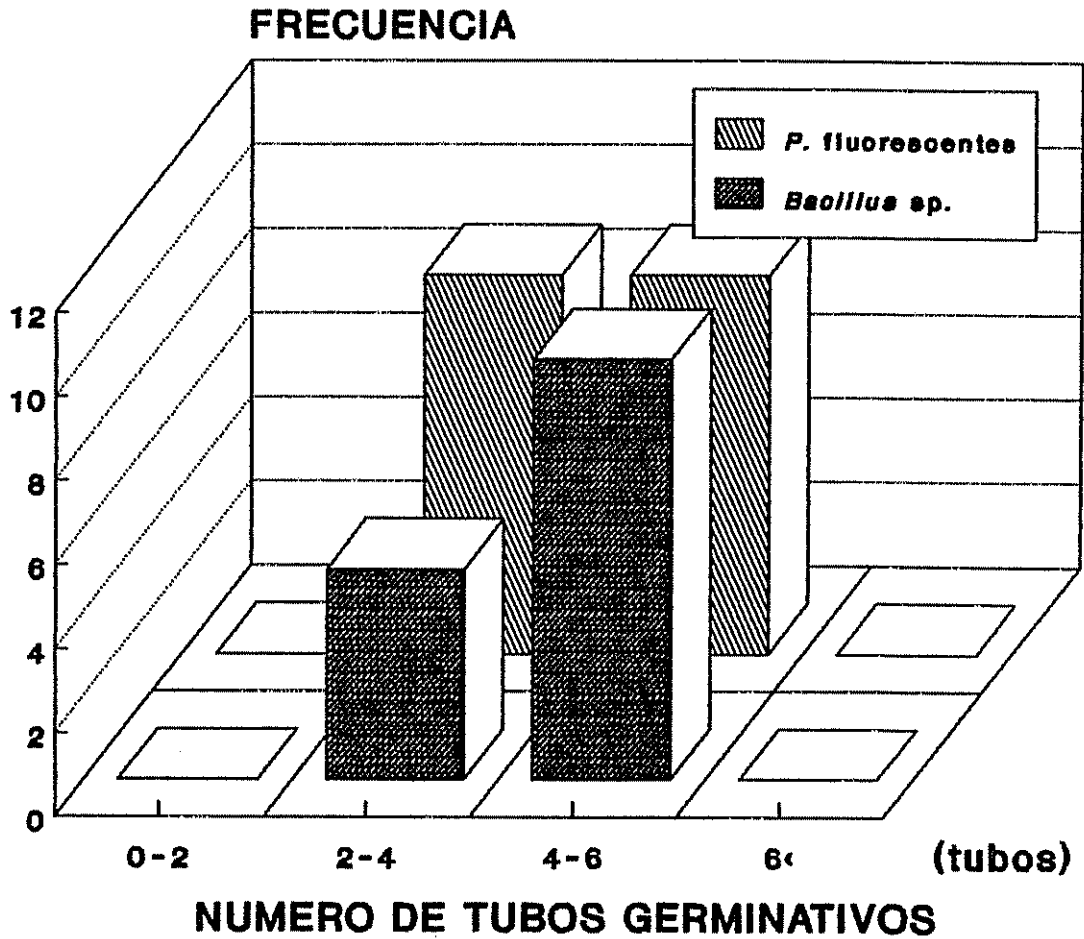


Figura 13. Número de tubos germinativos producidos por el hongo, debido a las cepas bacteriales (Testigo: 3.6 tubos) aisladas el 9 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

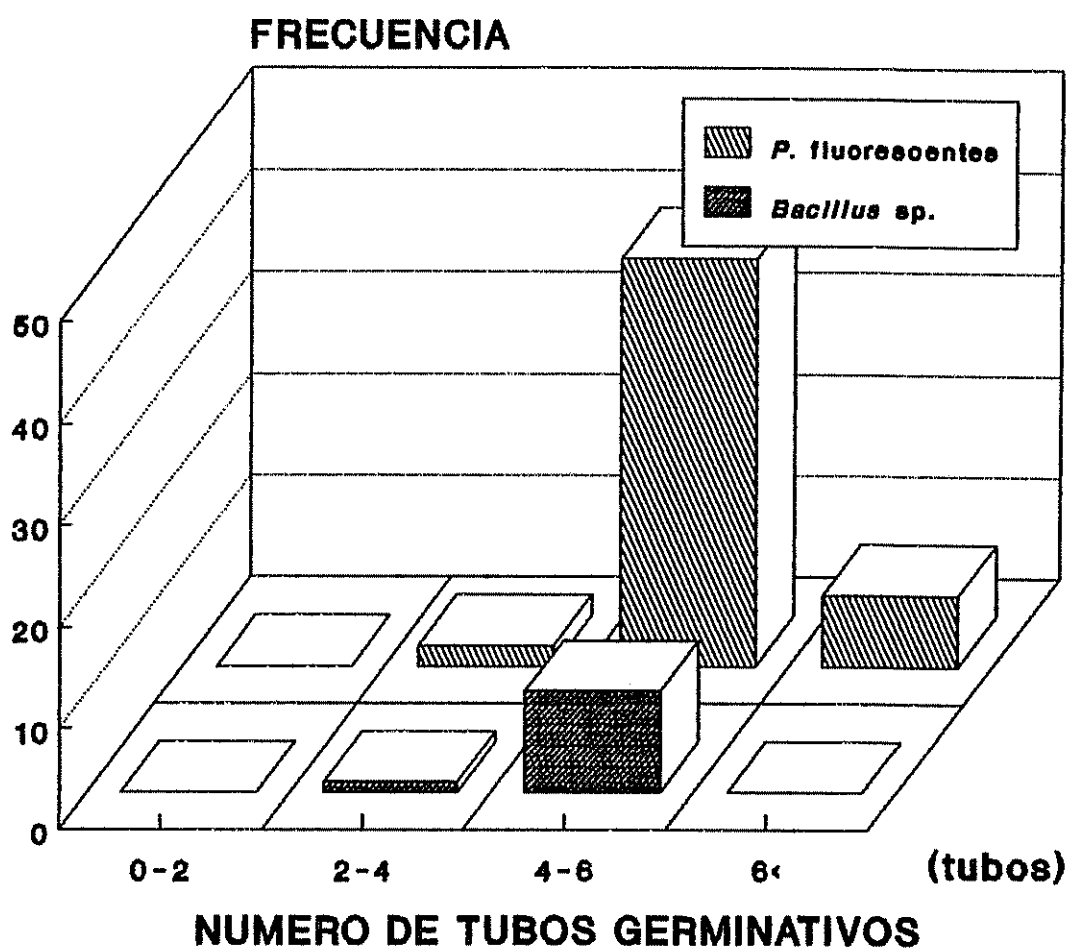


Figura 14. Número de tubos germinativos producidos por el hongo, debido a las cepas bacteriales (Testigo: 4.9 tubos) aisladas el 17 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

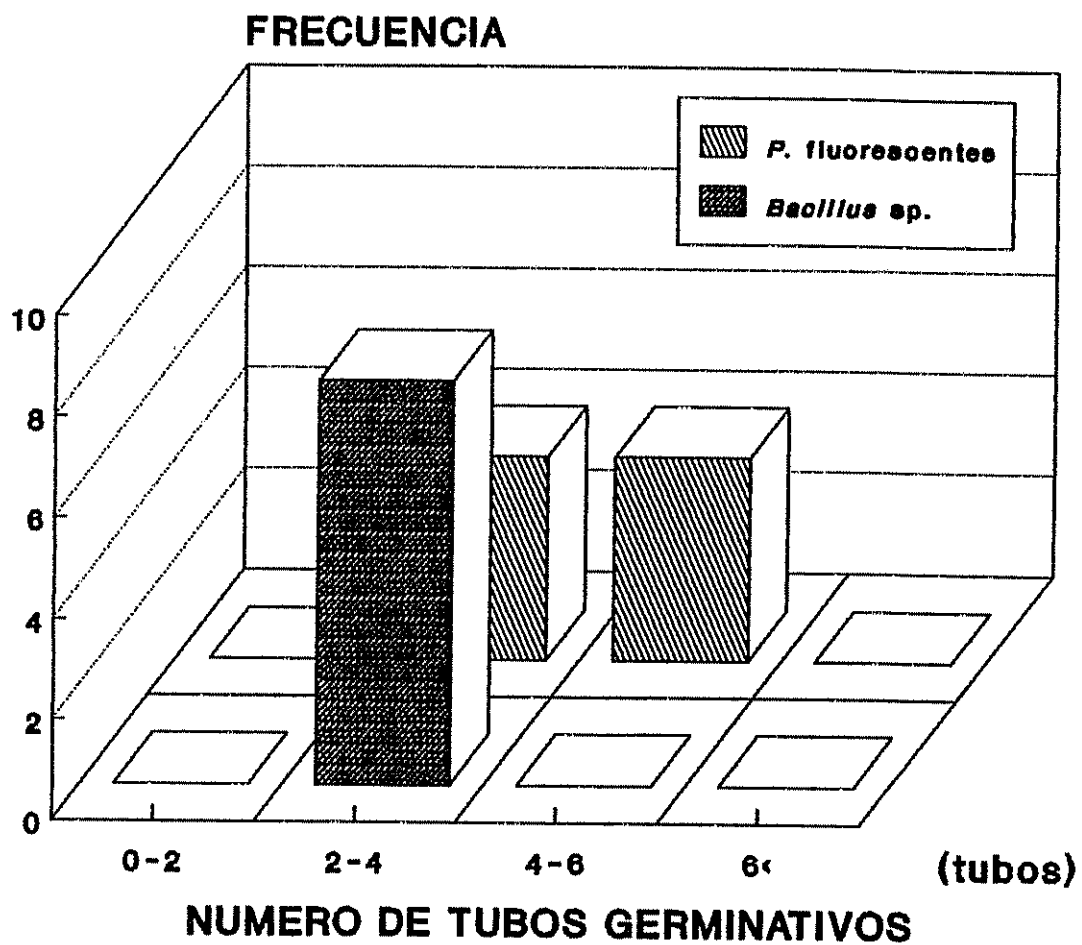


Figura 15 Número de tubos germinativos producidos por el hongo, debido a las cepas bacteriales (Testigo: 3.1 tubos) aisladas el 24 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

El coeficiente de correlación entre el número de tubos germinativos, longitud del tubo germinativo más largo y número de ramificaciones de este tubo germinativo fue calculado de acuerdo al género de bacterias y las fechas de aisladas (Anexos 10 y 11).

La Figura 16 presentan la correlación entre la longitud de tubo germinativo más largo y número de ramificaciones en el tubo germinativo del hongo en presencia de las cepas de *Bacillus sp.* y *Pseudomonas spp.* fluorescentes aisladas en las diferentes fechas. También se observa la distribución de las cepas de acuerdo a su antagonismo.

Con base en los Anexos 7, 8 y 9 se calculó el porcentaje de inhibición sobre la longitud de tubo germinativo debido a las cepas de bacterias en las diferentes fechas (Anexos 12, 13 y 14).

La acción de antagonismo de *Pseudomonas spp.* fluorescentes tiene una amplitud en la reducción del tubo germinativo del 7.2 a 93.4 %. En el caso de *Bacillus spp.* la amplitud varió de 10.6 a 93.2 %. Con siete cepas de *Pseudomonas spp.* fluorescentes se observaron tubos germinativos más largos que en el testigo; el incremento varió entre el 5.6 y 42.4 %.

Al analizar los Anexos 12, 13 y 14, se seleccionaron las cepas con mayor porcentaje de inhibición dentro de cada fuente de cepas en las diferentes fechas (Cuadros 14 y 15).

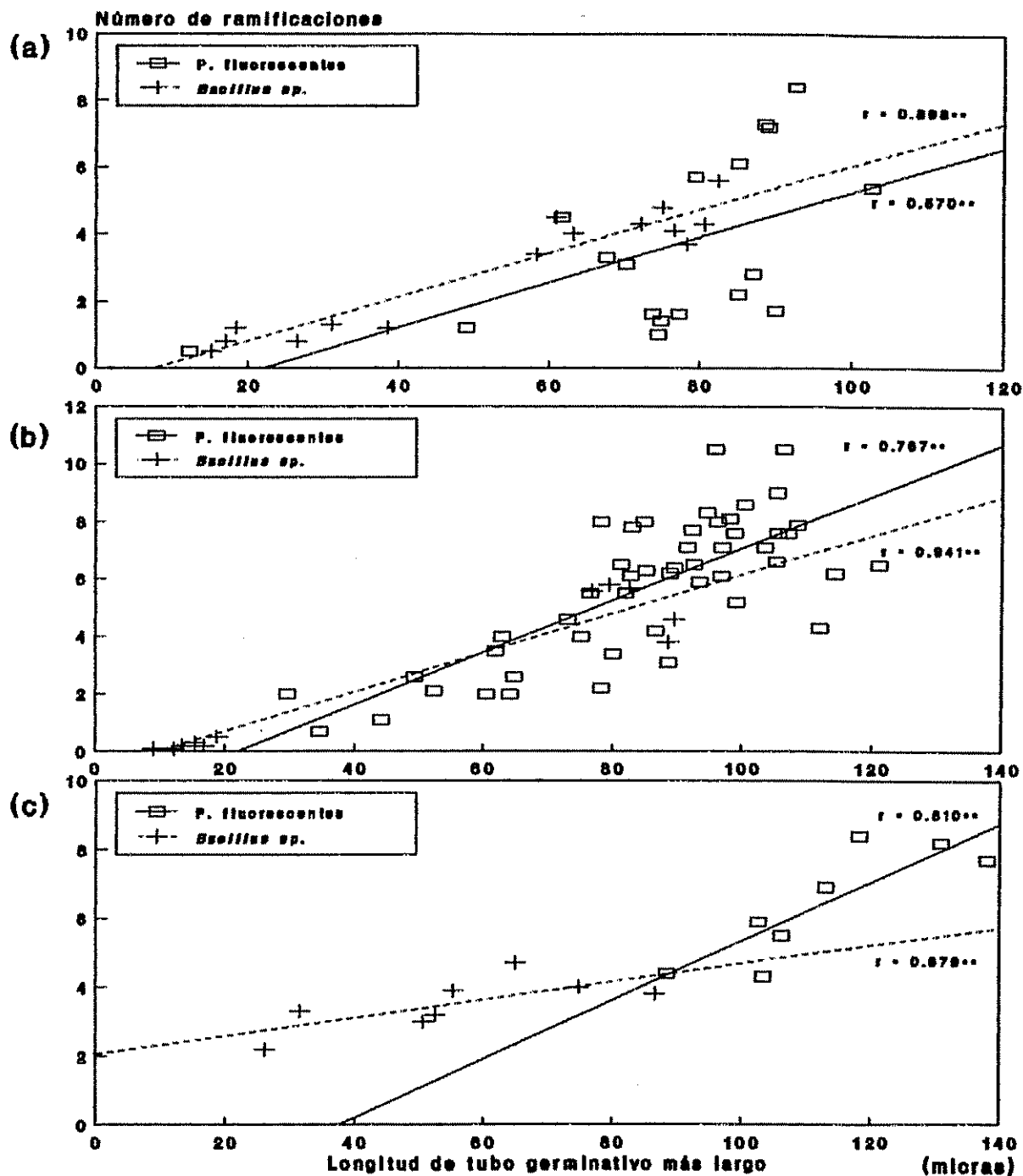


Figura 16. Correlación entre la longitud de tubo germinativo más largo y número de ramificaciones en el tubo germinativo del hongo, debido al género de bacterias, aisladas el 9 (a), 17 (b) y 24 (c) de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

Cuadro 14. Mejores cepas de *Pseudomonas* fluorescentes antagónicas a *A. solani*, de acuerdo a su tratamiento de origen y el porcentaje de inhibición de la longitud del tubo germinativo.

tratamiento de origen	Porcentaje de inhibición (%)		
	(9-1-92)	(17-1-92)	(24-1-92)
T1	A1 73.5	B6 52.6	
T2	A5 93.4	B14 73.5	
T3	A11 58.4	B22 36.4	
T4	A16 66.8	B41 42.5	
T5	A12 59.6	B28 66.1	
T6	A15 57.1	B39 16.8	
T7	A13 63.5	B33 40.0	C10 8.8
T8	A18 60.2	B49 77.3	

(): Fecha de recolección de las cepas bacteriales

Cuadro 15. Mejores cepas de *Bacillus* spp. antagónicas a *A. solani*, de acuerdo a su tratamiento de origen y el porcentaje de inhibición de la longitud del tubo germinativo.

Tratamiento de origen	Porcentaje de inhibición (%)		
	(9-1-92)	(17-1-92)	(24-1-92)
T1		B50 32.1	
T2	A19 68.5	B51 93.2	
T3		B53 90.7	C4 73.1
T4		B60 85.6	
T5		B57 36.7	C6 45.7
T6	A28 91.8		
T7	A26 65.9	B59 41.1	C7 47.6
T8	A33 56.5		

(): Fecha de recolección de las cepas bacteriales

Las mejores antagonistas de *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp., las cuales presentan más de 90 % en la inhibición de la longitud del tubo germinativo, se encuentra con la cepa A5 y B51, A28 y B53, respectivamente (Cuadro 14 y 15).

En la observación microscópica, se detectó un crecimiento anormal de los tubos germinativos y formación de los bulbos debido a las cepas de bacterias antagónicas.

Algunas de las cepas antagónicas a *A. solani* fueron quitinolíticas, confirmado por la presencia de sitios transparentes alrededor del crecimiento de bacterias en el medio agar nutriente+quitina (Anexo 15). Estas fueron aisladas de los tratamientos con quitina sólo o en mezcla, excepto una cepa A6 aislada en el tratamiento con fungicida sólo (Cuadro 16).

De las 109 cepas estudiadas, en ningún caso se observó al microscopio la lisis del tubo germinativo de *A. solani*.

Cuadro 16. Respuesta a la producción de quitinasa de cepas bacteriales antagónicas de acuerdo a su tratamiento de origen y a la formación de zonas transparentes en el medio agar nutriente+quitina. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

Tratamiento de origen	Transparencia en ANQ de			
	<i>P. fluorescentes</i>		<i>Bacillus spp.</i>	
	+	-	+	-
Testigo	0	9	0	1
Fungicida	1	7	0	9
Leche	0	4	0	7
Fung.+Leche	0	5	0	1
Quitina	0	9	2	1
Quit.+Fung.	0	1	6	0
Quit.+Leche	0	4	1	3
Quit.+fung.+Leche	1	1	0	1

4.4. Estudio de procedimientos para el aislamiento y detección de *Bacillus* spp..

El cuadro 17 presenta el número de unidades formadoras de colonias (cfu/cm²), estimado con respecto a los diferentes procedimientos y medios de cultivos en las distintas fuentes de inóculos en tiempos distintos. El número de colonias estimadas fue relativamente escasa en el período experimental.

Cuadro 17. Aislamiento de *Bacillus* sp. por el efecto de los procedimientos. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

Fuente de inóculo	Temp. (°C)	Medio ^a	Fecha de prueba		
			11-7-92	17-7-92	26-7-92
Testigo	80	AN	0	16.6	0
	41	AN	0	0	6.6
Quitina	80	AN	0	0	19.9
	80	AQ	0	0	0
	41	AN	0	49.8	13.3
	41	AQ	0	66.4	0
Leche	80	AN	99.5	16.6	0
	80	AL	0	0	0
	41	AN	33.2	66.4	0
	41	AL	0	0	0
Fungicida	80	AN	0	0	6.6
	80	AF	0	0	0
	41	AN	33.2	16.6	13.2
	41	AF	0	0	0

a: AN=agar nutriente, AQ=agar+quitina, AL=agar+leche, AF=agar+fungicida.

El análisis de varianza muestra una diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) entre los medios de cultivo, destacandose el AN con respecto a los otros medios (Cuadro 18 y 19.). Asi tambien no hubo diferencia significativo en los procedimientos (Cuadro 18).

Cuadro 18. Análisis de varianza del efecto de los diferentes procedimientos. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.
Bloque	2	6.155	3.077	3.45ns.
Trat.	3	2.856	0.952	1.07ns.
Error(a)	6	5.359	0.893	
Fecha	2	1.783	0.891	0.32ns.
Fecha*Trat.	6	18.223	3.037	1.09ns.
Error(b)	16	44.513	2.782	
Medio	1	28.227	28.227	14.11**
Temp.	1	2.479	2.479	1.24ns.
Temp.*Medio	1	0.168	0.168	0.08ns.
Trat.*Medio	2	3.466	1.733	0.87ns.
Trat.*Temp.	3	2.923	0.974	0.49ns.
Trat.*Temp.*Medio	2	1.795	0.897	0.45ns.
Error(c)	20	40.017	2.001	
Fecha*Medio	2	0.153	0.076	0.04ns.
Fecha*Temp.	2	3.343	1.671	0.92ns.
Error(d)	56	102.067	1.823	
Total	125			

** : nivel de significancia al 1 %
 ns.: no significativo

Cuadro 19. Efecto de los medios para aislar *Bacillus* spp.. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

Medios	No. obs. ^a	Promedio(cfu/cm ²)	D.E. ^b
AN	72	16.31	39.33
AQ,AL,AF	54	3.69	27.09

a: número de observaciones.
 b: desviación estandar.

5. DISCUSION GENERAL

5.1. Efecto de los tratamientos sobre la enfermedad y la población de bacterias.

Con base en los resultados obtenidos de este experimento de campo, es evidente que el clorotalonil tiene un efecto de reducción del grado de severidad de tizón temprano, ya que al analizar los datos (Cuadros 4 Y 5), se encontró una diferencia altamente significativa ($p < 0.01$) en el efecto del fungicida. El clorotalonil es usado en el control del tizón temprano. Su acción sobre las esporas de *A. solani* fue reportada por Turner et al (1964; citado por Lukens y Ou, 1976); el producto inhibe la formación de apresorios en las esporas.

La aplicación de leche no presenta ningún efecto positivo, más bien muestra un incremento del tizón temprano, de acuerdo a los resultados del área debajo de la curva de progreso de la enfermedad (Cuadro 5). En los países centroamericanos, especialmente en El Salvador y Costa Rica, algunos agricultores la usan para evitar la infección de virus transmitidos por vectores. En Japón, también se usa para evitar la dispersión en el invernadero de esporas volátiles como *Botrytis sp.* y *Cladosporium sp.*.

La aplicación de quitina no muestra ningun efecto con respecto a la severidad de la enfermedad, ya que no se presenta diferencia significativa en el análisis de varianza para la tasa de infección aparente (Cuadro 4) y el área

debajo de la curva de progreso de la enfermedad (cuadro 5). Este resultado difiere del encontrado por Ploper y Backman (1991), los cuales reportaron que el tizón temprano fue reducido con la formulación de polímeros insolubles como quitina, quitosan y celulosa, siendo la quitina la que presentó la menor severidad.

Después de la primera aplicación, se observó fitotoxicidad en las plantas asperjadas en la combinación de quitina con fungicida sólo y con leche. Para la preparación de todas las formulaciones de los tratamientos se usó una mezcla de aceite de soya con Tween 20 como surfactante. Backeman (1992, comunicación personal) considera que el uso de aceite de soya puede mejorar el efecto de protección y aumentar el rendimiento. El clorotalonil se ha reportado como fitotóxico al usarse con algunos coadyuvantes (Jimenez y Freddy, 1982). Sin embargo, una mezcla de clorotalonil con aceite de soya y Tween 20 no presentó fitotoxicidad. Al corregir el pH a más de 8 a partir de la segunda aplicación, no volvió a aparecer el sintoma. La verdadera causa de la fitotoxicidad no fue estudiada.

El efecto de fitotoxicidad, con daño visible o no, puede explicar la interacción significativa en la disminución del rendimiento de frutos de tomate cuando se aplica quitina y fungicida. Además, se encuentra otra interacción entre quitina y fungicida con respecto a la población de bacterias (Cuadro 13). Por consiguiente, la aplicación de quitina con

fungicida y aceite de soya, también afecta al ambiente microbial con una disminución en la población de bacterias.

Durante el período experimental, los cambios en la población de bacterias, *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. fluorescentes no se debieron a la aplicación de las enmiendas, sino al tiempo de muestreo (Cuadro 13 y Anexos 5 y 6). Por lo tanto, se puede concluir que la población de *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. fluorescentes, fue afectada principalmente por los factores ambientales. Observando la Figura 6, se encuentra alguna similitud en el comportamiento de las curvas entre la población total de bacterias, *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. fluorescentes. El comportamiento de las curvas corresponde a la fluctuación de la humedad relativa, es decir, la población de bacterias es susceptible al desecamiento. Esto coincide a lo informado por Knudsen (1984; citado por Spurr, Jr. y Knudsen, 1985) quien afirma que la población de bacterias fue extremadamente sensitiva a la humedad de las hojas, ya que el período de secamiento (3-4 hr.) causó una disminución muy grande y rápida en el número de bacterias. Y también se observa que la población de *Bacillus* spp. es menos variable que la de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, confirmando la afirmación de Knudsen y Spurr, Jr. (1987), que la supervivencia de bacterias gram-positivas formadores de esporas (*Bacillus* spp.), fue menos variable que la de gram-negativas no formadores de esporas.

Las *Pseudomonas* spp. fluorescentes son más afectadas que *Bacillus* sp. por la exposición al sol. Sztejnberg y Blakeman

(1973) informaron que las bacterias aumentaron en una gota de agua en la superficie de hojas y disminuyeron rápidamente en un corto tiempo de exposición a la luz ultravioleta.

5.2. Rendimientos y evaluación económica.

En la aplicación de quitina y fungicida se encuentra una interacción negativa altamente significativa con respecto al rendimiento de la calidad de fruto de la clase 2, rendimiento total y al porcentaje de frutos dañados en la producción total (Cuadro 9, 10 y 11), una interacción significativa con respecto al rendimiento de la clase 1 (Cuadro 8). Este efecto sobre la capacidad fisiológica de producción de la planta, además de la pérdida de resistencia general, podría estar relacionado con la fitotoxicidad observada en la mezcla quitina+ fungicida+ aceite de soya. En estas condiciones la aplicación de quitina va en detrimento del rendimiento.

Con respecto al análisis económico, es evidente que el costo para la preparación de quitina fue muy alto, comparado con los otros productos. Sin embargo, la metodología utilizada para la preparación de quitina está en una etapa experimental. Por lo tanto, es posible disminuir el costo para la preparación de quitina a medida que se mejora la metodología. Backman (1992; comunicación personal) dice que el uso de quitina sería económico, ya que esos materiales son abundantes en Los Estados Unidos y se busca una manera de utilizarlos.

5.3. Selección *in vitro* de bacterias antagónicas a *A. solani*.

Las cepas de bacterias antagónicas a *A. solani* inhiben *in vitro* en general el crecimiento de los tubos germinativos y número de ramificaciones de éstos, aunque hay una gran variación entre cepas en el rango de antagonismo (Anexos 7, 8 y 9). Las cepas evaluadas del género *Bacillus* tienden a ser las más antagonistas. La mayoría de *Pseudomonas* no son tan efectivas en la inhibición del crecimiento del hongo (Figura 7, 8 y 9), sin embargo, la cepa A5 presenta un alto antagonismo. Algunas de las cepas de *Pseudomonas* spp. fluorescentes presentaron estímulo sobre el crecimiento de tubos germinativos. La posible causa de este estímulo se han reportado por varias personas quienes afirmaron que algunos sideroforos producido por *Pseudomonas* spp. fluorescentes estimularon el crecimiento de los hongos como *Ustilago sphaerogena*, *Aspergillus* sp. y *Colletotrichum muscae* (Emery, 1971., Wiebe y Winkelmann, 1975., McGraken y Swinburne, 1979.; citado por Misaghi, Stowell, Grogan y Spearman, 1982).

El crecimiento de tubos germinativos y el número de ramificaciones en estos tubos fueron inhibidos simultáneamente por las bacterias y se encontró una correlación significativa entre la longitud del tubo germinativo más largo y el número de ramificaciones del mismo (Anexos 10 y 11). Las cepas de bacterias consideradas como antagonistas, sin embargo, no reducen el número de tubos germinativos. Algunas de ellas, más bien, lo aumentan significativamente. Esto no coincide a lo reportado por

Fravel y Spurr, Jr. (1977) quienes observaron que en general el número de tubos germinativos, longitud de tubo germinativo más largo y número de ramificaciones de estos fueron inhibidos simultáneamente. Por lo tanto existe la posibilidad de que el estímulo del número de tubos germinativos se deba a algunas sustancias producidas por las bacterias, aunque esas sustancias inhiben el crecimiento de tubos germinativos y el número de ramificaciones (por ejemplo las cepas A5 y A28, etc.).

En la observación microscópica, se encontró un crecimiento anormal de los tubos germinativos, los cuales se dilataban y formaban bulbos. Observaciones similares fueron hechas por Vasudeva y Chakravarthi (1951) en un filtrado del cultivo de una cepa de *Bacillus subtilis* que fue antagónico a *A. solani*. La bacteria produjo malformación de los tubos germinativos con un desarrollo posterior de bulbos. Este filtrado mostró una acción fungistática y fungicida.

La cepa A5 (*Pseudomonas* sp. fluorescente aislada del tratamiento de fungicida) y las cepa B51 y A28 (*Bacillus* spp. provenientes del filoplano tratado con fungicida y con fungicida y quitina, respectivamente) fueron las más efectivas en el antagonismo (Cuadro 14 y 15).

De acuerdo a las observaciones microscópicas, no se detectó la producción de lisis en los tubos germinativos de las conidias de *A. solani* estudiadas. Estudios previos han reportado que la producción de lisis, debido a la interacción entre bacteria y hongo, es una probable causa de inhibición

del hongo (Baker y Cook, 1974; Blakeman y Fraser, 1971; Fokkema y Lorbeer, 1974; Morgan, 1963). Sin embargo, Fravel y Spurr, Jr. (1977) afirman que diferentes mecanismos fueron involucrados en la supresión del crecimiento del hongo; sustancias tóxicas producidas por bacterias tienen una mayor influencia que la producción de lisis por enzimas. Esta última afirmación coincide con el resultado obtenido en este estudio.

Algunas cepas que presentan antagonismo, a su vez producen quitinasa, confirmado por la presencia de zonas transparentes en el medio agar nutriente con quitina (Cuadro 16). Esto quiere decir que la bacteria, además de la producción de toxinas, también es capaz de degradar la pared celular del hongo que contiene quitina. Por ejemplo, la cepa A5 presenta un alto antagonismo, sin embargo no produce quitinasa, es decir, la cepa produjo otra sustancia que afectó a los hongos presentes. Por su parte, la cepa A28 es capaz de producir quitinasa y otras sustancias tóxicas. Por lo tanto, la quitinasa y las sustancias producidas por bacterias juegan un papel fundamental en inhibir el crecimiento de tubos germinativos de *A. solani*.

Se encontró un 1:20 en la relación entre las cepas quitinolíticas y no quitinolíticas de *Pseudomonas* spp. fluorescentes estudiadas, en cambio, en las cepas de *Bacillus* spp., esta fue 1:2.6 (Cuadro 16). Esto quiere decir que se puede aislar más cepas quitinolíticas en la población de *Bacillus* spp. que en la de *Pseudomonas* spp. fluorescentes.

La mayoría de las cepas caracterizadas como quitinolíticas fueron aisladas de las plantas asperjadas con la sola quitina o en mezcla con leche o fungicida (Cuadro 16). Se puede considerar que la aplicación de quitina aunque no aumenta la población de bacterias si podría cambiarla cualitativamente, dando condiciones para aumentar los microorganismos quitinolíticos. Kokalis-Burelle et al (1991) reportaron que la aplicación de quitina incrementó los microorganismos quitinolíticos de menos de 1 % a más de 40 % en la población microbial total.

En el Anexo 15 se observa que el grado de antagonismo de las cepas quitinolíticas de acuerdo al crecimiento de los tubos germinativos no fue muy alto en cinco de ellas, pero sí en A27, A28, A29, A30, A31 Y A32. Esto quiere decir que existe la posibilidad de que la actividad antagónica se deba principalmente a las sustancias tóxicas producidas por las bacterias y no a la acción de la quitinasa. La ausencia de actividad antagónica en cepas quitinolíticas pudo deberse al corto tiempo de exposición en la prueba *in vitro*. Este factor de exposición debería modificarse en experimentaciones posteriores, para conocer la verdadera capacidad de antagonismo de las cepas quitinolíticas.

La diversidad de la población de *Pseudomonas spp.* fluorescentes es tan amplia que tiene segmentos de la población que pueden causar inhibición del tubo germinativo de *A. solani* hasta en un 93.4 %. Sin embargo, otro segmento puede estimular el crecimiento de dicho tubo. La causa de

estímulo del crecimiento de hongos fue reportado por varios investigadores, quienes encontraron que los sideroforos producidos por *Pseudomonas* spp. fluorescentes fueron estimulantes del crecimiento a algunos hongos como *Ustilago sphaerogena*, *Aspergillus* sp. y *Colletotrichum musae*. En el caso de *Bacillus* spp. se obtuvo un segmento de la población que presentó un efecto de antagonismo similar al de *Pseudomonas* spp. fluorescentes.

Con base en los resultados obtenidos en este estudio se dispone por lo menos de 15 cepas de alta capacidad antagónica *in vitro* que es importante estudiar en su comportamiento bajo condiciones de campo.

La cepa quitinolítica A28 y la no quitinolítica B51, además de su alto antagonismo, tienen como característica muy apropiada de los *Bacillus* spp. para ser futuros agentes de control biológico, la producción de endosporas, que son cuerpos resistentes a condiciones desfavorables de campo.

5.4. Estudio de procedimientos para el aislamiento y detección de *Bacillus* spp..

No se encuentra diferencias significativas en los dos procedimientos utilizados (Temp.), según los datos obtenidos en el Cuadro 18. Sin embargo, se observó visualmente que algunos de las colonias aparecidas en el medio de cultivo a la temperatura de 41 °C no fueron de *Bacillus* sp.. La posible causa para el desarrollo de estas colonias fue la fluctuación

de temperaturas en la incubadora. Este inconveniente aumenta el tiempo que se necesita para identificar al *Bacillus* sp. por la presencia de su endospora.

En cambio, con el otro procedimiento a 80 °C, las colonias aparecidas en el medio fueron de *Bacillus* sp., por lo tanto es sumamente fácil de contar el número y aislarlo.

La diferencia significativa entre medios se debió a la menos disponibilidad de nutrimentos en agar-quitina, agar-leche y agar-fungiciada con relación al medio de agar nutriente.

Bajo las condiciones del experimento no se observaron *Bacillus* spp. proteolíticas o con habilidad para descomponer clorotalonil.

Con el medio AQ se logró aislar las cepas quitinolíticas de *Bacillus* sp., las cuales también crecen en AN. Se observa que las cepas quitinolíticas producen una zona visible de desaparición de quitina alrededor del crecimiento de la colonia en el medio de cultivo a las 10 días.

El medio con quitina se usa como medio selectivo para aislar Actinomycetes (Lingapa y Lockwood, 1962), y también funciona bien para aislar las cepas quitinolíticas de *Bacillus* sp.. Backman (1991; comunicación personal) usó el medio agar con quitina y agar nutriente con quitina para el conteo y aislamiento de las cepas quitinolíticas de *Bacillus* sp..

6. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos de esta investigación se presentan las siguientes conclusiones.

1. La aplicación de quitina sola no presenta disminución del tizón temprano, ya que no aumentó la población microbiana.
2. La mezcla de quitina, aceite de soya y fungicida presentó un efecto negativo para el rendimiento de frutos de tomate y la población de bacterias.
3. La aplicación de leche no afectó el rendimiento y funcionó negativamente en la supresión de la enfermedad.
4. Desde el punto de vista económico, la aplicación de fungicida fue el mejor de los tratamientos.
5. El costo de preparación de quitina es alto, comparándolo con el de otros productos.
6. Durante el período del experimento de campo, no hubo diferencias por tratamiento en la población de bacterias, *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. fluorescentes.

7. La población de bacterias, *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. fluorescentes fueron aparentemente afectadas por cambios bruscos del clima, en especial la humedad relativa y radiación solar.

8. La variación en el tiempo de la población de *Pseudomonas* spp. fluorescentes fue mayor que la de *Bacillus* spp. en el período experimental.

9. En el experimento de antagonismo *in vitro*, las cepas de bacterias antagónicas a *A. solani* presentaron una amplia variación en el grado de antagonismo.

10. El antagonismo de las cepas bacteriales se manifiesta en la reducción simultánea del crecimiento de tubos germinativos y número de ramificaciones de estos. Sin embargo, no afecta el número de tubos germinativos.

11. Las cepas más antagónicas de *Bacillus* spp., con respecto a inhibición del crecimiento de los tubos germinativos, son más numerosas y menos variables en su antagonismo que las de *Pseudomonas* spp. fluorescentes.

12. Algunas de las cepas antagónicas presentan la característica quitinolítica.

13. La relación entre cepas quitinolíticas: no quitinolíticas para *Pseudomonas* spp. fluorescentes 1:20
para *Bacillus* spp. 1:2.6
14. La mayoría de las cepas quitinolíticas se aislaron en el tratamiento de quitina sola o combinada con otros productos.
15. La actividad antagónica de la quitinasa no pudo evaluarse. Por lo tanto, la actividad de inhibición se debió a otras sustancias producidas por bacterias.
16. Algunas de las cepas de *Pseudomonas* spp. fluorescentes estimularon el crecimiento de tubos germinativos.
17. El procedimiento con temperatura de 80 °C por 10 min. es el más específico para la detección de *Bacillus* spp.

7. BIBLIOGRAFIA

- AGRIOS, G.N. 1986. Fitopatología. Mexico, D.F. Editorial Limusa. 754 p.
- ALAS, G.J. 1989. Efecto del calcio y fosforo sobre la severidad del tizón temprano (*Alternaria solani*) en el cultivo del tomate. Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., CATIE. 107 p.
- ANDREWS, J.H. 1981. Effects of pesticides on non-target microorganisms on leaves. In Microbial ecology of the phylloplane. J.P.Blakeman (eds). London, Academic Press. 640 p.
- ANDREWS, J.H.; KENERLEY, C.M. 1978. The effects of a pesticide program on non-target epiphytic microbial population of apple leaves. Can. J. Microbiology. 24: 1058-1078.
- BAKER, C.J.; STAVELY, J.R.; MOCK, N. 1985. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. Plant Disease. 69: 770-772.
- BAKER, C.J.; THOMAS, C.A.; SASSER, M.; MacFALL, J. 1983. Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. Phytopathology 73: 1148-1152.
- BAKER, K.F.; COOK, R.J. 1974. Biological control of plant pathogens. W.H. Freeman and Co., San Francisco. California. 433 p.
- BEDI, P.S.; DHIMAN, J.S. 1980. Ontagenic predisposition of tomato foliage to early blight caused by *Alternaria solani*. Indian Phytopathology 33(1): 83-86.
- BLAKEMAN, J.P.; FOKKEMA, N.J. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. Ann. Rev. Phytopathology. 20: 167-192.
- BLAKEMAN, J.P.; FRASER, A.K. 1974. Inhibition of *Botrytis cinerea* spores by bacteria on the surface of chrysanthemum leaves. Physiological plant Pathology. 1: 45-54.
- CARTER, M.V. 1971. Biological control of *Eutypa armeniaca*. Australian Journal of Experimental Agriculture and Animal Husbandry. 11: 687-692.

- CARTER, M.V.; PRICE, T.V. 1975. Biological control of *Eutypa armeniaca*. II. Studies on the interaction between *E. armeniaca* and *Fusarium lateritium* and their relative sensitivities to Benzimidazole chemicals. Australian Journal of Agricultural Research. 25: 105-119.
- CARTER, M.V.; PRICE, T.V. 1975. Biological control of *Eutypa armeniaca*. III. A comparison of chemical, biological and integrated control. Australian Journal of Agricultural Research. 26: 537-543.
- CATIE. 1986. Inventario de plagas y enfermedades de Costa Rica. CATIE (C.R.) Serie Técnica. Informe técnico no.80 25 p.
- CATIE. 1990. Guía para el manejo integrado de plagas del cultivo de tomate. Turrialba, C.R. 138 p.
- CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA. 1990. Guía para el manejo integrado de plagas del cultivo de tomate. CATIE. Proyecto regional MIP. Turrialba, C.R. (Serie técnica. Informe Técnico/CATIE; no. 151). 28 p.
- CHASE, A.R.; POOLE, R.T. 1986. Efecto of fertilizer rate on severity of Alternaria leaf spot of three plants in the araliaceae. Plant Disease. 70(12): 1144-1145.
- COLLINS, C.H. 1969. Métodos microbiológicos. Zaragoza, España, ACRIBIA. 410 p.
- COOK, R.J.; BAKER, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. 539 p.
- DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. 1985. Basic plant pathology methods. Boca Raton, FL. CRC press. 355 p.
- DICKINSON, C.H. 1973. Effects of ethirimol and zineb on phylloplane microflora of barley. Transactions of the British Mycological Society. 60: 423-431.
- DICKINSON, C.H.; WALLACE, B. 1976. Effects of late applications of foliar fungicides on activity of microorganisms on winter wheat flag leaves. Trans. Br. Mycol. Soc. 76: 103-112.
- EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. 1971. Fungi toxic spectrum of benzimidazole compounds. Phytopathology. 61: 42-44.
- ETCHELLS, J.L.; COSTELOW, R.N.; BELL, T.A.; RUTHERFORD, H.A. 1961. Influencia of gamma radiation on the microflora of cucumber fruits and blossoms. Applied Microbiology. 9: 145-149.

- FOKKEMA, N.J. 1973. The role of saprophytic fungi in antagonism against *Drechslera sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*) on agar plates and on rye leaves with pollen. *Physiological Plant Pathology* 3: 195-205.
- FOKKEMA, N.J. 1981. Fungal leaf saprophytes, beneficial or detrimental? In *Microbial ecology of the phylloplane*. Academic Press, London. 640 p.
- FOKKEMA, N.J.; LORBEER, J.W. 1974. Interactions between *Alternaria porri* and the saprophytic microflora of onion leaves. *Phytopathology*. 64: 1128-1133.
- FOSTER, E.D.; NELSON, F.E.; SPECK, M.C.; DOETSCH, R.N.; OLSON, J.C. 1965. *Microbiología de leche*. Ed. Centro Regional de Ayuda Técnica. Agencia para el desarrollo internacional (A.I.D.), Mexico. 490 p.
- FRAVEL, D.R.; SPURR, H.W.Jr. 1977. Biocontrol of tobacco brown-spot disease by *Bacillus cereus* subsp *mycoides* in controlled environment. *Phytopathology* 67: 930-932.
- FRENCH, E.R.; HEBERT, T.T. 1982. *Metodos de investigación fitopatológica*. Ed. Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura (IICA). San José, Costa Rica. 289 p.
- GONZALES, L.C. 1981. *Introducción a la fitopatología*. Editorial Limusa. p 29-32.
- GORDON, R.E.; HAYNES, W.C.; HOR-NAY PANG, C. 1973. The genus *Bacillus*. *Agriculture Handbook No. 427*. Ed. Agricultural Research Service. United States Department of Agriculture. 283 p.
- HENIS, H.; CHET, I. 1975. Microbiological control of plant pathogens. *Avances in Applied Microbiology*. 19: 85-111.
- HISLOP, E.C. 1976. Some effects of fungicides and other agrochemicals on the microbiology of the aerial surfaces of plants. in *Microbiology of aerial plant surfaces*. DEKINSON, C.H.; PREECE, T.F. Ed. Academic Press. London. 669 p.
- HISLOP, E.C.; COX, T.W. 1969. Effects of captan on the non-parasitic microflora of apple leaves. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 52: 223-235.
- HOWELL, C.R.; STIPANOVIC, R.D. 1979. Control of *Rhizoctonia solani* on cotton seedlings with *Pseudomonas fluorescens* and with an antibiotic produced by the bacterium. *Phytopathology*. 69: 480-482.

- HOWELL, C.R.; STIPANOVIC, R.D. 1980. Suppression of *Pythium ultimum* induced damping-off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology*. 70: 712-715.
- JAMES, D.W.; GUTTERSON, N.I. 1986. Multiple antibiotics produced by *Pseudomonas fluorescens* HV37 a and Thier differential regulation by glucose. *Appl. Environ. Microbiology*. 55: 1183-1189.
- JIMENEZ, G.M.; FERNANDEZ, F.V. 1982. Manual técnico para uso y manejo de Agroquímicos. Ed. Colegio de ingenieros agronomos. Costa Rica. 171 p.
- JIMENEZ, J.M.; BUSTAMANTE, E. 1988. Respuesta de líneas de tomate a *Pseudomonas solanacearum* y *Alternaria solani* en el trópico húmedo de Costa Rica. In Reunión de Fitopatología. San Andres, Colombia. p 5.
- JIMENEZ, O.F. 1988. Resumen acumulado de datos agroclimáticos. CATIE. Turrialba, Costa Rica.
- JOHNSON, D.E. 1931. The antibiosis of certain bacteria to smuts and some other fungi. *Phytopathology*. 21: 843-863.
- JORDAN, E.O. 1908. General bacteriology. Ed. W.B. Sanders company. Philadelphia, EE.UU. 556 p.
- KING, E.O.; WORD, N.K.; RANEY, D.E. 1954. Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *J. Lab. Clin. Med.* 44: 301-307.
- KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.;SCHROTH, M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286: 885-886.
- KNUDSEN, G.R.; SPURR, H.W., JR. 1987. Field persistence and efficacy of five bacterial preparations for control of peanut leaf spot. *Plant Disease*. 71: 442-445.
- KOKALIS-BURELLE, N.; BACKMAN, D.A.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; PLOPER, L.D. Chitin as foliar amendment to modify microbial ecology and control disease. In 1991 APS Annual Meeting. August 17-21, 1991. St. Louis, Missouri. APS.
- KRANTZ, J. 1982. Enfermedades plagas y malezas de los cultivos tropicales. Heinez Schimutttr. 722 p.
- LARGE, E.C. 1966. Measuring plant disease. *Annu. Rev. Phytopathology*. 4: 9-28.
- LEBEN, C. 1961. Microorganisms on cucumber seedlings. *Phytopathology* 51: 553-557.

- LEISINGER, T.; MARGRAFF, R. 1979. Secondary metabolites of the fluorescent pseudomonads. *Microbiol. Rev.* 43: 422-442.
- LEON, G.De. 1985. Dina-rips, tomate industrial y de mesa resistente a marchitez bacteriana. Panamá. IDIAPA. 5 p.
- LEON, G.H. 1982. Enfermedades de cultivos en el estado de Sinaloa. Sinaloa, Mexico. SARCH. p 124-125.
- LEON, G.H.; AROSEMENA, D.M. 1986. El cultivo de tomate para el consumo fresco en el valle de Culiacan, Sinaloa, Mexico. SARCH. 95 p.
- LINGAPPA, Y; LOCKWOOD, J.L. 1962. Chitin media for selective isolation and culture of Actinomycetes. *Phytopathology.* 52: 317-323.
- LUCAS, G.B.; CAMPBELL, C.L.; LUCAS, L.T. 1985. Introduction to plant diseases. Identification and management. Connecticut, Avi. 200 p.
- LUKENS, R.J.; OU, S.H. 1976. Chlorothalonil residues on field tomatoes and protection against *Alternaria solani*. *Phytopathology.* 66: 1018-1022.
- MAURER, C.L., BAKER, R. 1964. Ecology of plant pathogens in soil. I. Influence of chitin and lignin amendments on development of bean root rot. *Phytopathology* 54: 1425-1426.
- MAURER, C.L.; BAKER, R. 1965. Ecology of plant pathogens in soil. II. Influence of glucose, cellulose, and inorganic nitrogen amendments on development of bean root rot. *Phytopathology.* 55: 69-72.
- McKEEN, C.D.; REILLY, C.C.; PUSEY, P.L. 1986. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathology.* 76: 136-139.
- MINTON, N.A.; PARKER, M.B.; FLOWERS, R.A. 1977. Infection of downy mildew on soybeans following applications of several nematicides to soil and foliar sprays. *Plant Disease Report.* 61: 436-438.
- MISAGHI, I.J.; STOWELL, L.J.; GROGAN, R.G.; SPERMAN, L.C. 1982. Fungistatic activity of water-soluble fluorescent pigments of fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* 72: 33-36.
- MITCHELL, R. 1963. Addition of fungal cell-wall compounds to soil for biological disease control. *Phytopathology.* 53: 1068-1071.

- MITCHELL, R.M.; ALEXANDER, M. 1962. Microbiological processes associated with the use of chitin for biological control. *Proc. Soil. Sci. Soc. Amer.* 26: 556-558.
- MITCHELL, R.; ALEXANDER, M. 1961. The mycolytic phenomenon and biological control of *Fusarium* in soil. *Nature* 190: 109-110.
- MORGAN, F.L. 1963. Infection inhibition and germ-tube lysis of three cereal rusts by *Bacillus pumilus*. *Phytopathology*. 53: 1346-1348.
- NEWHOOK, F.J. 1957. The relationship of saprophytic antagonism to control of *Botrytis cinerea* Pers. on tomatoes. *New Zealand journal of Science and Technology*. 38: 473-481.
- PACE, M.A.; CAMPBELL, R. 1974. The effect of saprophytes on infection of leaves of *Brassica* spp. by *Alternaria brassicicola*. *Transactions of the British Mycological society*. 63: 193-196.
- PLOPER, L.D.; BACKMAN, P.A. Modification of leaf microflora by foliar amendments and effects on disease of tomato, potato and apple. In 1991 APS Annual Meeting. August 17-21, 1991. St. Luis, Missouri. APS.
- PLOPER, L.D.; BACKMAN, P.A.; CUNNINGHAM, S.D.; MARTIN, M.J. Effect of chitin amendments and added chitinolytic microorganisms on foliar disease of tomato. In 1991 APS Annual Meeting. August 17-21, 1991. St. Luis, Missouri. APS.
- POUND, G.S.; STAHMANN, M.A. 1951. The production of a toxic material by *Alternaria solani* and its relation to the early blight. *Phytopathology*. 41: 1140-1114.
- PUSEY, P.L. 1990. Control of pathogens on aerial plant surfaces with antagonistic microorganisms. In *Biological and cultural tests for control of plant disease*. Vol 5. APS Press. 112p.
- PUSEY, P.L.; WILSON, C.L. 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease*, 68: 753-756.
- ROTEM, J.; WOODING, B.; AYLOR, D.E. 1985. The role of solar radiation, especially ultraviolet, in the mortality of fungal spores. *Phytopathology*. 75: 510-514.
- RYTTER, J.L.; LUKEZIC, F.L.; CRAIG, R.; MOORMAN, G.W. 1989. Biological control of geranium rust by *Bacillus subtilis*. *Phytopathology*. 79: 367-370.

- SCHUMAN, G; THURSTON, H.D. 1976. Foliar infection of potato by *Phytophthora infestans* inhibited by two insecticides. Plant Disease Report 60: 734-735.
- SHAMIYEH, N. B.; JOHNSON, F. 1973. Effect of heptachlor on numbers of bacteria; actinomycetes and fungi in soil. Soil Biology and Biochemistry 5: 309-314.
- SHANER, G.; FINNEY, R.E. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-midewing resistance in knox wheat. Phytopathology. 67: 1051-1056.
- SHERFE, A.F.; MACNAB, A.A. 1986. Tomato early blight. In Vegetable disease and their control. Jhon Willey & Sons. New York. p 634-635.
- SPURR, H.W. JR. 1979. Ethanol treatment-avaluable technique foe foliar biocontrol studies of plant disease. Phytopathology. 69: 773-776.
- SPURR, H.W., JR.; KNUDSEN, G.R. 1985. Biological control of leaf diseases with bacteria. In Biological control on the phylloplane. WINDELS, C.E.; LINDOW, S.E. Ed. APS. St. Paul. 169 p.
- STEEL, R.G.D.; TORRIE, J.H. 1980. Principles and procedures of statistics. 2nd ed. McGRAW-HILL. New York. 633 p.
- STEJNBERG, A; BLAKEMAN, J.P. 1973. Ultraviolet-induced changes in populations of epiphytic bacteria on beet root leaves and their effect on germination of *Botritis cinerea* spores. Physiological Plant Pathology. 3: 443-451.
- STERLIN, F. 1986. El cultivo de tomate. In Olericultura. UNED. San José, Costa Rica. p 87-117.
- TELIZ-ORTIZ, M.; BURKHOLDER, W.H. 1960. A strain of *Pseudomonas fluorescens* antagonistic to *Pseudomonas phaseolicola* and other bacterial plant pathogens. Phytopathology 50: 119-123.
- VAN DER PLANK, J.E. 1963. Plant diseases: Epidemics and control. Academic Press. New york. 349 p.
- VASUDEVA, R.S.; CHAKRAVARTHI, B.P. 1954. The antibiotic action of *Bacillus subtilis* in relation to certain parasitic fungi, with special reference to *Alternaria solani* (ELL. & MART) JONES & GROUT. Ann. Appl. Biol. 41(4): 612-618.
- WALKER, J.C.; AZPEITIA, A.A. 1965. Patología vegetal. Editorial Omega, S.A. Barcelona. 818 p.

- WARREN , R.C. 1972. Interferencia by common leaf saprophytic fungi with the development of *Phoma betae* lesions on sugarbeet leaves. Annals of Applied Biology. 72: 137-144.
- WINDELS, E.; LINDOW, S. 1985. Biological control on the phylloplane. St. Paul, Minnesota. The American Phytopathological Society. 169 p.

8. ANEXOS

Anexo 1. Metodología para obtener quitina a partir de caparazones de camarones.

Joaquin Salazar
Shuichi Okumoto

Los caparazones frescos se remojan bien en NaOH al 10 %, se escurren y se secan al horno (70 °C) durante 3 a 4 días.

A 800 g de material seco se aplican NaOH y HCL normales durante 24 horas en forma alterna cada 4 horas. La primera vez se remojan con 5000 ml, las siguientes con 4000 ml.

Después de la última aplicación de HCL normal se escurre, lavando 3 veces con alcohol de 95 %. Cada contacto con el alcohol dura 15 minutos y se debe agitar y restregar bien antes de descartar el alcohol y poner otro nuevo. Finalmente, se elimina el alcohol y se seca en un horno.

Tomar 200 g del material seco y añadir 2666 ml de HCL concentrado (36-38 %). Agite bien y con cuidado hasta que todo se haya remojado y condensado en una masa gelatinosa de color oscuro. Agite intermitentemente por unas dos horas, luego agregue agua destilada hasta completar unos 8 litros.

Antes de dejar en reposo por una noche, se debe agitar varias veces fuertemente. Si hay separación en dos fases, se tira el sobrenadante por decantación, cuidando de no perder parte del precipitado. A veces esto no es fácil, por lo que se recomienda el uso de una trampa de vacío accionada por agua a la que se le acopla una manguera con un tubo de vidrio o plástico que tenga el extremo doblado en "U" para que al introducirla en el líquido la succión se verifique de arriba hacia abajo y evitar el arrastre del precipitado. Usando lo anterior se puede llegar casi al límite de las fases con bastante seguridad. De no haber separación se procede como cuando se elimina el sobrenadante.

Eliminado el sobrenadante, se agita fuertemente y se transvasan 200 ml de suspensión en tubos de centrifugación grandes, que junto a sus soportes de hierro se pesan para igualar las masas agregando agua. Así se protege la cristalería y la máquina durante la operación.

Se centrifuga a 2600 rpm durante 10 minutos. Se retiran los frascos y se descartan el líquido; luego se añade entre 100 y 150 ml de agua dependiendo del volumen del precipitado, se agitan hasta suspenderlo, se igualan sus pesos y se centrifugan de nuevo. La operación de lavado se repite 3 veces, utilizando sólo 5 minutos cada vez que se centrifugue.

El decantado se recoge en botellas para recuperar algo de la suspensión que se va en el líquido.

En el tercer lavado se mide el pH para corregirlo y que quede por encima de 2. Generalmente se puede hacer con 0.5 ml de NaOH 10 N, sin embargo, algunas veces hay que emplear más.

El precipitado se retira de los tubos, usando la menor cantidad de agua posible para su transvase a una liquidadora donde se mezcla bien por espacio de 30 segundos. Se guarda en un frasco y en refrigeración a unos 4 °C.

La concentración de quitina contenida en la suspensión coloidal se calcula con la ayuda de un liofilizador

Anexo 2. Análisis del suelo del área del experimento de campo. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

Rep.	pH	M.O.	N	P	Ca	Mg	K	ACD.	Cu	Zn	Mn
		%	%	mg/ml	cmol/l				mg/ml		
I	4.5	6.28	0.27	20.4	3.78	1.02	0.3	0.95	23.3	4.9	20.1
II	4.5	6.14	0.24	17.4	3.65	0.96	0.22	0.9	22.1	4.5	15.0
III	4.5	5.73	0.28	17.4	3.68	1.04	0.26	0.9	23.8	4.5	18.0
Pm.	4.5	6.05	0.60	18.4	3.70	1.01	0.26	0.92	23.1	4.6	17.7

Anexo 3. Análisis de varianza para los inóculos iniciales por tratamiento, estimados mediante el model logit. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Fc.
Bloque	2	10.8919650	5.4459825	1.84ns.
Quitina	1	0.1294427	0.1294427	0.04ns.
Leche	1	1.4362436	1.4362436	0.48ns.
Quit.*leche	1	0.1679093	0.1679093	0.06ns.
Fungicida	1	4.8619443	4.8619443	1.64ns.
Quit.*Fung.	1	1.3331318	1.3331318	0.45ns.
Leche*Fung.	1	1.8528895	1.8528895	0.63ns.
Quit.*Leche*Fung.	1	1.3293407	1.3293407	0.45ns.
Error	14	41.4632471	2.9616605	
Total	23		C.V. = -10.23	

ns.: no significativo.

Anexo 4. Precios de venta de tomate al mayor en el Centro Nacional de Abastecimiento y Distribución de Alimentos (CENADA)*. Costa Rica. 1992.

Fecha	Calidad de tomate		
	Tomate I	Tomate II	Tomate III
28-5-92	750**	600	150
1-6-92	750	600	125
4-6-92	500	400	100
8-6-92	450	300	750
11-6-92	550	400	100
22-6-92	600	450	150
25-6-92	450	350	100
29-6-92	500	450	150
2-7-92	550	500	150
13-7-92	800	650	225
16-7-92	850	750	250
20-7-92	800	700	250
23-7-92	800	650	200

*: Por El Programa Integral de Mercado Agropecuario (PIMA), Departamento Técnico, MAG. Costa Rica.

** : Precio en colones/10 Kg

Anexo 5. Análisis de varianza para la población de *Bacillus* spp. respecto a la aplicación de los tratamientos. CARIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

F.V.	G.L.	S.L.	C.M.	Fc.
Bloque	2	1.32341	0.66171	0.83ns
Quitina	1	0.56570	0.56570	0.71ns
Leche	1	0.85480	0.85480	1.07ns
Quit.*Leche	1	0.24588	0.24588	0.31ns
Fungicida	1	0.00269	0.00269	0.00ns
Quit.*Fung.	1	0.04755	0.04755	0.06ns
Leche*Fung.	1	0.39817	0.39817	0.50ns
Quit.*Leche*Fung.	1	0.37129	0.37129	0.46ns
Error(a)	14	11.20294	0.80021	
Tiempo	7	49.51210	7.07316	11.00**
Quit.*Tiempo	7	7.18524	1.02646	1.60ns
Leche*Tiempo	7	1.85139	0.26448	0.41ns
Quit.*Leche*Tiempo	7	6.99264	0.99895	1.55ns
Fung.*Tiempo	7	9.77413	1.39630	2.17ns
Quit.*Fung.*Tiempo	7	4.57417	0.65345	1.02ns
Leche*Fung.*Tiempo	7	3.91295	0.55899	0.87ns
Quit.*Leche*Fung. *Tiempo	7	6.78691	0.96956	1.51ns
Error(b)	112	71.98853	0.64275	
Total	191		C.V. = 105.3366	

*: nivel de significancia al 5 %.
ns.: no significativo.

Anexo 6. Análisis de varianza para la población de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, respecto a la aplicación de los tratamientos. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

F.V.	G.L.	S.L.	C.M.	Fc.
Bloque	2	5.66117	2.83306	2.10ns
Quitina	1	5.65499	5.65499	4.19ns
Leche	1	0.03903	0.03903	0.03ns
Quit.*Leche	1	3.49697	3.49697	2.59ns
Fungicida	1	1.54314	1.54314	1.14ns
Quit.*Fung.	1	0.08863	0.08863	0.07ns
Leche*Fung.	1	0.17416	0.17416	0.13ns
Quit.*Leche*Fung.	1	0.07121	0.07121	0.05ns
Error(a)	14	18.91123	1.35080	
Tiempo	7	37.28698	5.32671	3.57**
Quit.*Tiempo	7	5.91850	0.84550	0.57ns
Leche*Tiempo	7	10.63502	1.51929	1.02ns
Quit.*Leche*Tiempo	7	4.34642	0.62092	0.42ns
Fung.*Tiempo	7	8.93311	1.27616	0.85ns
Quit.*Fung.*Tiempo	7	8.24956	1.17851	0.79ns
Leche*Fung.*Tiempo	7	2.22916	0.31845	0.21ns
Quit.*Leche*Fung. *Tiempo	7	3.96882	0.56697	0.38ns
Error(b)	112	167.34142	1.49412	
Total	191		C.V. = 229.92	

*: nivel de significancia al 5 %.

ns.: no significativo.

Anexo 7. Efecto de inhibición o estímulo del crecimiento de *A. solani*, debido a las 33 cepas de bacterias aisladas el 9 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

CEPAS ^a			Germ. ^b	No.tubo ^c	Long. de tubo ^d	No.Ramf ^e
Codigo	Tipo	Origen	(%)	(No.)	(micras)	(No.)
Testigo			99.34	3.6	185.6	5.0
A1	P.F.	T1	96.09*	2.3*	49.1*	1.2*
A2	P.F.	T1	93.98*	2.6*	85.1*	2.2*
A3	P.F.	T1	93.32*	4.1	87.1*	2.8*
A4	P.F.	T1	93.62*	2.8*	74.5*	1.0*
A5	P.F.	T2	88.74*	4.8+	12.3*	0.5*
A6	P.F.	T2	96.61	4.2	102.7*	5.4
A7	P.F.	T2	92.43*	4.3	85.2*	6.1+
A8	P.F.	T2	91.51*	4.4	92.8*	8.4+
A9	P.F.	T2	95.55*	3.6	88.7*	7.3+
A10	P.F.	T2	94.81*	3.5	90.1*	1.7*
A11	P.F.	T3	93.95*	3.2	77.3*	1.6*
A12	P.F.	T5	95.23*	3.3	74.9*	1.4*
A13	P.F.	T7	93.09*	3.4	67.7*	3.3*
A14	P.F.	T7	95.10*	4.4+	70.3*	3.1*
A15	P.F.	T6	93.50*	3.4	79.5*	5.7
A16	P.F.	T4	91.83*	4.1	61.7*	4.5
A17	P.F.	T4	95.49*	4.6+	89.2*	7.2+
A18	P.F.	T8	94.82*	4.3	73.8*	1.6*
A19	B	T2	97.17	4.0	58.4*	3.4*
A20	B	T2	96.55*	4.2	75.1*	4.8
A21	B	T2	97.03	4.0	76.7*	4.1
A22	B	T2	94.94*	4.4+	61.0*	4.5
A23	B	T2	97.44	4.4+	82.5*	5.6
A24	B	T2	97.71	4.1	72.3*	4.3
A25	B	T2	97.19	3.8	78.4*	3.7*
A26	B	T7	95.37*	3.8	63.3*	4.0
A27	B	T6	96.86	3.7	17.1*	0.8*
A28	B	T6	91.10*	5.0+	15.2*	0.5*
A29	B	T6	96.71	4.9+	31.1*	1.3*
A30	B	T6	97.47	3.0	26.5*	0.8*
A31	B	T6	97.67	3.8	18.4*	1.2*
A32	B	T6	96.23*	5.0+	38.6*	1.2*
A33	B	T8	93.97*	4.3	80.7*	4.3

a: P.F.= *Pseudomonas* sp. fluorescente, B= *Bacillus* sp.

b: Germ.= % de germinación.

c: No.tubo = número de tubo germinativo/conidio.

d: Long. de tubo = longitud del tubo germinativo más largo en el conidio

e: No. Ramf = número de ramificaciones principales en el tubo germinativo más largo.

* y +: Inhibición y estímulo significativo al 5 % según la prueba de Dunnett, respectivamente.

Anexo 8. Efecto de inhibición o estímulo del crecimiento de *A. solani*, debido a las 60 cepas de bacterias, aisladas el 17 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

CEPAS ^a			Germ. ^b	No. tubo ^c	long. de tubo ^d	No. Ramf ^e
Codigo	Tipo	Origen	(%)	(No.)	(micras)	(No.)
Testigo			99.65	4.9	130.5	5.9
B1	P.F.	T1	99.66	5.6	76.5*	5.5
B2	P.F.	T1	98.73	4.6	64.8*	2.6*
B3	P.F.	T1	99.63	5.2	88.9*	6.2
B4	P.F.	T1	99.67	5.4	96.9*	6.1
B5	P.F.	T1	99.69	5.6	82.0*	5.5
B6	P.F.	T1	99.79	4.9	61.9*	3.5*
B7	P.F.	T1	100.00	3.9*	80.1*	3.4*
B8	P.F.	T1	99.29	4.5	105.4*	6.6
B9	P.F.	T1	99.45	4.5	88.7*	3.1*
B10	P.F.	T2	99.30	6.1+	92.4*	7.7+
B11	P.F.	T2	99.71	5.1	49.4*	2.6*
B12	P.F.	T2	100.00	5.2	94.7*	8.3+
B13	P.F.	T2	98.09*	5.1	98.9*	7.6
B14	P.F.	T2	99.14	3.7*	34.6*	0.7*
B15	P.F.	T2	99.79	4.8	105.5*	9.0+
B16	P.F.	T2	99.68	5.1	100.4*	8.6+
B17	P.F.	T3	99.15	5.3	89.6*	6.4
B18	P.F.	T3	99.49	5.0	84.9*	8.0+
B19	P.F.	T3	99.27	5.3	91.6*	7.1
B20	P.F.	T3	99.65	6.1+	85.2*	6.3
B21	P.F.	T3	100.00	4.9	92.7*	6.5
B22	P.F.	T3	99.51	5.3	83.0*	7.8+
B23	P.F.	T5	99.69	6.5+	73.0*	4.6
B24	P.F.	T5	99.91	4.7	52.5*	2.1*
B25	P.F.	T5	99.36	4.9	64.2*	2.0*
B26	P.F.	T5	100.00	4.3	63.0*	4.0*
B27	P.F.	T5	98.69	5.0	60.5*	2.0*
B28	P.F.	T5	98.48	4.3	44.2*	1.1*
B29	P.F.	T5	100.00	5.8+	86.7*	4.2*
B30	P.F.	T5	100.00	4.9	99.2*	5.2
B31	P.F.	T5	100.00	5.2	81.3*	6.5
B32	P.F.	T7	99.85	5.4	82.8*	6.1
B33	P.F.	T7	99.31	5.3	78.3*	2.2*
B34	P.F.	T7	98.74	4.7	106.5*	10.5+
B35	P.F.	T7	98.83	5.2	97.0*	7.1
B36	P.F.	T7	99.33	5.0	114.4*	6.2
B37	P.F.	T7	100.00	4.6	112.1*	4.3*
B38	P.F.	T7	100.00	6.2+	105.6*	7.6+
B39	P.F.	T6	99.74	5.1	108.6*	7.9+
B40	P.F.	T4	99.59	4.4	78.2*	8.0+
B41	P.F.	T4	99.42	4.2	75.1*	4.0*
B42	P.F.	T4	99.47	5.3	93.5*	5.9
B43	P.F.	T4	97.49*	4.2	107.2*	7.6+

B44	P.F.	T4	99.68	4.9	103.6*	7.1
B45	P.F.	T4	99.63	4.4	96.2*	8.0+
B46	P.F.	T4	99.79	6.0+	98.1*	8.1+
B47	P.F.	T8	97.57*	5.1	121.1	6.5
B48	P.F.	T8	97.92	6.5+	95.9*	10.5+
B49	P.F.	T8	99.87	7.0+	29.6*	2.0*
B50	B	T1	99.63	5.8+	88.6*	3.8*
B51	B	T2	100.00	2.2*	8.9*	0.1*
B52	B	T2	99.75	4.7	13.3*	0.2*
B53	B	T3	99.43	5.0	12.1*	0.1*
B54	B	T3	98.77	5.0	16.7*	0.2*
B55	B	T3	99.77	5.0	15.3*	0.3*
B56	B	T3	99.27	5.6	79.5*	5.8
B57	B	T5	100.00	5.1	82.6*	5.7
B58	B	T5	100.00	4.8	89.6*	4.6
B59	B	T7	100.00	5.1	76.8*	5.6
B60	B	T4	99.81	5.8+	18.7*	0.5*

a: P.F.= *Pseudomonas* sp. fluorescente, B= *Bacillus* sp.

b: Germ.= % de germinación.

c: No.tubo = número de tubo germinativo/conidio.

d: Long. de tubo = longitud del tubo germinativo más largo en el conidio

e: No. Ramf = número de ramificaciones principales en el tubo germinativo más largo.

* y +: Inhibición y estímulo significativo al 5 % según la prueba de Dunnett.

Anexo 9. Efecto de inhibición o estímulo del crecimiento de *A. solani*, debido a las 16 cepas de bacterias aisladas el 24 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

CEPASa			Germ.	No.tubo	long.	No.Ramf
Codigo	Tipo	Origen	(%)	(No.)	de tubo (micras)	(No.)
Testigo			98.30	3.1	97.0	4.2
C1	B	T3	97.78	3.4	74.9*	4.0
C2	B	T3	99.62	3.7	55.4*	3.9
C3	B	T3	99.46	3.0	86.7	3.8
C4	B	T3	99.35	3.3	26.1*	2.2*
C5	B	T3	99.39	3.4	31.5*	3.3
C6	B	T5	99.53	3.3	52.7*	3.2
C7	B	T7	97.63	3.2	50.8*	3.0
C8	B	T7	99.77	3.6	65.1*	4.7
C9	F.P.	T7	98.26	3.4	103.5	4.3
C10	F.P.	T7	98.74	3.9+	88.5	4.4
C11	F.P.	T7	97.16	3.7	106.3	5.5
C12	F.P.	T7	96.60	3.7	102.7	5.9+
C13	F.P.	T7	98.76	5.1+	138.1	7.7+
C14	F.P.	T7	97.96	4.9+	130.9	8.2+
C15	F.P.	T7	98.63	4.9+	113.2	6.9+
C16	F.P.	T4	98.93	5.2+	118.3	8.4+

a: P.F.= *Pseudomonas* sp. fluorescentes, B= *Bacillus* sp.

b: Germ.= % de germinación.

c: No.tubo = número de tubo germinativo/conidio.

d: Long. de tubo = longitud del tubo germinativo más largo en el conidio

e: No. Ramf = número de ramificaciones principales en el tubo germinativo más largo.

* y +: Inhibición y estímulo significativo al 5 % según la prueba de Dunnett, respectivamente.

Anexo 10. Correlación entre el número de tubos germinativos, longitud de tubo germinativo más largo y número de ramificaciones en el tubo germinativo, con la presencia de las diferentes cepas de *Bacillus spp.*, aisladas el 9 (a), 17 (b) y 24 (c) de enero, 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

(a)

Variables	<u>Coefficiente de correlación</u>		
	X1	X2	X3
X1:numero de tubo germ.	1.000	-0.031	0.023
X2:logitud de tubo germ. más largo		1.000	0.898**
X3:número de ramificaciones en tubo germ.			1.000

(b)

Variables	<u>Coefficiente de correlación</u>		
	X1	X2	X3
X1:numero de tubo germ.	1.000	0.331	0.303
X2:logitud de tubo germ. más largo		1.000	0.941**
X3:número de ramificaciones en el tubo germ.			1.000

(c)

Variables	<u>Coefficiente de correlación</u>		
	X1	X2	X3
X1:número de tubo germ.	1.000	-0.105	0.375
X2:logitud de tubo germ. más largo		1.000	0.679**
X3:número de ramificaciones en el tubo germ.			1.000

** : el nivel de significancia al 1 %.

Anexo 11. Correlación entre el número de tubos germinativos, longitud de tubo germinativo más largo y número de ramificaciones en el tubo germinativo, con la presencia de las diferentes cepas de *Pseudomonas* spp. fluorescentes, aisladas el 9 (a), 17 (b) y 24 (c) de enero, 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

(a)

Variables	<u>Coefficiente de correlación</u>		
	X1	X2	X3
X1:numero de tubo germ.	1.000	0.045	0.367**
X2:logitud de tubo germ. más largo		1.000	0.570**
X3:número de ramificaciones en tubo germ.			1.000

(b)

Variables	<u>Coefficiente de correlación</u>		
	X1	X2	X3
X1:numero de tubo germ.	1.000	0.069	0.264**
X2:logitud de tubo germ. más largo		1.000	0.757**
X3:número de ramificaciones en el tubo germ.			1.000

(c)

Variables	<u>Coefficiente de correlación</u>		
	X1	X2	X3
X1:número de tubo germ.	1.000	0.712**	0.838**
X2:logitud de tubo germ. más largo		1.000	0.810**
X3:número de ramificaciones en el tubo germ.			1.000

** : el nivel de significancia al 1 %.

Anexo 12. Porcentaje de inhibición sobre la longitud de tubo germinativo debido a las cepas aisladas el 9 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

CEPAS ^a			Long. ^b de tubo (micras)	Porcentaje ^c de inhibición (%)
Codigo	Tipo	Origen		
Testigo			185.6	
A1	P.F.	T1	49.1	73.5
A2	P.F.	T1	85.1	54.1
A3	P.F.	T1	87.1	53.1
A4	P.F.	T1	74.5	59.9
A5	P.F.	T2	12.3	93.4
A6	P.F.	T2	102.7	44.7
A7	P.F.	T2	85.2	54.1
A8	P.F.	T2	92.8	50.0
A9	P.F.	T2	88.7	52.2
A10	P.F.	T2	90.1	51.5
A11	P.F.	T3	77.3	58.4
A12	P.F.	T5	74.9	59.6
A13	P.F.	T7	67.7	63.5
A14	P.F.	T7	70.3	62.1
A15	P.F.	T6	79.5	57.1
A16	P.F.	T4	61.7	66.8
A17	P.F.	T4	89.2	51.9
A18	P.F.	T8	73.8	60.2
A19	B	T2	58.4	68.5
A20	B	T2	75.1	59.5
A21	B	T2	76.7	58.7
A22	B	T2	61.0	67.1
A23	B	T2	82.5	55.5
A24	B	T2	72.3	61.0
A25	B	T2	78.4	57.8
A26	B	T7	63.3	65.9
A27	B	T6	17.1	90.8
A28	B	T6	15.2	91.8
A29	B	T6	31.1	83.2
A30	B	T6	26.5	85.7
A31	B	T6	18.4	90.1
A32	B	T6	38.6	79.2
A33	B	T8	80.7	56.5

a: P.F.= *Pseudomonas* sp. fluorescente, B= *Bacillus* sp.

b: Long. de tubo = longitud del tubo germinativo más largo en el conidio

c: % de inhibición = (Testigo-cepa)/Testigo*100

Anexo 13. Porcentaje de inhibición sobre la longitud de tubo germinativo debido a las cepas aisladas el 17 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

CEPAS ^a			long. ^b de tubo (micras)	Porcentaje ^c de inhibición (%)
Codigo	Tipo	Origen		
Testigo			130.5	
B1	P.F.	T1	76.5	41.4
B2	P.F.	T1	64.8	50.3
B3	P.F.	T1	88.9	31.9
B4	P.F.	T1	96.9	25.7
B5	P.F.	T1	82.0	37.2
B6	P.F.	T1	61.9	52.6
B7	P.F.	T1	80.1	38.6
B8	P.F.	T1	105.4	19.2
B9	P.F.	T1	88.7	32.0
B10	P.F.	T2	92.4	29.2
B11	P.F.	T2	49.4	62.1
B12	P.F.	T2	94.7	27.4
B13	P.F.	T2	98.9	24.2
B14	P.F.	T2	34.6	73.5
B15	P.F.	T2	105.5	19.2
B16	P.F.	T2	100.4	23.1
B17	P.F.	T3	89.6	31.3
B18	P.F.	T3	84.9	34.9
B19	P.F.	T3	91.6	29.8
B20	P.F.	T3	85.2	34.7
B21	P.F.	T3	92.7	29.0
B22	P.F.	T3	83.0	36.4
B23	P.F.	T5	73.0	44.1
B24	P.F.	T5	52.5	59.8
B25	P.F.	T5	64.2	50.8
B26	P.F.	T5	63.0	51.7
B27	P.F.	T5	60.5	53.6
B28	P.F.	T5	44.2	66.1
B29	P.F.	T5	86.7	33.6
B30	P.F.	T5	99.2	24.0
B31	P.F.	T5	81.3	37.7
B32	P.F.	T7	82.8	36.6
B33	P.F.	T7	78.3	40.0
B34	P.F.	T7	106.5	18.4
B35	P.F.	T7	97.0	25.7
B36	P.F.	T7	114.4	12.3
B37	P.F.	T7	112.1	14.1
B38	P.F.	T7	105.6	19.1
B39	P.F.	T6	108.6	16.8
B40	P.F.	T4	78.2	40.1
B41	P.F.	T4	75.1	42.5
B42	P.F.	T4	93.5	28.4
B43	P.F.	T4	107.2	17.9
B44	P.F.	T4	103.6	20.6

B45	P.F.	T4	96.2	26.3
B46	P.F.	T4	98.1	24.8
B47	P.F.	T8	121.1	7.2
B48	P.F.	T8	95.9	26.5
B49	P.F.	T8	29.6	77.3
B50	B	T1	88.6	32.1
B51	B	T2	8.9	93.2
B52	B	T2	13.3	89.8
B53	B	T3	12.1	90.7
B54	B	T3	16.7	87.2
B55	B	T3	15.3	88.3
B56	B	T3	79.5	39.1
B57	B	T5	82.6	36.7
B58	B	T5	89.6	31.3
B59	B	T7	76.8	41.1
B60	B	T4	18.7	85.6

a: P.F.= *Pseudomonas* sp. fluorescente, B= *Bacillus* sp.

b: Long. de tubo = longitud del tubo germinativo más largo en el conidio

c: % de inhibición = (Testigo-cepa)/Testigo*100

Anexo 14. Porcentaje de inhibición o estímulo sobre la longitud de tubo germinativo debido a las cepas aisladas el 24 de enero de 1992. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

CEPASa			long. ^b de tubo (micras)	Porcentaje ^c de inhibición (%)
Codigo	Tipo	Origen		
Testigo			97.0	
C1	B	T3	74.9	22.8
C2	B	T3	55.4	42.9
C3	B	T3	86.7	10.6
C4	B	T3	26.1	73.1
C5	B	T3	31.5	67.5
C6	B	T5	52.7	45.7
C7	B	T7	50.8	47.6
C8	B	T7	65.1	32.9
C9	F.P.	T7	103.5	*6.7
C10	F.P.	T7	88.5	8.8
C11	F.P.	T7	106.3	*9.6
C12	F.P.	T7	102.7	*5.6
C13	F.P.	T7	138.1	*42.4
C14	F.P.	T7	130.9	*34.9
C15	F.P.	T7	113.2	*16.7
C16	F.P.	T4	118.3	*22.0

a: P.F.= *Pseudomonas* sp. fluorescente, B= *Bacillus* sp.

b: Long. de tubo = longitud del tubo germinativo más largo en el conidio

c: % de inhibición = (Testigo-cepa)/Testigo*100

*: % de estímulo = (Cepa-Testigo)/Testigo*100

Anexo 15. Producción de quitinasa, de acuerdo a la transparencia del medio ANQ, de algunas cepas antagónicas estudiadas. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1992.

Fecha aislada	Cepas			Long. de tubo. (micras)	Crec. AN ^a	Crec. ANQ ^b	Transp. ANQ ^c
	Código	Tipo	Origen				
9-1-92	A1	P.F.	T1	49.1	+	+	-
	A2	P.F.	T1	85.1	+	+	-
	A3	P.F.	T1	87.1	+	+	-
	A4	P.F.	T1	74.5	+	+	-
	A5	P.F.	T2	12.3	+	+	-
	A6	P.F.	T2	102.7	+	+	+
	A7	P.F.	T2	85.2	+	+	-
	A8	P.F.	T2	92.8	+	+	-
	A9	P.F.	T2	88.7	+	+	-
	A10	P.F.	T2	90.1	+	+	-
	A11	P.F.	T3	77.3	+	+	-
	A12	P.F.	T5	74.9	+	+	-
	A13	P.F.	T7	67.7	+	+	-
	A14	P.F.	T7	70.3	+	+	-
	A15	P.F.	T6	79.5	+	+	-
	A16	P.F.	T4	61.7	+	+	-
	A17	P.F.	T4	89.2	+	+	-
	A18	P.F.	T8	73.8	+	+	+
	A19	B	T2	58.4	+	+	-
	A20	B	T2	75.1	+	+	-
	A21	B	T2	76.7	+	+	-
	A22	B	T2	61.0	+	+	-
	A23	B	T2	82.5	+	+	-
	A24	B	T2	72.3	+	+	-
	A25	B	T2	78.4	+	+	-
	A26	B	T7	63.3	+	+	-
	A27	B	T6	17.1	+	+	+
	A28	B	T6	15.2	+	+	+
	A29	B	T6	31.1	+	+	+
	A30	B	T6	26.5	+	+	+
	A31	B	T6	18.4	+	+	+
	A32	B	T6	38.6	+	+	+
	A33	B	T8	80.7	+	+	-
17-1-92	B2	P.F.	T1	64.8	+	+	-
	B3	P.F.	T1	88.9	+	+	-
	B6	P.F.	T1	61.9	+	+	-
	B7	P.F.	T1	80.1	+	+	-
	B9	P.F.	T1	88.7	+	+	-
	B11	P.F.	T2	49.4	+	+	-
	B14	P.F.	T2	34.6	+	+	-
	B18	P.F.	T3	84.9	+	+	-
	B20	P.F.	T3	85.2	+	+	-
	B22	P.F.	T3	83.0	+	+	-
B23	P.F.	T5	73.0	+	+	-	

B24	P.F.	T5	52.5	+	+	-
B25	P.F.	T5	64.2	+	+	-
B26	P.F.	T5	63.0	+	+	-
B27	P.F.	T5	60.5	+	+	-
B28	P.F.	T5	44.2	+	+	-
B29	P.F.	T5	86.7	+	+	-
B31	P.F.	T5	81.3	+	+	-
B32	P.F.	T7	82.8	+	+	-
B33	P.F.	T7	78.3	+	+	-
B40	P.F.	T4	78.2	+	+	-
B41	P.F.	T4	75.1	+	+	-
B42	P.F.	T4	93.5	+	+	-
B49	P.F.	T8	29.6	+	+	-
B50	B	T1	88.6	+	+	-
B51	B	T2	8.9	+	+	-
B52	B	T2	13.3	+	+	-
B53	B	T3	12.1	+	+	-
B54	B	T3	16.7	+	+	-
B55	B	T3	15.3	+	+	-
B56	B	T3	79.5	+	+	-
B57	B	T5	82.6	+	+	+
B58	B	T5	89.6	+	+	-
B59	B	T7	76.8	+	+	-
B60	B	T4	18.7	+	+	-
24-1-92 C2	B	T3	55.4	+	+	-
C4	B	T3	26.1	+	+	-
C5	B	T3	31.5	+	+	-
C6	B	T5	52.7	+	+	+
C7	B	T7	50.8	+	+	-
C8	B	T7	65.1	+	+	+

a: Crec. AN = se crece en el medio agar-nutriente.

b: Crec. ANQ = se crece en el medio agar-nutriente+quitina.

c: Transp. ANQ = presencia de zona transparente, debido a la acción de la quitinasa.