

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO
Y LA CONSERVACION
AREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

Evaluación de microorganismos antagonistas al hongo
Mycosphaerella fijiensis (Morelet), colocados en el
interior y exterior de la planta de banano.

POR

JORGE EDUARDO MIRANDA CORRALES

Turrialba, Costa Rica
1996

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO
Y LA CONSERVACIÓN
ÁREA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

Evaluación de microorganismos antagonistas al hongo
Mycosphaerella fijiensis (Morelet), colocados en el
interior y exterior de la planta de banano.

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

Magister Scientiae

por

JORGE EDUARDO MIRANDA CORRALES

Turrialba, Costa Rica
1996

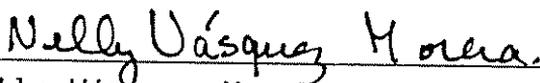
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por la jefatura del Area de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales de CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de :

Magister Scientiae

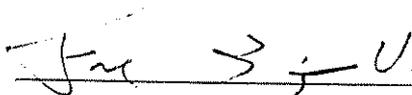
FIRMANTES:



Elkin Bustamante R.
Profesor Consejero.



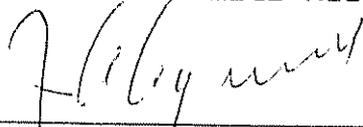
Nelly Vásquez M.
Miembro del Comité Asesor.



Franklin Jiménez U.
Miembro del Comité Asesor.



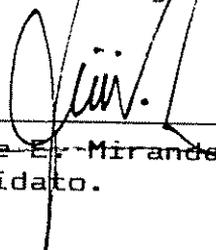
Phillip Shannon.
Miembro del Comité Asesor.



Juan A. Aguirre.
Jefe Area de Postgrado.



Pedro Ferreira.
Director Programa EDECO.



Jorge E. Miranda C.
Candidato.

DEDICATORIA

A mi familia Jorge, Margoth, Gustavo, Mercedes y Ana Betina

A mis abuelos Abel Corrales F. y Tarcila López Ch.

Al recuerdo de mi madre María Mercedes Corrales López.

AGRADECIMIENTOS

- A Dios sobre todas las cosas.
- Al Dr. Elkin Bustamante, por su acertada guía, colaboración y amistad, mi más sincero agradecimiento y admiración.
- A la M.Sc. Nelly Vásquez por su gran ayuda y participación en el desarrollo y evaluación del trabajo.
- A los M.Sc. Franklin Jiménez y Phillip Shannon, por su oportuna participación en la elaboración y evaluación del trabajo.
- A los Dres. Fritz Elango, Pánfilo Tabora, Ramiro de la Cruz y James French por el apoyo recibido para la realización del ensayo de campo en la EARTH..
- Al M.Sc. Pablo Acuña, del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de CORBANA S.A., por toda la colaboración brindada.
- A los M.Sc. Vera Sánchez y Roberto González, por su amistad y cooperación durante el desarrollo de mi trabajo.
- A Ghisselle Alvarado, Arturo Gamboa, Walter Bermúdez, Mario Cervantes, Herbert González y Manrique González por su ayuda y amistad.
- A mis amigos del Programa EDECO por toda la cooperación y atención brindada durante mi estadía en CATIE.
- A Carlos Ruiz, Bernal Herrera, Fernando Sáenz, Lilliana Chávez, Aida Wilches, Martha Zamora, Jorge Pinazzo, Celeste Acevedo y Viviana Sánchez por todo lo vivido y los buenos recuerdos.
- A todos mis compañeros de la Promoción 1994-1995 por la oportunidad y el honor de ser amigos.
- A todas las personas y entidades que de una forma u otra colaboraron durante la realización de este trabajo y de mis estudios en CATIE.

TABLA DE CONTENIDO

	Página:
PORTADA.	i
HOJA DE APROBACION.	ii
DEDICATORIA.iii
AGRADECIMIENTOS.	iv
TABLA DE CONTENIDO.	v
LISTA DE CUADROS.	x
LISTA DE FIGURAS.xii
LISTA DE ANEXOS.xiv
RESUMEN. xv
SUMMARY.	xvii
1 INTRODUCCION.	1
1.1 HIPOTESIS DEL TRABAJO.	3
1.2 OBJETIVOS DEL TRABAJO.	3
1.2.1 Objetivo Principal.	3
1.2.2 Objetivos Específicos.	3
2 REVISION DE LITERATURA.	4
2.1 EL CULTIVO.	4
2.1.1 Importancia Económica.	4
2.1.2 Descripción Botánica.	4
2.2 LA ENFERMEDAD.	7
2.2.1 Importancia Económica.	7
2.2.2 El Agente Causal.	7
2.2.2.1 Formas Reproductivas.	8
2.2.2.2 Ciclo de Vida.	9
2.2.3 Síntomas de la enfermedad.	10
2.2.4 Condiciones climáticas que afectan el desarrollo de la enfermedad.	11
2.2.5 Prácticas de control tradicional.	11
2.2.5.1 Control Químico.	11
2.2.5.2 Aceite Agrícola.	13

2.3	EL CONTROL BIOLÓGICO.	14
2.3.1	Conceptos, Objetivos y Estrategias del Control Biológico.	14
2.3.2	Organismos antagonistas.	15
2.3.3	El control biológico de la Sigatoka Negra.	17
2.3.4	Inoculación endofítica de microorganismos.	18
2.3.5	Uso de adherentes en el Control Biológico.	19
3	MATERIALES Y METODOS.	20
3.1	LOCALIZACION.	20
3.2	MATERIAL EXPERIMENTAL.	20
3.2.1	Microorganismos utilizados en la investigación.	20
3.2.2	Variedad de banano utilizada.	21
3.2.3	Coadyuvantes utilizados en la investigación.	21
3.3	PRUEBAS DE ANTAGONISMO CON EL USO DE AGENTES TENSO ACTIVOS (Silwet L-77 y NU-FILM 17) Y EL ACEITE AGRICOLA.	22
3.3.1	Prueba del efecto del uso de coadyuvantes sobre la multiplicación de los microorganismos.	22
3.3.1.1	Procedimiento de preparación de los tratamientos.	22
3.3.1.2	Variable considerada y análisis de los datos.	22
3.3.2	Prueba de antagonismo con plantas desarrolladas en invernadero.	23
3.3.2.1	Procedimiento de preparación y aplicación de los tratamientos.	23
3.3.2.2	Variabes consideradas y análisis de los datos.	25

3.3.3	Prueba de antagonismo en campo.	26
3.3.3.1	Selección del área de trabajo.	26
3.3.3.2	Instalación de trampa de ascosporas.	27
3.3.3.3	Instalación del pluviógrafo.	28
3.3.3.4	Establecimiento de las parcelas experimentales.	28
3.3.3.5	Procedimiento de preparación y aplicación de los tratamientos.	29
3.3.3.6	Variables consideradas y análisis de los datos.	30
3.4	PRUEBA DE UBICACION ENDOFITICA A TRAVES DE LA RAIZ.	33
3.4.1	Preparación del material experimental.	33
3.4.2	Procedimiento de preparación y aplicación de los tratamientos.	34
3.4.3	Procedimientos de evaluación de la técnica de inoculación y variables consideradas.	36
3.4.3.1	Observación directa de la superficie externa de las raíces tratadas.	36
3.4.3.2	Recolección de gotas de agua expulsadas de la planta.. . . .	36
3.4.3.3	Recuperación de microorganismos de la parte interna de la raíz.	37
3.4.3.4	Medición de variables de crecimiento.	38

4	RESULTADOS Y DISCUSION.	39
4.1	EFFECTO DE LOS AGENTES TENSO ACTIVOS (Silwet L-77 y Nu-Film 17) Y EL ACEITE AGRICOLA SOBRE LOS MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS.	39
4.1.1	Efecto del coadyuvantes sobre la multiplicación de las cepas <i>bacteriales in vitro</i>	39
4.1.2	Efecto de los coadyuvantes en plantas desarrolladas en invernadero.	46
4.1.2.1	Condiciones ambientales externas al invernadero.	46
4.1.2.2	Evaluación del efecto del uso de los coadyuvantes sobre la enfermedad mediante el conteo del número de pizcas.	50
4.1.3	Prueba de antagonismo en campo.	55
4.1.3.1	Selección de tratamientos.	55
4.1.3.2	Análisis de fertilidad y fertilización del área seleccionada.	55
4.1.3.2.1	Condiciones de fertilidad	55
4.1.3.2.2	Fertilización realizada	57
4.1.3.3	Densidades de inóculo en la parcela experimental y en la plantación comercial.	57
4.1.3.4	Precipitación semanal durante la realización de la prueba.	61
4.1.3.5	Efecto del uso de coadyuvantes sobre el desarrollo y la severidad de la enfermedad.	63

	Página:
4.2 UBICACION ENDOFITICA A TRAVES DE LA RAIZ.	68
4.2.1 Observación directa de la superficie de las raíces tratadas.. . . .	68
4.2.2 Presencia de microorganismos en gotas de agua expulsadas de la planta.	70
4.2.3 Recuperación de los microorganismos de la parte interna de la raíz.	73
4.2.4 Efecto de la inoculación sobre dos variables de crecimiento: Diámetro del tallo y número de hojas.	75
4.2 DISCUSION GENERAL.	80
5 CONCLUSIONES.	82
5.1 Uso de coadyuvantes.	82
5.2 Ubicación endofítica a través de la raíz.	83
6 RECOMENDACIONES.	84
7 BIBLIOGRAFIA.	85
8 ANEXOS.	91

LISTA DE CUADROS

Página:

Cuadro 1. Escala de Stover modificada por Gauhl, 1989. .	31
Cuadro 2: Análisis de varianza para los datos del conteo de células bacteriales por ml en los tratamientos con coadyuvantes. 1995. . .	41
Cuadro 3: Diferencias del efecto del coadyuvante sobre la concentración de bacterias por ml, de acuerdo a la prueba de Duncan	42
Cuadro 4: Diferencias del efecto de las cepas sobre la concentración de bacterias por ml, de acuerdo a la prueba de Duncan.	43
Cuadro 5: Diferencias del efecto de la interacción entre cepa y coadyuvante sobre la concentración de bacterias por ml, según prueba de t.	45
Cuadro 6. Análisis de varianza para los datos transformados (log(promedio)) del número de pizcas en 9cm ² de la hoja de banano 1995..	52
Cuadro 7. Análisis factorial para los datos transformados (log(promedio)) del número de pizcas en 9cm ² de la hoja de banano. 1995.	53
Cuadro 8. Diferencias del efecto de las cepas sobre el número de pizcas en 9cm ² de la hoja de banano, de acuerdo a la prueba de Duncan.	54
Cuadro 9. Condiciones químicas del área experimental en la E.A.R.T.H, Pocora de Limón, y de la Zona Oeste.	56
Cuadro 10. Análisis de varianza para los valores de ABCPE, para la Sigatoka Negra en campo..	63

Cuadro 11. Diferencias entre los valores medios del ABCPE para cada tratamiento del ensayo de campo, según prueba de Duncan.	65
Cuadro 12. Resultados de la prueba de recuperación de los microorganismos inoculados a través de la recolección de gotas de agua expulsadas por la planta.	70
Cuadro 13. Resultados de la prueba de recuperación de microorganismos de la parte interna de la raíz y medición del crecimiento de las colonias en cm.	74
Cuadro 14. Resultados del análisis estadístico del área bajo la curva de incrementos semanales.. . . .	76
Cuadro 15. Diferencias entre los valores medios del ABCIS para cada tratamiento del ensayo de inoculación endofítica, según prueba de Duncan.	78

LISTA DE FIGURAS

Página:

Figura 1: Unidades formadoras de colonias por ml para cada combinación de cepa y coadyuvante a 24 horas de la mezcla.	40
Figura 2: Temperatura media (°C) durante el periodo de inoculación, desarrollo y evaluación de la prueba en CATIE. 1995.	47
Figura 3: Precipitación (mm) durante el periodo de inoculación, desarrollo y evaluación de la prueba en CATIE. 1995.	49
Figura 4: Humedad relativa (%) durante el periodo de inoculación, desarrollo y evaluación de la prueba en CATIE. 1995.	49
Figura 5: Efecto de los tratamientos sobre la severidad de la Sigatoka negra, en invernadero. Número de pizcas en 9 cm ²	51
Figura 6: Número de ascosporas por metro cúbico de aire en las parcelas de ensayo y en la plantación comercial, EARTH. 1995.	58
Figura 7: Registro diario de ascosporas en las trampas de la parcela de ensayo y de la plantación comercial. EARTH, 1995.	60
Figura 8. Precipitación semanal medida en mm, en el área experimental en la EARTH, Pocora, Limón. 1995..	62
Figura 9: Efecto de los tratamientos en el desarrollo de la Sigatoka Negra en el campo. EARTH, Pocora, Limón. 1995.	64

Figura 10: Efecto de los tratamientos sobre la severidad de la Sigatoka Negra en el campo. EARTH, Pocora, Limón. 1995. 66

Figura 11: Incremento semanal (cm) del diámetro del tallo a 1 cm de altura en las plantas para cada tratamiento. 77

LISTA DE ANEXOS

	Página:
ANEXO 1. Productividad promedio de la actividad bananera en Costa Rica.	92
ANEXO 2. Número de aplicaciones al año para el combate de la Sigatoka Negra.	93
ANEXO 3. Ubicación de la parcela experimental. Jorge Miranda y Carlos Ruiz.	94
ANEXO 4. Distribución de los tratamientos en la parcela experimental en la EARTH.	95
ANEXO 5: Resultados (ufc/ml) prueba de toxicidad de los coadyuvantes Silwet L-77, Nu-Film y el aceite agrícola sobre los microorganismos antagonistas a <i>M. fijiensis</i>	96
ANEXO 6. Datos meteorológicos durante el período de inoculación, desarrollo y evaluación de la Sigatoka en la prueba de control en plantas desarrolladas en invernadero.	97
ANEXO 7. Estimación de la concentración de inóculo de <i>M. fijiensis</i> en el aire a partir de los datos registrados con la trampa volumétrica.	98
ANEXO 8. Resultados análisis de suelo utilizado en la prueba de ubicación endofítica a través de la raíz.100
ANEXO 9. Incrementos semanales (cm) del diámetro del tallo a un centímetro de altura para las plantas tratadas en la prueba de inoculación endofítica por la raíz.101

RESUMEN

MIRANDA C., J.E.. 1996. Evaluación de microorganismos antagonistas al hongo *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet), colocados en el interior y exterior de la planta de banano.

Palabras claves: *Mycosphaerella fijiensis*; Sigatoka Negra; *Musa sp*; banano; control biológico; bacterias antagonistas; coadyuvantes; aceite agrícola; ubicación endofítica; inducción de crecimiento.

La Sigatoka Negra es el principal problema fitosanitario que enfrenta la actividad bananera en la mayoría de países productores de la fruta. El control tradicional de la enfermedad comprende algunas prácticas agronómicas y el uso frecuente de fungicidas. En la actualidad se han reportado casos de resistencia a esos productos y algunos podrían ser eliminados del mercado. En el CATIE se han encontrado resultados positivos con el uso de microorganismos antagonistas para el control biológico de la enfermedad (González, 1995; Ruiz, 1995).

Este trabajo tuvo como objetivo evaluar el efecto de esos microorganismos aplicados externamente con los coadyuvantes Silwet L-77, Nu-Film 17 y el aceite agrícola; así como determinar la eficiencia de un método de ubicación endofítica de los antagonistas para el caso del banano. La evaluación de los coadyuvantes se efectuó a nivel de laboratorio, invernadero y campo, mientras que la de ubicación endofítica se realizó a nivel de laboratorio e invernadero. En el laboratorio no se encontró efecto de los coadyuvantes utilizados sobre la multiplicación de los microorganismos antagonistas por lo que se procedió con la parte de invernadero. En las plantas desarrolladas en invernadero la cepa R-1 de *Serratia marcescens* mostró niveles más bajos de enfermedad, pero no fueron significativas las diferencias con respecto al testigo para la reducción del número de pizcas producidas por el patógeno. Los coadyuvantes no fueron significativos bajo las condiciones presentes durante esta prueba. De acuerdo con los resultados obtenidos en invernadero se procedió a la prueba de campo con la cepa R-1 y los coadyuvantes. Bajo condiciones ambientales naturales y con niveles bajos del inóculo del patógeno, el aceite agrícola y su combinación con el antagonista mostraron diferencias significativas con respecto al testigo y a la cepa sola

para el control de la enfermedad. La combinación del Silwet L-77 con la bacteria no mostró diferencias con respecto al aceite solo.

Con la prueba de ubicación endofítica a través de la raíz se logró determinar la colonización del tejido interno de la planta por parte de los microorganismos inoculados mediante la recuperación de estos de partes de la raíz desinfectadas externamente y de gotas de agua formadas durante el proceso de gutación. La cepa A-30 de *Bacillus cereus* presentó diferencias significativas con respecto al testigo para el incremento del diámetro del tallo de las plantas tratadas. Esto parece indicar una inducción de crecimiento por parte del microorganismo. En términos generales las cepas del género *Bacillus* fueron más eficientes para la colonización del tejido interno de las plantas y las cepas del género *Serratia* lo fueron para el control de la enfermedad mediante aplicación foliar en combinación con el aceite agrícola.

SUMMARY

MIRANDA C., J.E.. 1996. Evaluation of microorganisms antagonistic to the fungus *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet), located in the interior and exterior of the banana plant.

Key words: *Mycosphaerella fijiensis*; Black Sigatoka, *Musa spp*, banana, biological control, antagonistic bacteria, coadjuvants, mineral oil, endophyte, growth inducement

Black sigatoka is the principal disease facing the banana producing industries in the majority of the banana producing countries. Traditional control involves agronomic practices and the frequent use of fungicides. Resistance to these products have been reported and some of them could be removed from the market. CATIE has found positive results with the use of antagonistic microorganisms for the biological control of the disease (Gonzalez, 1995; Ruiz, 1995).

The objective of this thesis is to evaluate the effect of those microorganisms externally applied with the coadjuvants Silwet L-77, Nu-Film 17 and mineral oil, and to determine the efficiency of an endophytic method for antagonists in the case of banana. The evaluation of the coadjuvants took place in the laboratory, greenhouse, and field, while the endophytic test was carried out in the laboratory and greenhouse. In the laboratory, the coadjuvants used did not have any effect in the multiplication of the antagonistic microorganisms. For the greenhouse plants, the strain R-1 from *Serratia marcescens* showed differences with respect to the control by the decrease in the number of spots produced by the pathogen, but its are not statistical differences. The coadjuvants were not significant under the test conditions. In accordance with the results of the greenhouse test, the field test was carried out with the R-1 strain and the coadjuvants. Under natural environmental conditions with low pathogen inoculation levels, the mineral oil and his combination with the strain showed significant differences with respect to the control and the strain alone in terms of disease severity. The combination of Silwet L-77 and the strain showed not significant differences with respect to the mineral oil alone.

The endophytic test was done through the root, making it possible to determine the colonization of inoculated microorganisms in the internal plant tissues through the

examination of root recovery (externally disinfected) and drops of water formed during the guttation process. The A-30 strain of *Bacillus cereus* presented significant differences in the increase of diameter stems of treated plants with respect to the control. This seems to indicate that growth is induced by the microorganism. In general terms, the strains from the genus *Bacillus* were more efficient colonizing internal plant tissues and the strains for the genus *Serratia* were more efficient controlling disease through foliage applications.

Evaluación de microorganismos antagonistas al hongo *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet), colocados en el interior y exterior de la planta de banano.

1 INTRODUCCION.

La producción bananera enfrenta hoy día una situación delicada por la creciente amenaza que significa la enfermedad conocida como Sigatoka Negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet), que en muchas áreas ya es prácticamente incontrolable. Ha sido necesario para los productores implementar la aplicación de fungicidas casi semanalmente, lo que significa, además del costo económico implícito, un problema ambiental para las áreas de producción y las circundantes.

Si a esos costos le son adicionados los problemas en materia de resistencia a fungicidas, que ya se han presentado, y el casi inminente retiro del mercado de algunos productos por la legislación ambiental vigente, es claro que el panorama es difícil para una actividad que representa una de las más importantes entradas de divisas para muchos de los países latinoamericanos.

De acuerdo con SAUMA (1995) la productividad promedio de las plantaciones bananeras de Costa Rica ha venido en constante descenso desde 1989 cuando se producían unas 2731 cajas por hectárea por año, hasta llegar al año de 1994 con tan solo 1850 cajas por hectárea, una reducción de casi un 32%. Si bien es cierto este comportamiento es motivado por diversos factores, sin duda alguna uno de los más importantes, sino el más, es el efecto de la Sigatoka.

A raíz de esta situación se han planteado una serie de iniciativas para mejorar la producción bananera y disminuir la severidad de la enfermedad. Una de estas promovida por

el Area de Fitoprotección del CATIE es la de realizar investigación en tácticas de control biológico que pueda ser implementada con otras tácticas en un posible plan de manejo integrado de la enfermedad.

En el caso del control biológico, el uso de microorganismos antagonistas se presenta como una opción poco desarrollada en la mayoría de los cultivos tropicales, incluso los de mayor importancia económica, como es el caso del banano.

En investigaciones recientes realizadas en el CATIE se ha determinado la existencia de microorganismos con mucho potencial antagónico al agente causal de la Sigatoka Negra. También se ha evaluado la capacidad de algunas cepas de microorganismos para afectar el desarrollo de los tubos germinativos de la ascospora, evitando o alterando así el proceso de penetración.

Uno de los componentes de esa investigación es determinar la mejor forma de colocar los microorganismos en la planta de banano. Esto implica identificar el lugar en la planta en donde es más eficiente el control, sin riesgo de desecación, lavado o daño por radiación ultravioleta.

Para el caso de cultivos como el banano, que se cosechan en áreas de condiciones ambientales difíciles para el establecimiento de microorganismos, y considerando las características propias de la enfermedad, se piensa que el interior de la planta puede ofrecer ventajas con respecto a la ubicación en la superficie. Aunque también debe considerarse el exterior de la hoja, si se dispone de productos capaces de proteger al microorganismo de las condiciones antes mencionadas.

1.1 HIPOTESIS DEL TRABAJO.

La hipótesis que se pretendió probar en el trabajo fue que la eficiencia de microorganismos antagonistas con potencial para el control de la Sigatoka Negra, colocados en el interior del tejido de la planta o distribuidos con coadyuvantes sobre la superficie de la hoja, es igual al posible efecto de poblaciones de antagonistas aplicados al follaje solo con agua.

1.2 OBJETIVOS DEL TRABAJO.

1.2.1 Objetivo Principal.

Con base en lo descrito anteriormente se planteó como principal objetivo evaluar la acción antagonista de algunos microorganismos sobre el agente causal de la Sigatoka Negra, colocándolos en el interior de la planta mediante un método de inoculación endofítica y en el exterior a través del uso de algunos coadyuvantes.

1.2.2 Objetivos Específicos.

Como objetivos específicos de las pruebas realizadas se plantearon los siguientes:

- Evaluar la capacidad como coadyuvantes del Silwet L-77, el aceite agrícola y el NU-FILM, en la aplicación foliar de los microorganismos antagonistas seleccionados.
- Determinar la eficiencia de un método de inoculación endofítica a través de la raíz para el caso del banano.
- Probar la capacidad de los microorganismos de disminuir la tasa de infección de la Sigatoka Negra y de inducir el crecimiento de la planta de banano.

2 REVISION DE LITERATURA.

2.1 EL CULTIVO.

2.1.1 Importancia Económica.

El cultivo del banano se inicia en Costa Rica alrededor del año de 1872 en el Valle de Zent. Con el ingreso de fuertes transnacionales constructoras del ferrocarril en la zona atlántica del país, se inicia la explotación comercial con fines de exportación del fruto (Soto, 1985).

La exportación del banano representa actualmente uno de los principales rubros, junto al turismo y el café, en cuanto a ingreso de divisas a Costa Rica se refiere.

Durante el año de 1993, Costa Rica se colocó como el segundo país exportador de banano en el mundo, únicamente superado por Ecuador, alcanzando un récord de producción de más de 101 millones de cajas de 18,14 Kg netos (Páez y Barrientos, 1994).

Según la FAO (1994), el país produjo 1.827.000 toneladas métricas de banano en 1993, obteniendo la más alta producción de la historia nacional; debido posiblemente a la incorporación de nuevas áreas y la presencia de condiciones climatológicas favorables (Páez y Barrientos, 1994).

Sin embargo la productividad promedio, medida en cajas por hectárea por año, ha venido disminuyendo año con año desde 1989 cuando alcanzó un máximo de 2731 cajas/Ha/año hasta 1994 cuando solamente se produjeron en promedio 1850 cajas/Ha/año (Anexo 1)(Sauma, 1995).

2.1.2 Descripción Botánica.

Las plantas de banano (*Musa sp*) son originarias del Extremo Oriente (India hasta Filipinas), cuyo ancestro fue el banano silvestre de semillas (IICA, 1989).

Las raíces tienen forma de cordón y aparecen en grupos de tres o cuatro. El grosor de la raíz disminuye en forma constante conforme se aleja de la planta. Durante los primeros meses de crecimiento vegetativo, la producción de raíces es abundante (Soto, 1985).

Las raíces son de crecimiento rápido y muy sensibles al déficit o exceso hídrico, ya que la mayor parte de ellas se encuentra en los primeros 30 cm de suelo (Soto, 1985).

La planta es una herbácea de tamaño variable, con pseudotallos aéreos que se originan de cormos carnosos de los cuales surgen numerosas yemas laterales o "hijos". Del cormo surgen además hojas cuyas vainas lo envuelven en forma circular, dando origen al pseudotallo (IICA, 1989; Soto, 1985).

El meristemo apical de la cepa se ubica ligeramente arriba del nivel del suelo durante el período vegetativo, a partir de donde son producidas entre 15 y 25 hojas funcionales o verdaderas (IICA, 1989).

El pseudotallo posee reservas hídricas en proporción de 10:1 con respecto al peso seco del mismo, pudiendo recuperarse sobre un corte o herida entre 350 y 450 cc de líquido en 15 minutos en plantas vigorosas y bien abastecidas de agua (Soto, 1985).

La lámina foliar es delgada, muy verde en su cara superior, su cara inferior es más o menos glauca. La cutícula es irregular y su grosor y características varían mucho entre clones.

La epidermis tiene células con paredes externas más gruesas que las internas. Los estomas son menos frecuentes en la superficie adaxial que en la abaxial, aunque algunos clones como el "Gran Enano" presentan un número muy elevado en ambas superficies (Soto, 1985), aunque siempre es mucho mayor en la abaxial.

En un trabajo realizado por Tapia *et al* (1989) se determinó que el cultivar "Gran Enano" posee mayor número

de estomas sobre el haz que los cultivares "Curraré" y "Pelipita". Además encontraron que la menor densidad estomática se localiza en la región cercana al borde de la lámina foliar.

Esto es determinante en vista de que la mayoría de los hongos y bacterias entran a las plantas a través de sus estomas (Agrios, 1991).

Considerando que la temperatura alta conduce al cierre de estomas (Soto, 1985), las primeras horas del día, así como las últimas de la tarde, serían las mejores para el ingreso de cualquier microorganismo a la cavidad subestomática.

La Sigatoka Negra, al igual que muchos hongos y bacterias, ingresa a través de los estomas, por lo que puede existir una correlación entre el número de estomas en la superficie foliar de cada cultivar con la menor o mayor resistencia relativa a la enfermedad (Tapia *et al*, 1989).

La transpiración de las hojas, por su gran área foliar y distribución estomática, es muy alta, y mayor en los clones de porte bajo, como consecuencia de su mayor volumen foliar activo (Soto, 1985).

Cuando la humedad atmosférica es alta, el índice de transpiración es acompañado por un índice igual de absorción de agua, cuando la hoja está totalmente extendida. Por otro lado, si las condiciones hídricas no son favorables la planta dobla los semilímbos de tal manera que se protege de la radiación solar directa y disminuye el consumo de agua (Soto, 1985).

2.2 LA ENFERMEDAD.

2.2.1 Importancia Económica.

La Sigatoka Negra afecta las hojas y compromete gravemente la producción al disminuir la superficie foliar, además produce una reducción de la calidad de la fruto, al favorecer la maduración prematura (IICA, 1989; CORBANA, 1993).

En Costa Rica la Sigatoka Negra se reportó en octubre de 1979 en la costa Atlántica, y en agosto de 1981 en la costa Pacífica (IICA, 1989).

Desde entonces y hasta la fecha, la Sigatoka Negra se ha convertido en el problema número uno de la producción bananera en Costa Rica, al igual que lo es en el resto de América Central, Colombia y Ecuador (CORBANA, 1992 y 1993).

La enfermedad ha sido beneficiada por factores climáticos, de control de inóculo, falta de opciones de control químico y hasta del mercado bananero internacional (CORBANA, 1993).

En Costa Rica la enfermedad además de ser el principal problema fitopatológico es el de mayor incidencia económica, pues solamente entre 1983 y 1993, los costos por control se incrementaron en un 156% (CORBANA, 1993).

Para 1991 los costos del control por hectárea por año aumentaron en US\$600-800 y el hecho de que el cultivo del banano tenga un alto valor comercial es lo que ha permitido la sobrevivencia de la actividad (CORBANA, 1992).

2.2.2 El Agente Causal.

El agente causal de la Sigatoka Negra es el hongo Ascomycete llamado *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet), que se reproduce en forma sexual y asexual durante su ciclo (CORBANA, 1992).

Un patógeno similar, *Mycosphaerella musicola*, es el agente causal de la Sigatoka Amarilla, la primera de las

enfermedades de las hojas manchadas en bananos y plátanos (Gauhl, 1990).

Las diferencias entre *M. fijiensis* y *M. musicola* se han mencionado desde el inicio del estudio de la enfermedad; por el hecho de ser tan similares en un principio se considero a *M. fijiensis* como una variación de *M. musicola*, sin embargo por las diferencias en las estructuras reproductivas en la etapa asexual y el comportamiento en el campo de ambos hongos se pudo determinar que se trataba de dos especies diferentes de un mismo género (Gauhl, 1992; Tapia, 1993).

Si bien es cierto se ha descrito una forma diferente de la especie *M. fijiensis* (Mulder y Stover, 1976) denominada *M. fijiensis var difformis* el estado sexual, la diferencias taxonómicas entre las dos especies no han sido establecidas claramente (Tapia, 1993).

La ubicación taxonómica del hongo es la siguiente: clase Ascomycetes, subclase Loculoascomycetes, orden Dothideales, familia Dothideaceae, género *Mycosphaerella* (estado sexual) o *Paracercospora* (estado asexual) y especie *fijiensis* (Tapia, 1993).

2.2.2.1 Formas Reproductivas.

El ciclo de vida muestra que posee dos formas de reproducción: la asexual que produce las conidias y la sexual que produce las ascosporas. La espora asexual o conidia corresponde a *Cercospora* y la espora sexual, proveniente de la unión sexual de un gameto masculino con uno femenino, a *Mycosphaerella* (Bustamante y López, 1982).

De la información anterior se desprende que el hongo posee tres cuerpos de fructificación (Bustamante y López, 1982) que son:

- Conidióforo, que produce las conidias (asexual).
- Espermagonio, que libera espermacias (sexual-masculino).
- Peritecio, que libera ascosporas (sexual-femenino).

Los tres tipos de cuerpos son formados en una cámara debajo del estoma de la hoja. En la Sigatoka Negra, las esporas son diseminadas por el viento, pudiendo cualquiera de ellas ser capaz de producir la infección (Bustamante y López, 1982).

La fuente más importante de inóculo son las ascosporas. Factores como la humedad, el rocío, la temperatura y la precipitación determinan la presencia y liberación de ascosporas en el campo (Stover, 1987; Vásquez, 1991).

2.2.2.2 Ciclo de Vida.

El ciclo biológico del patógeno se inicia con la deposición de las esporas sobre el tejido de la hoja. Cuando existen condiciones ambientales favorables se inicia la germinación de las esporas en un periodo de unas 6 horas (Vásquez, 1991).

El hongo ingresa vía poro estomático mediante un tubo germinativo, que luego se ramifica y coloniza varias células vecinas. Esto da como resultado la aparición del síntoma característico conocido con el nombre de "pizca" (CORBANA, 1992).

El desarrollo de las lesiones implica la aparición de espermagonios y peritecios que liberan los respectivos gametos masculino y femenino, respectivamente. Una vez efectuada la fertilización en el peritecio se forman ascas con ocho ascosporas cada una. Estas estructuras son expelidas fuera del peritecio y diseminadas por el viento, colonizando nuevos tejidos sanos (Bustamante y López, 1982).

El ciclo asexual implica la formación de un esporodoquio que produce conidióforos y sus conidias, que son dispersadas por el salpique de agua, germinando y penetrando a través de estomas (Bustamante y López, 1982).

2.2.3 Síntomas de la enfermedad.

La descripción más apropiada y más utilizada de la sintomatología que presentan las plantas en las hojas afectadas por la enfermedad es dada en 1969 por D. Meredith y J. Lawrence para el caso de la Sigatoka en Hawaíi; esta plantea seis estadios de desarrollo de la infección que se definen a continuación:(Meredith y Lawrence, 1969)

Estadio 1: Pequeñas decoloración o despigmentación observable solo en el envés de la hoja. Incluye una pequeña pizca de color café rojizo dentro del área descolorada. Se observa al colocar la hoja contra la luz.

Estadio 2: Las decoloraciones forman pequeñas estrias de 2 o 3 mm de color café rojizo visible en el haz y en el envés.

Estadio 3: Las estrias aumentan su grosor y longitud, manteniéndose de color café rojizo.

Estadio 4: Las estrias se ensanchan tomando forma elíptica. Hay cambio de color a café oscuro y negro. Están rodeadas por un halo claro, pardo y acuoso. Se considera este síntoma como mancha.

Estadio 5: La mancha es negra en el centro y esta rodeada por un halo amarillo (clorótico). El centro de la lesión empieza a hundirse.

Estadio 6: La mancha nuevamente sufre cambios de color a blanco grisáceo, se deprime y se seca.

El tiempo de duración del desarrollo de estos síntomas esta estrechamente relacionado con las condiciones climáticas prevalecientes en una zona específica (rango de 15 a 30 días).

2.2.4 Condiciones climáticas que afectan el desarrollo de la enfermedad.

La precipitación, la humedad relativa, la temperatura y el viento son las principales condiciones climáticas que afectan el desarrollo de la enfermedad (CORBANA, 1992).

La precipitación es determinante en la liberación del inóculo (CORBANA, 1992), y provee de condiciones óptimas para la germinación de conidios y ascosporas. En esto también la humedad relativa juega un papel muy importante al mantener una película sobre la superficie de las hojas.

El viento es el principal factor diseminador de las ascosporas una vez que estas han sido liberadas.

La amplitud de temperaturas favorables para el desarrollo de la infección va desde los 22°C hasta los 28°C, con un óptimo en 26°C (CORBANA, 1992).

2.2.5 Prácticas de control tradicional.

Existen en la actualidad varios enfoques de control que involucran prácticas agronómicas, predicción de aplicaciones de compuestos químicos basado en la precipitación, nivel de manchado de las hojas e historial de la enfermedad en el área. Todas con base común en el uso de agroquímicos (Stover, 1987).

Las prácticas culturales son principalmente tres: la construcción y mantenimiento de drenajes, el combate de malezas y la deshoja, comprendida como una poda de sanidad (CORBANA, 1992).

2.2.5.1 Control Químico.

Los fungicidas son el medio de control más importante en Sigatoka Negra (CORBANA, 1992). Durante tres décadas de presencia de la enfermedad han sido la base principal de su control (Stover, 1990).

Los fungicidas importantes en el control de *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet) se pueden dividir en

tres grupos principales: protectores, sistémicos locales y sistémicos generales.

Los primeros no penetran en el tejido de la planta sino que forman una capa protectora, siempre y cuando la técnica y formulación de la aplicación sea eficiente. Un ejemplo de estos productos es la familia de los Ditiocarbamatos, entre los que se incluyen el mancozeb y el clorotalonil (CORBANA, 1992).

Los fungicidas sistémicos locales penetran en la hoja pero no se trasladan a otras zonas de la planta, ni de una hoja a otra. En este grupo el único que se utiliza en banano es el tridemorph, un inhibidor de la biosíntesis del ergosterol (CORBANA, 1992).

Dentro del tercer grupo se incluyen los fungicidas que si penetran en el tejido y que además se mueven de un lugar a otro o en general a toda la planta. Este grupo incluye los más importantes dentro del control de la enfermedad.

Se utilizan dos familias de químicos: Benzimidazoles y Triazoles. Los Benzimidazoles, que actúan sobre la división celular, están representados por varios productos, pero sin duda el más común es el benomil. Los Triazoles actúan en el proceso de biosíntesis del ergosterol, en una etapa llamada dimetilación. El único representante de esta familia es el propiconazole (CORBANA, 1992).

La gran especificidad de algunos de los fungicidas más utilizados en el control de la Sigatoka Negra aumenta la posibilidad del desarrollo de resistencia a estos productos, como es el caso de resistencia de cepas del hongo a algunas de las familias tradicionalmente utilizadas, como el caso de los benzimidazoles (Stover, 1989; CORBANA, 1992).

El número de aplicaciones necesarias para el control de la enfermedad, presenta una serie de cambios durante los últimos años (Anexo 2).

Desde 1987 a 1990 el número disminuyó desde 35

aplicaciones hasta 16 aplicaciones al año, principalmente por la utilización de moléculas de fungicidas hasta ese momento muy eficientes, pero a partir de 1990 se ha venido incrementando nuevamente la cantidad de aplicaciones requeridas para un control adecuado, llegando a 36 o 37 durante el año de 1993 (CORBANA, 1993).

2.2.5.2 Aceite Agrícola.

La mayor parte de las aplicaciones que se realizan actualmente para controlar a la Sigatoka Negra incluyen al aceite agrícola, ya sea como coadyuvante o como controlador mismo de la enfermedad.

Calpouzos indica las interesantes características de los aceites minerales y su mecanismos de acción para el control de diversas enfermedades pero con énfasis en la Sigatoka Amarilla (Calpouzos, 1966).

Se señala que el aceite no solo posee propiedades protectoras sino también terapéuticas en el caso de la Sigatoka del banano (Calpouzos, 1966; Pérez *et al*, 1981).

Un efecto del aceite agrícola sobre la Sigatoka en banano se atribuye a la alteración que causa el producto sobre los niveles de carbohidratos. El aceite disminuye los niveles de azúcar en las hojas jóvenes y así reduce la enfermedad que, por la mayor concentración natural de esta sustancia en esas hojas, tiene más incidencia en ellas (DU PONT, s.f.).

En una prueba realizada en Cuba, se determinó que el aceite mineral inhibía fuertemente la germinación y la penetración del hongo. Inhibe también la evolución de los síntomas y la formación de conidios (Pérez *et al*, 1981).

En otro ensayo se discute parcialmente sobre resultados que indican que dosis mayores a 15 l/ha de aceite mineral han tenido buen efecto sobre el control de la Sigatoka Negra (Marín y Romero, 1990).

También la literatura indica que existe un efecto

negativo sobre la producción del banano. Un aparente efecto fitotóxico del aceite fue estudiado en el cultivar "Gran Nain", en Israel, donde la enfermedad no se presenta (Israeli *et al*, 1993).

El aceite mejora la penetración de los fungicidas sistémicos y esto tiene profundos efectos sobre el patógeno dentro de la hoja. El producto es efectivo cuando se aplica en emulsión con agua y cuando se aplica solo, siendo más eficiente en el control de la enfermedad la última forma cuando las condiciones de precipitación son fuertes (Stover, 1989).

2.3 EL CONTROL BIOLÓGICO.

2.3.1 Conceptos, Objetivos y Estrategias del Control Biológico.

"El control biológico es la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades productoras de la enfermedad de un patógeno o parásito por uno o más organismos, diferentes del hombre, realizado naturalmente o mediante manipulación del ambiente, el hospedero, el antagonista o por introducción masiva de uno o más antagonistas" (Baker y Cook, 1974).

El control biológico raramente elimina a un patógeno de un sitio, más bien reduce su número o su habilidad de producir enfermedad; este control puede ser llevado a cabo con una pequeña o ninguna reducción de la población del patógeno, o tal vez sin prevenir la infección (Baker y Cook, 1974).

Los objetivos del control biológico incluyen (Baker y Cook, 1974):

- La reducción del inóculo del patógeno.
- La reducción de la infección del hospedero por el

patógeno.

- Reducción de la severidad del ataque del patógeno.

Se pueden enumerar tres grupos diferentes de estrategias a desarrollar para alcanzar los anteriores objetivos: el combate biológico del inóculo, la protección biológica de la superficie vegetal y el combate a través de la inducción de resistencia (Jiménez, 1986).

La primera estrategia consiste en destruir, inhibir o evitar la formación del inóculo. Esta estrategia puede darse sobre o en los tejidos del hospedante, antes o después de la infección (Jiménez, 1986).

La protección biológica de la superficie de la planta se consigue a través de la colonización de estas por parte de un organismo antagonista agresivo al patógeno antes de que este llegue o que se presenten las condiciones necesarias para su desarrollo (Jiménez, 1986)

La inducción de resistencia consiste en introducir razas avirulentas o microorganismos antagonistas que puedan provocar en el hospedante una forma de resistencia al ataque del patógeno (Jiménez, 1986).

2.3.2 Organismos antagonistas.

Mecanismos directos de control biológico incluyen antibiosis, competencia por nutrientes o nicho, y parasitismo o depredación. La antibiosis es tal vez el mecanismo más estudiado (Cook, 1993).

Es importante comprender que muchos agentes potenciales para el control biológico pueden estar bien identificados y que también su modo de acción puede ser claramente dilucidado, pero podrían fallar o no suministrar un eficiente control. Esto puede deberse a que en la mayoría de los casos no conocemos los requerimientos ecológicos para su supervivencia, colonización, y/o actividad antagonista (Jacobsen y Bäckman, 1993).

Muchos ejemplos del uso de antagonistas para reducir las enfermedades foliares causadas por bacterias y hongos son reportados en estudios de invernadero y laboratorio (Lindow, 1985).

El creciente interés científico por el control biológico de los patógenos de las plantas es respuesta, en parte, del aumento del conocimiento público acerca de los plaguicidas químicos y sus efectos negativos. Sin embargo el control biológico debería y puede ser valorizado por sus propios méritos (Cook, 1993).

El interés en el control biológico con microorganismos es también respuesta del desarrollo de las nuevas herramientas de la biotecnología, que son particularmente aplicables a microorganismos (Cook, 1993).

Sin embargo hay también límites en el conocimiento de como hacer uso de las comunidades naturales de microorganismos, por lo que el control biológico de patógenos depende actualmente de microorganismos introducidos (Cook, 1993).

Las superficies de la parte aérea de la planta proporcionan un habitat para microorganismos epífitos. Muchos de los cuales son capaces de influenciar el crecimiento de los patógenos (Blakeman y Fokkema, 1982).

La actividad de saprófitos y patógenos sobre la hoja depende entre otros factores de las condiciones microclimáticas de la superficie de la planta, así como de su entorno químico (Blakeman y Fokkema, 1982).

Los organismos introducidos muchas veces no son lo eficientes que se esperaba a partir de pruebas preliminares, usualmente porque son ecológicamente desubicados y colocados en ambientes donde deben cumplir una función de control (Cook, 1993).

El control biológico de patógenos foliares depende de un conocimiento amplio de las interacciones en el filoplano como para desarrollar adecuadas estrategias de manejo. El

filoplano es diverso y complejo, esto debe ser considerado como un factor básico durante el desarrollo de investigaciones con posibles biocontroladores (Spurr, 1990)

El uso de microorganismos para el control biológico de las plagas debe entonces basarse en un conocimiento previo de las condiciones adecuadas al organismo. Donde se debe determinar, entre otros aspectos, el momento más propicio para la aplicación del inóculo, la aplicación del microorganismo en la forma y la cantidad apropiadas (Blakeman y Fokkema, 1982).

El control a través de antagonistas puede desarrollarse de dos maneras diferentes: una estableciendo al antagonista como un residente de la superficie de la hoja y otra con aplicaciones periódicas del mismo mediante un método físico como la aspersion (Spurr, 1976).

En todos los casos el control biológico en la superficie aérea con antagonistas en el futuro dependerá no solo de su propia efectividad, sino también de un costo competitivo con respecto al control químico tradicional y de un amplio conocimiento de los efectos de la aplicación de microorganismos (Blakeman y Fokkema, 1982).

2.3.3 El control biológico de la Sigatoka Negra

Se han desarrollado muy pocos ensayos de control biológico de la Sigatoka Negra. Todos los trabajos reportados hasta el momento han sido realizados por el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), en Turrialba, Costa Rica.

El primer ensayo es llevado a cabo por Jiménez *et al* en 1985. Ellos realizaron estudios sobre combate biológico de la enfermedad mediante bacterias epífitas. Se ejecutaron lavados de hojas de banano con síntomas incipientes de Sigatoka, obteniéndose de estos 225 cepas bacteriales que fueron evaluadas en su capacidad antagónica *in vitro*. El resultado indicó la presencia *in vitro* de 12 cepas

bacteriales antagonistas a *M. fijiensis*.

Posterior a este ensayo González, 1995, Rodríguez, 1995, y Ruiz, 1995, trabajaron con bacterias antagonistas al agente causal de la enfermedad.

La búsqueda y evaluación de microorganismos antagonistas al hongo fueron los objetivos del ensayo realizado por González (1995), obteniendo 13 cepas con buenas características. Pruebas de laboratorio, invernadero y campo mostraron resultados satisfactorios.

Trabajando con algunos de esos microorganismos Ruiz (1995) evaluó el efecto de diversos substratos sobre esas cepas y su capacidad antagónica, obteniendo buenos resultados con melaza en invernadero, sin embargo no encontró diferencias significativas entre los tratamientos con substratos y el testigo no tratado en el campo.

Orientado hacia conocer la efectividad de microorganismos antagonistas vía endofítica, Rodríguez (1995) no encontró efecto de los microorganismos hacia el período de incubación de la Sigatoka Negra.

En el ensayo se hizo uso de una técnica denominada inoculación endofítica inundativa a través de la raíz.

2.3.4 Inoculación endofítica de microorganismos.

La técnica de inoculación endofítica inundativa a través de la raíz (Rodríguez, 1995) consiste en sumergir esa parte de plantas jóvenes en una solución concentrada de microorganismos por un tiempo suficiente para que estos ingresen al tejido vegetal.

El establecimiento de microorganismos dentro del tejido depende de la especie del mismo microorganismo y la de la planta tratada. Con esta técnica se han reportado inoculaciones exitosas en 9 familias de plantas: Solanaceae, Cucurbitaceae, Cruciferae, Leguminosae, Umbelliferae, Chenopodiaceae, Ranunculaceae, Rosaceae y Compositae (Rodríguez, 1995).

Se han utilizado microorganismos como *Fusarium* no patogénico, VMT no virulento, *Xanthomonas* y *Glomus* (Kijima, 1993).

2.3.5 Uso de adherentes en el Control Biológico.

Dentro de los factores que influyen el potencial "infectivo" de una bacteria epífita deben incluirse la habilidad para resistir la sequía, la radiación ultravioleta y la remoción física de la superficie de la planta por la acción de la lluvia y el viento (Romantschuk, 1992).

Las bacterias son las primeras colonizadoras del filoplano, ventaja que poseen sobre los hongos, además, poseen gran velocidad de crecimiento y la capacidad de utilizar los nutrimentos en diversas condiciones (Calvo y Vargas, 1989).

El uso de adherentes podría ser una forma de mejorar las condiciones en que son colocados los microorganismos antagonistas sobre el filoplano.

Calvo y Vargas (1989) desarrollaron un ensayo para probar diferentes adherentes con el objetivo de mejorar el tiempo de persistencia de bacterias antagonistas al hongo *Mycena citricolor* en café, obteniendo resultados con pocas diferencias entre el uso o no de adherentes.

Zidack *et al* realizaron ensayos con el uso de coadyuvantes organosilicones no iónicos que demuestran la capacidad de estos de facilitar el ingreso de los microorganismos a la cavidad subestomática (Zidack *et al*, 1992).

En otros ensayos se ha hecho uso de coadyuvantes como el NU-FILM 17 en la aplicación de microorganismos antagonistas. El NU-FILM 17 es un agente dispersante especialmente diseñado para proteger la vida útil de los productos aplicados. Es derivado de resina de pino siendo por tanto, un adhesivo natural (Gutiérrez, 1991).

3 MATERIALES Y METODOS.

3.1 LOCALIZACION.

El trabajo se realizó en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), en Turrialba, en la provincia de Cartago, y en la Escuela de Agricultura de la Región Tropical Húmeda (EARTH), en Las Mercedes, Pocora de Guácimo, provincia de Limón, Costa Rica.

Turrialba tiene una altitud de 602 msnm y esta ubicada a los 9°55'21" N y 83°39'40" O. Posee una temperatura promedio anual de 21,7 °C, precipitación promedio anual de 2065 mm y humedad relativa promedio anual de 87%.

Las Mercedes de Pocora esta ubicada en la Zona Atlántica de Costa Rica. Los datos desde 1992 a 1994 indican que la temperatura promedio anual es de 25,8 °C y el promedio de precipitación anual es de 3325 mm. (EARTH, 1994)

Los trabajos de laboratorio e invernadero se llevaron a cabo en el Laboratorio de Diagnóstico MIP-CATIE y en su invernadero, en el CATIE. La prueba de campo se realizó en terrenos experimentales de la EARTH, en Las Mercedes, Pocora de Guácimo.

3.2 MATERIAL EXPERIMENTAL.

3.2.1 Microorganismos utilizados en la investigación.

Para realizar la investigación se utilizaron cuatro microorganismos previamente seleccionados de la colección del laboratorio de diagnóstico MIP-CATIE. Los microorganismos fueron seleccionados con base en pruebas realizadas anteriormente donde se evaluó su actividad quitinolítica, comportamiento antagonista y características biológicas relevantes (Okumoto, 1993; González, 1995).

Los organismos seleccionados fueron: *Serratia marcescens* cepa R-1, *Serratia marcescens* cepa A-23, *Bacillus cereus* cepa A-30 y *Bacillus sp.* cepas Q-2 y Q-5.

3.2.2 Variedad de banano utilizada.

Para realizar las evaluaciones se utilizaron plantas de la variedad "Gran Enano" del grupo "Cavendish", suministrados por la Escuela de Agricultura de la Región Tropical Húmeda (EARTH) para las pruebas con coadyuvantes y por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de CORBANA para la de inoculación endofítica.

3.2.3 Coadyuvantes utilizados en la investigación.

Se utilizaron tres coadyuvantes para las pruebas de antagonismo: Silwet L-77, Nu-Film 17 y aceite agrícola.

El Silwet L-77 es un organosilicon con capacidad de romper la tensión superficial del agua hasta 100 veces superior a los productos tradicionalmente utilizados en agricultura para ese fin (Zidack, N.K. *et al*, 1992).

El Nu-Film 17 es un producto generado a partir de una resina natural. Su capacidad como adherente es la característica más relevante en relación con la aplicación foliar de agroquímicos (Gutiérrez D., C., 1991).

El aceite agrícola (aceite parafinado) es un adherente y penetrante comúnmente utilizado en los cultivos de banano y plátano en aspersiones foliares solo o en emulsiones con los fungicidas aplicados para el combate de la Sigatoka Negra (Marín, D., *et al*, 1990)

El aceite posee capacidad protectora y terapéutica contra la Sigatoka del banano (Calpouzos, 1966; Pérez *et al*, 1981). La disminución de los niveles de carbohidratos en la superficie foliar por parte del aceite es una de las formas de afectar al patógeno (DU PONT, s.f.)

3.3 PRUEBAS DE ANTAGONISMO CON EL USO DE AGENTES TENSO ACTIVOS (Silwet L-77 y NU-FILM 17) Y EL ACEITE AGRICOLA.

3.3.1 Prueba del efecto del uso de coadyuvantes sobre la multiplicación de los microorganismos.

3.3.1.1 Procedimiento de preparación de los tratamientos.

Como una prueba complementaria y preliminar a la aplicación de los microorganismos se verificó el efecto de los coadyuvantes utilizados sobre las cinco cepas.

A partir de colonias desarrolladas sobre platos petri con agar nutriente (DIFCO) más quitina coloidal se prepararon 100 ml de soluciones concentradas de cada uno de los microorganismos, lavando la superficie del medio con agua destilada estéril (ADE).

Se midió la concentración inicial de cada solución y se dividió el total en cuatro erlenmeyer de 125 ml, conteniendo cada uno 25 ml de la solución respectiva. A estos erlenmeyers se les agregaron los coadyuvantes NU-FILM 17, Silwet L- 77 y aceite agrícola, respectivamente y uno permaneció solo con agua actuando como testigo.

El Silwet fue colocado en dosis del 0,1 % v/v; el NU-FILM 17 en dosis del 0,03 % v/v, y el aceite en dosis del 0,5 % v/v. En total se trabajó con veinte tratamientos compuestos por cinco cepas, tres coadyuvantes y el agua.

Una vez identificados y sellados los erlenmeyers se colocaron en un agitador (reciprocal shaker) durante 24 horas a 75 rpm.

3.3.1.2 Variable considerada y análisis de los datos:

La evaluación correspondió al conteo de células bacteriales por mililitro (concentración) el día de preparación de los tratamientos y 24 horas después, utilizando un contador Petroff-Hausser, para determinar el

comportamiento en las concentraciones de microorganismo.

Se realizó un análisis de varianza de los datos de concentración bacterial obtenidos, con un diseño factorial de dos factores: cepa y coadyuvante y sus interacciones. También se realizaron pruebas de medias para las cepas y para los coadyuvantes independientemente.

3.3.2 Prueba de antagonismo con plantas desarrolladas en invernadero.

La acción del Silwet L-77, así como el efecto del aceite agrícola Agrol y el adherente protector NU-FILM 17 como coadyuvantes, fueron evaluados mediante aplicaciones sobre plantas sanas de soluciones de los microorganismos con los coadyuvantes y la posterior inoculación del patógeno.

3.3.2.1 Procedimiento de preparación y aplicación de los tratamientos.

Se utilizaron cuatro microorganismos antagonistas, dos *Serratias marcescens* cepas R-1 y A-23, un *Bacillus cereus* cepa A-30 y un *Bacillus sp.* cepa Q-2.

Primeramente los microorganismos fueron reproducidos en un medio agar nutriente con quitina coloidal, luego se recogieron con agua destilada estéril preparando una solución con concentración de 10^7 ufc/ml. Una vez calibradas las concentraciones de todos los microorganismos, se inoculó con 50 mililitros de la solución en un litro de caldo nutritivo más quitina, preparado con 8 gramos de caldo nutritivo en polvo (DIFCO), 22,5 gramos de quitina coloidal (0,02% v/v) y 2,0 gramos de dextrosa (DIFCO); con pH regulado con NaOH entre 7 y 8.

Se inocularon dos litros de caldo con cada una de las cepas y dos más se prepararon pero se mantuvieron estériles, para un total de 10 litros, los que se colocaron en un agitador (reciprocal shaker) por 24 horas a 100 rpm.

Una vez transcurrido ese tiempo se separaron 500 mililitros del caldo y se les agregó uno de los coadyuvantes Silwet L-77 (0,1% v/v), aceite agrícola AGRQL (0,5% v/v) y NU-FILM 17 (0,03% v/v), formando los siguientes tratamientos:

1. *S. marcescens* (cepa R-1) + Silwet L-77
2. *S. marcescens* (cepa A-23) + Silwet L-77
3. *B. cereus* (cepa A-30) + Silwet L-77
4. *Bacillus sp.* (cepa Q-2). + Silwet L-77
5. *S. marcescens* (cepa R-1) + Aceite
6. *S. marcescens* (cepa A-23) + Aceite
7. *B. cereus* (cepa A-30) + Aceite
8. *Bacillus sp.* (cepa Q-2). + Aceite
9. *S. marcescens* (cepa R-1) + NU-FILM 17
10. *S. marcescens* (cepa A-23) + NU-FILM 17
11. *B. cereus* (cepa A-30) + NU-FILM 17
12. *Bacillus sp.* (cepa Q-2). + NU-FILM 17
13. *S. marcescens* (cepa R-1) + Agua estéril
14. *S. marcescens* (cepa A-23) + Agua estéril
15. *B. cereus* (cepa A-30) + Agua estéril
16. *Bacillus sp.* (cepa Q-2). + Agua estéril
17. Caldo Nutritivo Estéril + Silwet L-77 (testigo)
18. C.N.E. + Aceite (testigo)
19. C.N.E. + NU-FILM 17 (testigo)
20. C.N.E. solo (testigo)
21. Agua Destilada Estéril (ADE)(Testigo absoluto)

Los tratamientos fueron aplicados sobre plantas sanas de tres meses de edad sembradas en macetas de tres kilogramos (#600), con tierra esterilizada con bromuro de metilo. Se establecieron cinco repeticiones de una planta cada una, para cada tratamiento en un Diseño de Bloques al Azar.

La aplicación de los tratamientos se realizó con un atomizador manual convencional, asperjando ambas caras de las hojas uno y dos de cada planta. La numeración de las hojas se hace con respecto a la hoja candela, siendo la número uno la más cercana a esta y la número dos la siguiente, contando hacia abajo (CORBANA, 1992).

Una vez aplicados los tratamientos, las plantas permanecieron un día más en el invernadero y luego fueron llevadas al campo donde se expusieron durante ocho días a la presión del inóculo natural. Se colocaron luego en una zona cercana al invernadero, expuestas a las condiciones ambientales del exterior.

La exposición en el campo permite la inoculación de la enfermedad con ascosporas, estructuras que son más comunes en esas condiciones y sobre las que se ha notado el efecto de los microorganismos (González, 1995).

3.3.2.2 Variables consideradas y análisis de los datos.

Dieciocho días después de colocadas las plantas en el espacio mencionado, se evaluó el desarrollo de la enfermedad a través de la observación de la aparición de síntomas en las hojas aplicadas utilizando la escala de Mourichon (1990), en la que se determinan cinco estados de desarrollo de las estrias: Estado 1, puntos de un diámetro inferior a 0.5 mm de longitud; Estado 2, estrias rojizas de aproximadamente 4 mm de longitud; Estado 3, estrias de más de 4 mm de longitud; Estado 4, mancha rojiza ovalada o elíptica; y Estado 5, mancha con presencia de un halo clorótico.

Para el caso de esta prueba se realizó una medición contabilizando únicamente el número de estrias en Estados 2 y 3, que son más fácilmente identificables, presentes en un marquito de 9 cm² colocado al azar en dos posiciones de la hoja número tres (número uno al momento de la aplicación) de cada planta: una en la zona apical y la otra en la zona

media de la hoja. No se discriminó sobre los dos estados considerados, obteniendo un único valor para el número de pizcas. Mediante el uso del programa estadístico SAS se examinaron los datos, previamente transformados al logaritmo natural, a través de un análisis de varianza y un análisis factorial considerando las cepas, los coadyuvantes y sus interacciones.

3.3.3 Prueba de antagonismo en campo.

Considerando los resultados del ensayo de invernadero y con los antecedentes de trabajos anteriores (González, 1995; Okumoto, 1993), se seleccionaron cinco tratamientos y se estableció una prueba de campo con ellos y un testigo no tratado. La prueba se efectuó entre el 10 de mayo (trasplante del material al campo) y el 1 de noviembre (última evaluación) de 1995.

3.3.3.1 Selección del área de trabajo.

Se evaluaron varios lugares de la finca comercial de la EARTH. El lugar elegido estaba cerca de la plantación comercial, para que esta suministrara el inóculo inicial de *M. fijiensis*, pero suficientemente distante (35-40 m) como para evitar la deriva de las atomizaciones aéreas regulares con fungicidas que se realizan para controlar la enfermedad en el área comercial.

Además, la fertilidad, el contenido de materia orgánica y otras características relevantes del suelo se analizaron para asegurar que fueran propicias para el cultivo del banano.

Para conocer la fertilidad del sitio, se realizó un análisis del suelo desde unos 60 cm de profundidad, aproximadamente hasta donde llegan la mayoría de raíces del banano.

Se seleccionó un lugar cubierto con charrales y algunos árboles colonizadores que anteriormente se

utilizaba como un potrero. Se eliminó la vegetación mediante chapas, sierras y finalmente el uso de herbicidas sistémicos como glifosato y algunos quemantes como paraquat. La eliminación de malezas se mantuvo durante todo el período experimental.

Se construyeron alrededor de 400 metros de canales de drenaje, distribuidos en: uno secundario de unos 200 m que atravesaba toda el área y varios canales terciarios que conectados a este, drenaban pequeñas zonas específicas (Anexo 3). Con estos canales se eliminó el exceso de agua que existía y se mejoraron mucho las condiciones del lugar.

3.3.3.2 Instalación de trampa de ascosporas.

Con el fin de medir la cantidad de inóculo presente a lo largo del tiempo que duró el experimento, se instaló en la parcela experimental una trampa volumétrica para esporas tipo Hirst (Burkard Manufacturing Co. Ltd, Rickmansworth, Inglaterra) . También se instaló una en la plantación comercial, durante un período de un mes, para comparar los niveles de inóculo en los dos sitios, en plantas de edades similares.

Estas trampas, que son accionadas por una batería de 12 voltios, registraron la cantidad de esporas por semana a través de una cinta cubierta con un adhesivo conocido como cera de vaselina, compuesta por 150 ml de vaselina, 18 gramos de parafina y 18 gramos de fenol.

La cinta una vez retirada de la trampa se dividió en siete secciones (una por día) y se fijaron con Gelvatol (un plástico soluble en agua, Burkard Manufacturing Co. Ltd.) en portaobjetos para realizar la lecturas correspondientes.

Las trampas se instalaron de tal forma que el orificio de succión quedó a una altura de 2,4 metros desde el suelo, que es la más utilizada en estos casos.

3.3.3.3 Instalación del pluviógrafo.

Para medir la precipitación se instaló un pluviógrafo mecánico Wilh Lambrecht con registro mínimo de 0,1 milímetros de agua por hora, colocado sobre una plataforma de metal. La parte más alta del instrumento estaba a 1,25 m sobre el suelo.

El pluviógrafo registró la precipitación semanal en el sitio del experimento durante todo el período de trabajo.

3.3.3.4 Establecimiento de parcelas experimentales.

Para evaluar los tratamientos se establecieron en el campo cinco parcelas de 25,0 m² cada una, con nueve plantas de cuatro meses de edad por parcela sembradas a 2,5 m entre plantas, en tres bolillo; las parcelas se distanciaron tres metros entre sí, y los bloques (repeticiones) cuatro metros, para evitar la deriva durante las aplicaciones. Se estableció un Diseño de Bloques de parcelas distribuidas Completamente al Azar (DBCA),

Se tomó en cuenta la ubicación de la fuente de inóculo inicial (plantación comercial) para la distribución de los bloques, evitando así un error en el análisis del comportamiento de los tratamientos (Anexos 4).

El manejo agronómico, con excepción del control de Sigatoka, fue lo más aproximado posible al de la plantación comercial, considerando el carácter experimental del área.

La única práctica agronómica, además del control de la enfermedad con fungicidas, que se modificó para el caso del experimento fue la eliminación (deshoja) y despunte de las hojas dañadas por la misma enfermedad. Normalmente se elimina todo el tejido afectado por la enfermedad lo antes posible.

En la parcela experimental se trató de eliminar lo menos posible de área foliar mientras esta no estuviese necrozada, las hojas afectadas se eliminaron solo cuando el área necrozada fuera superior al 33% del total, esto con el

fin de asegurar un nivel conveniente de inóculo al permitir un aumento en el número de peritecios maduros.

3.3.3.5 Procedimiento de preparación y aplicación de los tratamientos.

De acuerdo con el análisis de la prueba en invernadero se decidió evaluar en el campo un solo microorganismo, la bacteria *Serratia marcescens* cepa R-1, en combinación con los coadyuvantes Silwet L-77, NU-FILM 17 y con el aceite agrícola, además de utilizar un testigo de plantas no tratadas y uno de plantas tratadas con aceite solo, con el fin de diferenciar su efecto fungistático del efecto antagonista del microorganismo. Los tratamientos se asperjaron con frecuencia semanal entre aplicaciones y durante ocho semanas (ocho aplicaciones).

El Silwet L-77 se aplicó en dosis del 0,1% v/v, el aceite agrícola en dosis del 0,5% v/v y el NU-FILM 17 en dosis del 0,03% v/v, formando los siguientes tratamientos:

1. *S. marcescens* cepa R-1 + Silwet L-77
2. *S. marcescens* cepa R-1 + NU-FILM 17
3. *S. marcescens* cepa R-1 + Aceite Agrícola
4. *S. marcescens* cepa R-1
5. Aceite Agrícola
6. Testigo absoluto

El microorganismo fue reproducido y preparado en igual forma que para la prueba en el invernadero y estandarizado a una concentración de 10^6 ufc/ml.

Se inició con la aplicación de un litro por parcela, en las cinco correspondientes al tratamiento, y se finalizó con la aplicación de dos litros por parcela, esto motivado por el crecimiento de las plantas. La aplicación se realizó con aspersoras manuales de alta presión, SUPER 4 Modelo 425-13 (GUARANY), con capacidad para cinco litros.

Los tratamientos fueron aplicados a todo el follaje de las tres plantas internas de cada parcela, para un total de quince plantas por tratamiento. Las seis plantas externas (tres a cada lado) funcionaron como barreras para evitar la deriva durante las aplicaciones. El control de la Sigatoka en estas plantas se realizó únicamente a través de la deshoja y el despunte.

Con el fin de disminuir aún más los posibles problemas con el viento (deriva), las aplicaciones se realizaron entre 6:00 am y 9:00 am, horas en las que prácticamente no se presentan corrientes fuertes.

3.3.3.6 Variables consideradas y análisis de los datos.

Las variables consideradas fueron la incidencia y la severidad de la enfermedad, medidas en forma semanal.

Para las evaluaciones se consideraron únicamente aquellas hojas que habían sido tratadas desde el estado de candela, por lo que la primera evaluación se realizó 28 días después de la primera aplicación para dar tiempo al desarrollo de las hojas y a la aparición de los síntomas de la enfermedad en las mismas; se completaron en total ocho evaluaciones.

Para la evaluación se hizo uso de la escala de Stover modificada por Gauhl, que es una evaluación visual del área foliar enferma en todas las hojas consideradas, excepto la hoja candela y las hojas agobiadas. La escala se presenta en el Cuadro 1.

Siguiendo el procedimiento recomendado, se estimó el área total cubierta por los síntomas de la enfermedad en cada hoja evaluada y se calculó el porcentaje que esa área representa en la hoja completa.

Cuadro 1: Escala de Stover modificada por Gauhl, 1989.

PORCENTAJE DE TEJIDO AFECTADO	GRADO
hasta 10 manchas	1
menos de 5 %	2
6 - 15 %	3
16 - 33 %	4
34 - 50 %	5
mayor de 50 %	6

Con la información obtenida con esta escala se calculó el índice de enfermedad (I.E.) para cada planta, entendido como la suma del número de hojas en cada grado por el grado correspondiente, la sumatoria se divide por el número total de hojas evaluadas en la planta.

$$I.E. = \frac{\sum_{N}^i (n * g)}{N}$$

Donde:

I.E.= Índice de enfermedad de la planta.

n= Número de hojas en cada grado de Stover.

g= Grado de Stover correspondiente.

N= Número total de hojas evaluadas en la planta.

Una vez obtenidos estos índices se establece un Promedio Ponderado de Infección para cada repetición (PPIr) (parcela) por semana. Este es el promedio de los índices de la enfermedad de las tres plantas tratadas y evaluadas en cada parcela.

$$\text{PPIr} = \frac{\Sigma \text{I.E.}}{3}$$

Donde:

PPIr= Promedio ponderado de infección por repetición.

I.E.= Índice de enfermedad de cada una de las tres plantas evaluadas.

De tal manera que se obtuvieron cinco datos semanales (uno por repetición) para cada tratamiento. Con estos datos se realizó un análisis estadístico del área bajo la curva del progreso de la enfermedad y una prueba de medias a través del programa SAS. Se analizaron siete de las ocho semanas pues no se consideró la primera evaluación, esto debido a que los datos de esa evaluación (ceros) no fueron representativos ya que aún no era posible observar síntomas de la enfermedad en las hojas que correspondía evaluar.

3.4 PRUEBA DE UBICACION ENDOFITICA A TRAVES DE LA RAIZ.

La prueba se realizó en el invernadero utilizando plantas de banano con tres hojas verdaderas, producidas a través del cultivo de tejidos por el laboratorio que para ese fin tiene la Corporación Bananera Nacional S.A. (CORBANA S.A.).

La técnica utilizada para hacer ingresar las bacterias es la de inoculación endofítica inundativa a través de la raíz, que consiste en sumergir esa parte de la planta en soluciones acuosas altamente concentradas de los microorganismos antagonistas, durante cuatro horas con el objetivo de que las células bacterianas colonicen el exterior e interior de la raíz.

3.4.1 Preparación del material experimental.

Las plantas fueron sembradas primero en una mezcla de tierra esterilizada en un horno eléctrico a 100 °C (70%) y arena (30%) para promover su desarrollo y adaptación, de acuerdo con la recomendación del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de CORBANA S.A; se les cubrió además con Sarán (40%) durante las primeras cuatro semanas, luego se eliminó el Sarán y se dejaron dos semanas más bajo esas condiciones antes de la inoculación.

Durante el tiempo que estuvieron cubiertas se realizaron cuatro aspersiones foliares con fertilizante foliar (FETRILON CONBI) en dosis del 0,05% v/v, aplicando una semanalmente con un atomizador manual.

Al momento de la aplicación de los tratamientos las plantas fueron extraídas de la mezcla de tierra y arena y se lavaron las raíces con agua común y corriente.

Una vez aplicados los tratamientos las plantas se trasplantaron a macetas de dos kilogramos (#400), llenas con tierra esterilizada en un horno eléctrico durante 72

horas a 100 grados centígrados, distribuidas en tres periodos de 24 horas cada uno, separados entre sí por intervalos de esa misma duración a temperatura ambiente, una Tyndalización modificada para este caso. Una vez completo el proceso la tierra permaneció en las macetas durante 48 horas más antes de colocar las plantas.

Del suelo utilizado se hizo un análisis de la fertilidad para calcular la aplicación de fertilizantes o enmiendas, de acuerdo con las exigencias del cultivo de banano.

El suelo en las macetas se mantuvo húmedo durante todo el periodo de experimentación.

3.4.2 Procedimiento de preparación y aplicación de los tratamientos.

Se evaluaron cuatro microorganismos: *Serratia marcescens* cepas R-1 y A-23, *Bacillus cereus* cepa A-30 y *Bacillus sp* cepa Q-2 en soluciones con concentración de 10^6 ufc/ml.

Las cepas para las soluciones fueron reproducidas masivamente en platos de Petri con agar nutriente más quitina, preparando cada litro con 23 g de agar nutriente (DIFCO), 22,5 g de quitina coloidal con concentración de quitina del 0,2% v/v, 5 g de agar (DIFCO) y agua destilada, con pH regulado con NaOH entre 7 y 8.

Una vez desarrolladas las colonias se recuperaron los microorganismos lavando la superficie del plato con agua destilada estéril (ADE) y se prepararon, en un beaker de 1 litro, 500 mililitros de solución con la concentración mencionada. A estas soluciones se le incorporó Tween 80 como dispersante y adherente en dosis del 0,05%.

Preparadas las soluciones se procedió a inocular las plantas a través de la raíz, sumergiendo esa parte en los beakers durante cuatro horas continuas, bajo agitación periódica cada 30 minutos y durante 10 segundos.

Los tratamientos con los microorganismos fueron evaluados contra un testigo de plantas tratadas con agua destilada estéril (ADE).

Como complemento a las soluciones concentradas y para prolongar la exposición de las raíces al inóculo, una vez sembradas las plantas en las macetas, se colocaron 100 gramos de sustrato (arroz) inoculado con los respectivos microorganismos alrededor de la base del tallo de la mitad del total de plantas tratadas con cada cepa, duplicando el número de tratamientos.

El sustrato (arroz) se preparó esterilizándolo dos veces en una autoclave horizontal eléctrica a 121 °C y dos atmósferas de presión, durante 20 minutos cada una.

Luego el sustrato se inoculó, respectivamente, con 10 ml de solución concentrada (10^7 ufc/ml) de cada uno de los microorganismos por cada 100 g de sustrato. Dejándose en una incubadora a 29 °C durante cinco días.

El total de tratamientos a evaluar fue entonces de diez, tal y como siguen:

1. *Serratia marcescens* (cepa R-1)
2. *Serratia marcescens* (cepa A-23)
3. *Bacillus cereus* (cepa A-30)
4. *Bacillus sp* (cepa Q-2)
5. Agua Destilada Estéril (ADE)
6. *Serratia marcescens* (cepa R-1) + Sustrato
7. *Serratia marcescens* (cepa A-23) + Sustrato
8. *Bacillus cereus* (cepa A-30) + Sustrato
9. *Bacillus sp* (cepa Q-2) + Sustrato
10. Agua Destilada Estéril (ADE) + Sustrato

3.4.3 Procedimientos de evaluación de la técnica de inoculación y variables consideradas.

Para cada tratamiento se establecieron ocho repeticiones de a una planta cada una, para un total de 80 plantas.

Para verificar la colonización e ingreso de los microorganismos se experimentó con cuatro procedimientos diferentes.

3.4.3.1 Observación directa de la superficie externa de las raíces tratadas.

Este procedimiento consistió en la utilización del microscopio electrónico para la observación de muestras de tejido de la raíz de plantas tratadas con cada una de las cuatro cepas bacteriales y del testigo.

Las muestras se colectaron inmediatamente después de la aplicación de la técnica de inoculación, cortando pequeños trozos de las raíces y colocándolos en el preservante FAA, para luego procesarlas.

La preparación para la observación de las estructuras externas consistió en la desecación de las muestras con un Secador de Punto Crítico con CO₂ (HCP-2 HITACHI, Japan) y la posterior cobertura con oro a través del uso de un Cobertor Iónico (IB-3, EICO Engineering Co. Ltd., Japan).

Una vez preparadas las muestras se observaron con un Microscopio Electrónico (S-570, HITACHI, Japan) y se describen las observaciones.

3.4.3.2 Recolección de gotas de agua expulsadas de la planta.

El procedimiento consistió en la recolección de una pequeña gota del agua expulsada por el proceso de gutación en las primeras tres hojas del mismo número de repeticiones de cada tratamiento, la cual se distribuyó sobre medio de cultivo agar nutriente con quitina en cajas de Petri, para

intentar reaislar los microorganismos aplicados a la raíz.

La recolección se realizó acercando el plato a la gota hasta que esta se depositara sobre el medio.

Las gota recogida de una de las repeticiones restantes fue colocada sobre agar quitina para detectar la posible presencia del microorganismo inoculado o de la enzima quitinasa.

Las gotas colectadas de plantas no aplicadas, funcionaron como testigos mediante la comparación de las poblaciones presentes. Para estandarizar el tiempo desde el cual la gota estuvo expuesta al ambiente, se eliminaron todas las gotas presentes ocho horas antes de cada recolección.

Este procedimiento se hizo una sola vez a los quince días de la inoculación, aunque pretendía ejecutarse cada siete días, a partir de la fecha de inoculación de los tratamientos, pero no fue posible realizarla a los siete días por no haber gutación ya que las plantas afrontaron un estado de estrés muy fuerte por el transplante y la alta temperatura del ambiente en esos días.

La variable evaluada fue la presencia o no de los microorganismos respectivos.

3.4.3.3 Recuperación de los microorganismos de la parte interna de la raíz.

El procedimiento consistió en la obtención de cuatro trocitos de raíz, de aproximadamente 1 cm de largo cada uno, de una planta por tratamiento; los cuales se desinfectaron colocándolos en NaOCl al 1% durante 5 minutos (Rodríguez, 1995), luego se lavaron con ADE y se colocaron en sendos platos de Petri con agar nutriente más quitina.

Al igual que en el método anterior se procesaron muestras de plantas no tratadas para la comparación respectiva.

Este procedimiento se repitió en tres ocasiones, la

primera el día de la inoculación de los tratamientos, la segunda a los siete días de ésta y la tercera a los quince días.

Se evaluaron la presencia o no presencia de los microorganismos, observando además el desarrollo de los microorganismos un día y tres días después, a través de la medición del crecimiento desde el centro de la muestra hasta el borde de la colonia en el punto de mayor desarrollo de la misma.

3.4.3.4 Medición de variables de crecimiento.

Se midieron semanalmente dos variables para establecer índices de crecimiento, como son grosor del tallo y emisión foliar. La evaluación se realizó durante 4 semanas.

El grosor del tallo se midió a 1 cm de altura desde el nivel del suelo con un calibrador de Vernier. Para el número de hojas se marcó la hoja en posición tres (CORBANA, 1992) en el momento de la inoculación y se contó siempre a partir de esta hoja hacia arriba sin incluir la hoja de candela.

Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico SAS, a través del cálculo de un área bajo la curva de incrementos y realizando una prueba de medias de rango múltiple (Duncan).

4 RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1 EFECTO DE LOS AGENTES TENSO ACTIVOS (Silwet L-77 y Nu-Film 17) Y EL ACEITE AGRICOLA SOBRE LOS MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS.

4.1.1 Efecto del coadyuvantes sobre la multiplicación de las cepas bacteriales *in vitro*.

Los resultados del conteo de las unidades formadoras de colonias de cada combinación de coadyuvante y cepa bacterial indican que ninguno de los agentes tenso activos provocó la muerte de las células.

En la Figura 1 se han graficado los resultados para cada cepa según el coadyuvante evaluado; en el Anexo 5 se incluyen los datos numéricos. El tratamiento presentado como "Agua (hora 0)" es la concentración inicial para cada una de las cepas antes de agregar los coadyuvantes.

La concentración de esta misma solución cuando se presenta como "Agua" corresponde al conteo 24 horas después de la separación y mezcla.

Para las cepas R-1, A-23 y A-30, estos valores fueron superiores o ligeramente superiores a la medición 24 horas antes, como era de esperar, considerando que el agua destilada estéril no brinda un substrato nutritivo y la tasa de reproducción se reduce probablemente cerca del mínimo.

El valor para las cepas Q-2 y Q-5 fue inferior y ligeramente inferior, respectivamente, con relación al conteo inicial. Para el caso de la cepa Q-5 los valores no son realmente diferentes si se considera que la eficiencia del conteo está cerca de un 75 u 80 por ciento, por lo que se puede estimar que la multiplicación bacterial fue mínima.

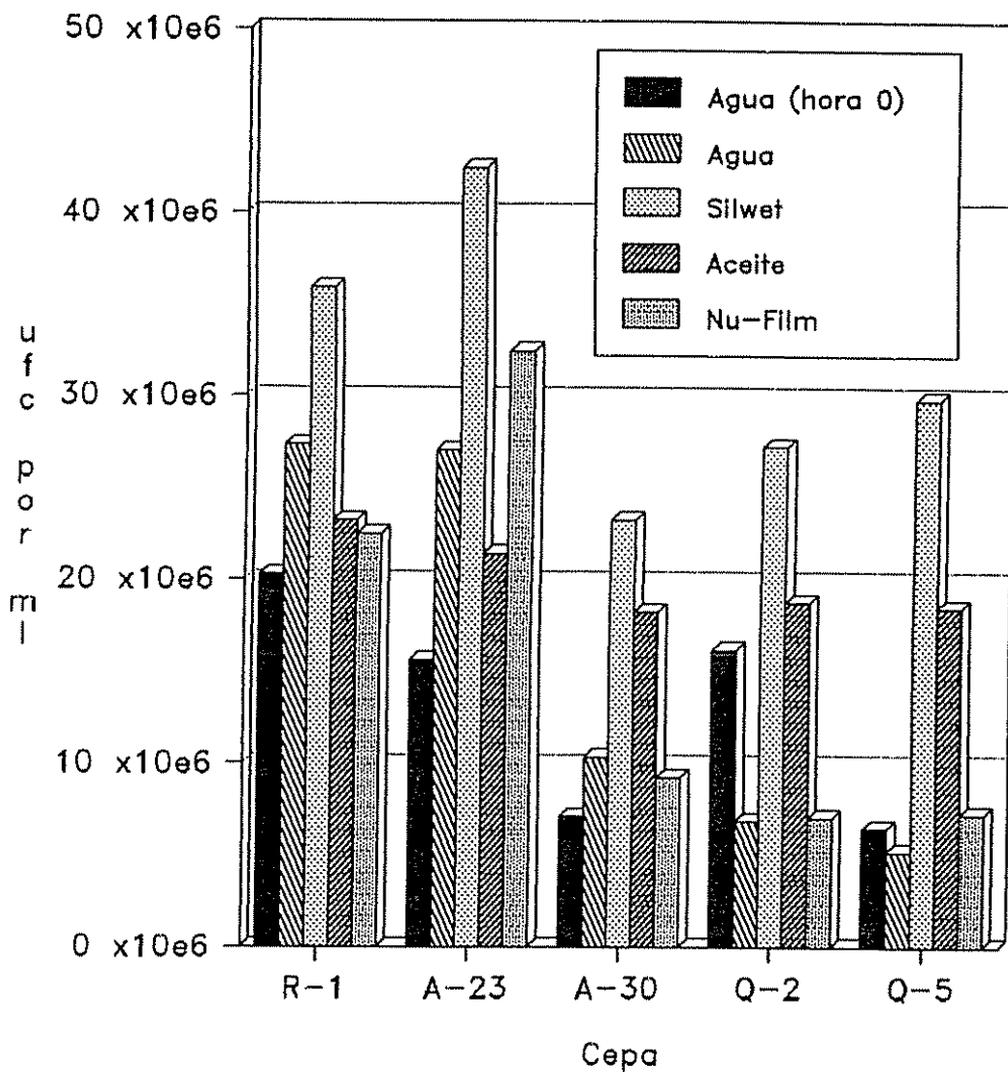


FIGURA 1: Unidades formadoras de colonia por ml para cada combinación de cepa y coadyuvante a 24 horas de la mezcla.

El caso de la cepa Q-2 es más difícil de comprender pues la diferencia es mucho mayor, lo cual podría deberse a un error en el procesamiento de la muestra y su conteo.

Debe tomarse en consideración que las cepas A-30, Q-2 y Q-5 son todas del género *Bacillus* y que tenían el mismo tiempo y facilidades de crecimiento al momento del conteo inicial; como se aprecia el valor de "Agua (hora 0)" para la cepa Q-2 es mucho mayor que los de las cepas Q-5 y A-30, mientras que los valores de "Agua" para las tres cepas son semejantes.

Para poder establecer el valor de las diferencias apreciadas se realizó un análisis factorial de los datos obtenidos y pruebas de medias para los tratamientos. Para verificar que la concentración inicial ("Agua (hora 0)") de cada cepa no fue un factor determinante en los cambios en las concentraciones, se realizó un análisis de covarianza considerando esos valores como la covariable, sin embargo, este no fue significativo y por lo tanto se suprimió.

Los resultados del análisis factorial se presentan en el Cuadro 2.

Cuadro 2: Análisis de varianza para los datos del conteo de células bacteriales por ml en los tratamientos con diferentes coadyuvantes. 1995.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Prob>F
Repeticiones	1	1,4*10 ¹⁰	1,4*10 ¹⁰	0.9681 ns
Coadyuvantes	4	2,2*10 ¹⁵	5,5*10 ¹⁴	0,0001 **
Cepas	4	2,0*10 ¹⁵	5,0*10 ¹⁴	0.0001 **
Coady*Cepa	16	8,0*10 ¹⁴	5,0*10 ¹³	0.0001 **
Error	24	2,1*10 ¹⁴	5,0*10 ¹²	
Total	49	5,2*10 ¹⁵	R ² = 0.96	C.V. = 15.50

**= altamente significativo (p=0.01)

ns= no significativo

El cuadro muestra alta significancia ($p=0,01$) para los coadyuvantes, las cepas y la interacción de estos dos factores. No hay significancia para las repeticiones, aunque se debe indicar que solo se prepararon dos repeticiones por tratamiento, las que estadísticamente son pocas.

Para determinar el comportamiento de cada coadyuvante se realizó una prueba de medias (Duncan, $p=0,05$) para este factor. Los resultados se aprecian en el Cuadro 3.

Cuadro 3: Diferencias del efecto del coadyuvante sobre la concentración de bacterias por ml, de acuerdo a la prueba de Duncan.

Coadyuvante	Media	(*)
SILWET	31734475	(a)
ACEITE	20013125	(b)
NU-FILM	15678125	(c)
AGUA	15359375	(c)
AGUA (hora 0)	13112500	(c)

(*) : medias con letras iguales no muestran diferencias significativas entre sí ($p=0,05$).

En términos generales es posible apreciar (Figura 1, Anexo 5) que en todos los casos el conteo fue mayor cuando se evaluaron los tratamientos que contenían el organosilicon Silwet L-77.

No se puede interpretar este resultado como un aumento radical y generalizado en las tasas de reproducción de los microorganismos, ni como una disminución, sin considerar que es posible que la misma naturaleza y las propiedades del producto utilizado permiten un mejor conteo al liberar cada célula bacteriana y dispersarlas en la misma solución.

Para el caso del aceite agrícola los valores son más homogéneos entre las cepas, pero si se considera el valor

inicial de cada una de ellas se aprecia un aumento mayor entre los *Bacillus* (A-30, Q-2 y Q-5), que son células más grandes, que entre las *Serratias* (R-1 y A-23), esto puede tener relación con la capacidad como dispersante, menor que la del Silwet L-77, del producto.

Los tratamientos con Nu-Film 17 presentan mayor variabilidad y no se puede establecer un comportamiento como en el del aceite o el Silwet L-77. Esto se refleja en la prueba de medias (Cuadro 3), donde el Nu-Film no mostró diferencias significativas con respecto al tratamiento con agua ("AGUA"), pero sí con respecto al aceite agrícola y al Silwet.

El Nu-Film, a diferencia de los otros dos productos, no es un dispersante muy eficiente; su característica más sobresaliente es como adherente, por lo que no mejora mucho la dispersión de las bacterias.

En cuanto a la significancia de las cepas utilizadas una prueba de medias mostró los resultados del Cuadro 4.

Cuadro 4: Diferencias del efecto de las cepas sobre la concentración de bacterias por ml, de acuerdo a la prueba de Duncan.

Género	Cepa	Media	(*)
<i>Serratia</i>	A-23	27790625	(a)
<i>Serratia</i>	R-1	25841350	(a)
<i>Bacillus</i>	Q-2	15212500	(b)
<i>Bacillus</i>	A-30	13621875	(b)
<i>Bacillus</i>	Q-5	13431250	(b)

(*) : medias con letras iguales no muestran diferencias significativas entre sí (p=0.05).

Tal y como se aprecia las diferencias entre las cepas se deben a su género. No hay diferencias entre las cepas del género *Serratia*, R-1 y A-23, que incluso son de la

misma especie. Tampoco las hay entre las cepas del género *Bacillus*, A-30, Q-2 y Q-5; pero sí entre los dos géneros.

Las diferencias se podrían esperar considerando que el género *Serratia* posee una estrategia de supervivencia de alta multiplicación de células bacteriales, mientras que el género *Bacillus* lo hace a través de la capacidad de producción de esporas.

Para determinar el efecto de la interacción entre cada cepa y los diferentes coadyuvantes se realizó una comparación dos a dos mediante una prueba de *t* entre las medias de los tratamientos que involucraban una misma cepa, de tal forma que se pudo construir un cuadro con los resultados del ejercicio (Cuadro 5).

El efecto de las interacciones entre cepas y coadyuvantes sobre la concentración de células bacteriales es bastante similar entre cepas de un mismo género.

Para todas las cepas el Silwet tuvo los valores más altos y con excepción de la cepa A-30, este coadyuvante presentó diferencias significativas ($p=0,05$) con el resto de los tratamientos para una misma cepa.

El aceite agrícola presentó un comportamiento más homogéneo en relación con el género de las cepas. Para las *Serratias* no tuvo diferencias significativas con respecto al agua pura, mientras que con el género *Bacillus* sí se aprecian diferencias significativas ($p=0,05$).

Los tratamientos Agua, Agua (hora 0) y Nu-Film, en términos generales no presentaron diferencias importantes, por lo tanto las concentraciones de los tratamientos no son menores a la concentración inicial, no se da un efecto negativo evidente sobre la tasa de reproducción.

Como se indicó antes, ni el agua destilada estéril ni los coadyuvantes utilizados brindan una fuente nutritiva importante. Esto indica que en general no se deberían esperar efectos de los coadyuvantes sobre la concentración, a excepción de los factores discutidos anteriormente.

Cuadro 5: Diferencias del efecto de la interacción entre cepa y coadyuvante sobre la concentración de bacterias por ml, según prueba de t.

Género	Cepa	Coadyuvante	Media	(*)
<i>Serratia</i>	R-1	Silwet	35859875	(a)
		Agua	27343750	(b)
		Aceite	23253125	(b)(c)
		Nu-Film	22500000	(b)(c)
		Agua (hora 0)	20250000	(c)
<i>Serratia</i>	A-23	Silwet	42500000	(a)
		Nu-Film	32421875	(b)
		Agua	27031250	(b)(c)
		Aceite	21406250	(c)(d)
		Agua (hora 0)	15593750	(d)
<i>Bacillus</i>	A-30	Silwet	23281250	(a)
		Aceite	18203125	(a)
		Agua	10312550	(b)
		Nu-Film	9218750	(b)
		Agua (hora 0)	7093750	(b)
<i>Bacillus</i>	Q-2	Silwet	27265625	(a)
		Aceite	18750000	(b)
		Agua (hora 0)	16140625	(b)
		Nu-Film	7031250	(c)
		Agua	6875000	(c)
<i>Bacillus</i>	Q-5	Silwet	29765625	(a)
		Aceite	18453125	(b)
		Nu-Film	7218750	(c)
		Agua (hora 0)	6484375	(c)
		Agua	5234375	(c)

(*): medias con letras iguales en cada cepa no muestran diferencias significativas entre sí en prueba dos a dos ($p=0.05$). No se consideran comparaciones entre cepas, solo entre coadyuvantes con una misma cepa.

4.1.2 Efecto de los coadyuvantes en plantas desarrolladas en invernadero.

La prueba se realizó en un período de 25 días, entre el 12 de junio (aplicación de los tratamientos) y el 6 de julio (evaluación) de 1995.

4.1.2.1 Condiciones ambientales externas al invernadero.

Las plantas utilizadas crecieron bajo condiciones de invernadero pero un día después de la aplicación de los tratamientos fueron expuestas a la inoculación natural en una plantación de plátano con Sigatoka Negra por ocho días, posteriormente fueron mantenidas en una zona cercana al invernadero expuestas a las condiciones naturales de temperatura, humedad relativa y precipitación.

Los valores de esas condiciones agroclimáticas se obtuvieron de la estación meteorológica del CATIE y se presentan en las Figuras 2, 3 y 4. Los valores numéricos se brindan en el Anexo 6.

En la Figura 2 se pueden apreciar las temperaturas medias, máximas y mínimas presentes durante la prueba. Las temperaturas medias en ninguna ocasión sobrepasan los 24°C. El valor más bajo corresponde al día 30 de Junio con 20,5°C.

El promedio de la temperatura media para el periodo es de 22,3°C, mientras los de las temperaturas mínimas y máximas son de 19,3°C y 28,3°C, respectivamente (Anexo 6). Durante el período de interés predominaron las temperaturas inferiores a la media.

Considerando que el rango de temperaturas favorables para el desarrollo de la enfermedad se ubica entre los 22 y 28°C, con un óptimo en los 26°C y que cuando la temperatura nocturna es inferior a los 20°C se inhibe el desarrollo de la enfermedad (Stover, 1987), se puede concluir que la temperatura fue una limitante para un desarrollo normal de la enfermedad.

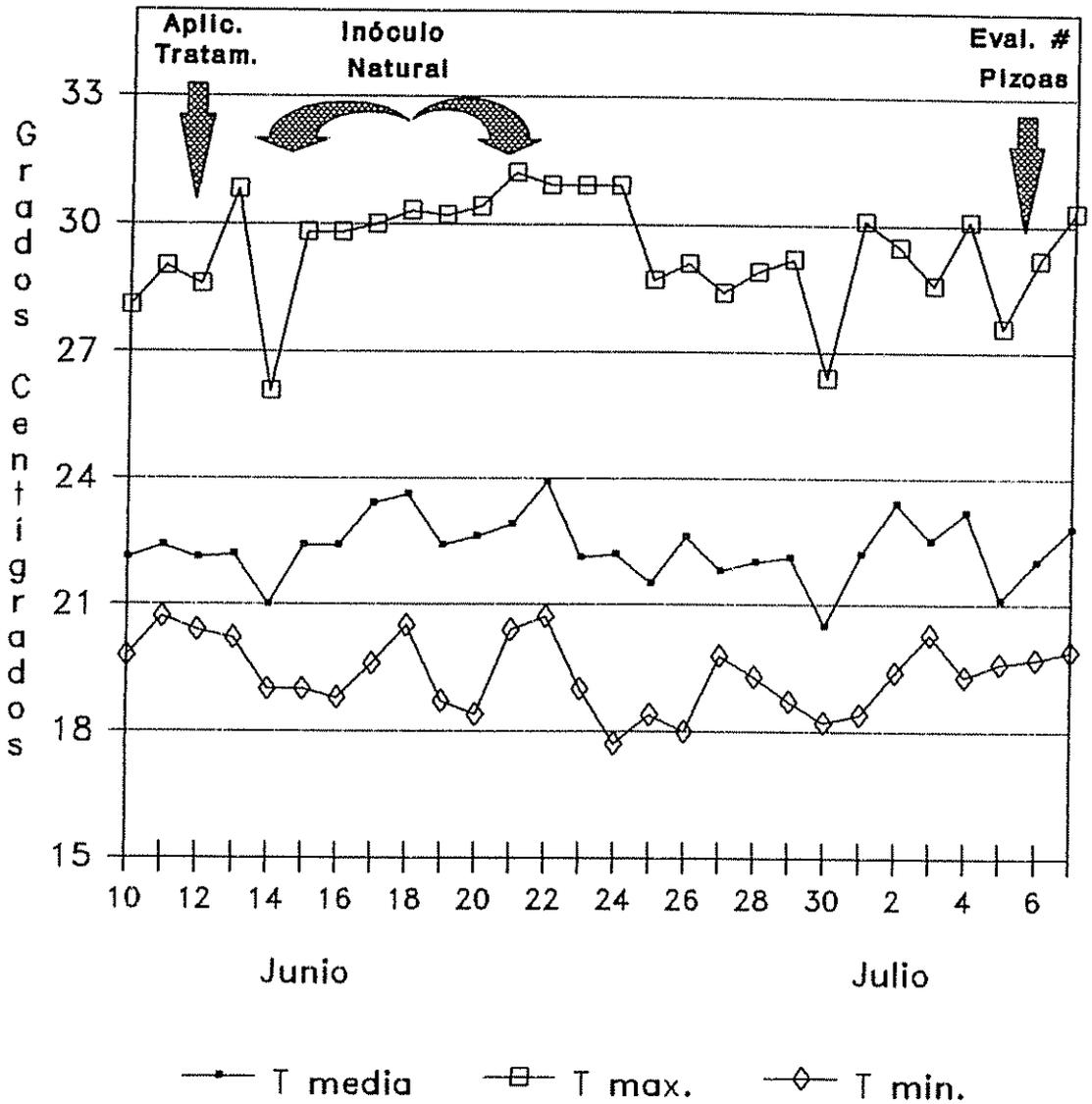


FIGURA 2: Temperaturas (°C) durante el período de inoculación, desarrollo y evaluación de la prueba en CATIE. 1995.

Principalmente las temperaturas mínimas parecen ser más limitantes que las temperaturas máximas sobre el patógeno (CORBANA, 1992).

La precipitación presente durante el período de trabajo acumuló 240 milímetros de lluvia (Anexo 6). Su distribución, como se aprecia en la Figura 3, favoreció el momento en que las plantas estuvieron expuestas al inóculo de campo, lo cual constituyó una muy conveniente situación para evaluar el comportamiento de los coadyuvantes. Solamente para los días previos al momento de retirar las plantas del área de inoculación, se habían acumulado ya 130 mm de lluvia.

La precipitación juega un rol determinante en el comportamiento de la infección, al punto que se ha caracterizado el progreso de la enfermedad de acuerdo con los niveles de precipitación a lo largo del año (CORBANA, 1992).

Para la zona Atlántica de Costa Rica se ha determinado una elevación de los niveles de enfermedad durante los meses de junio y julio, con un máximo en los meses de agosto y setiembre, a partir de donde sufre un leve descenso nuevamente (CORBANA, 1992).

Considerando la época del año en que se realizó el ensayo (junio, julio), efectivamente la precipitación no era un factor limitante y no lo fue.

Al igual que la precipitación, la humedad relativa (Figura 4) no constituyó un factor limitante para el desarrollo de la enfermedad y por tanto la evaluación de los tratamientos. La humedad relativa promedio para el tiempo de estudio fue de 90,1%, con muy poca variación pues el rango tuvo un límite máximo de 93,1% y mínimo de 87,4% (Anexo 6). Manteniendo siempre niveles adecuados y necesarios para la germinación de las esporas y el desarrollo de la infección.

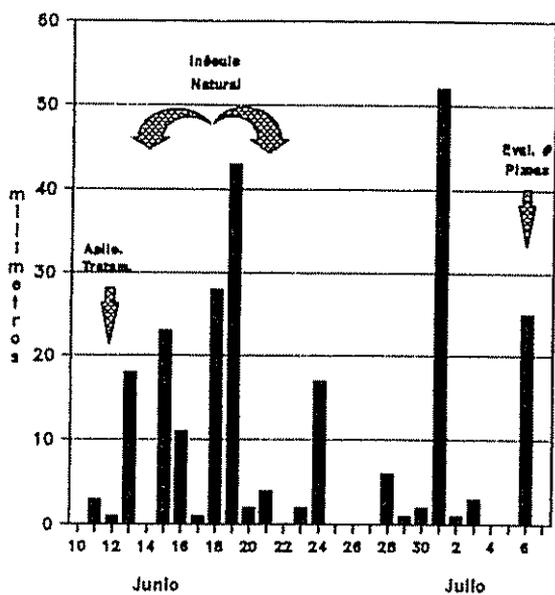


FIGURA 3: Precipitación (mm) durante el período de Inoculación, desarrollo y evaluación de la prueba en CATIE. 1995.

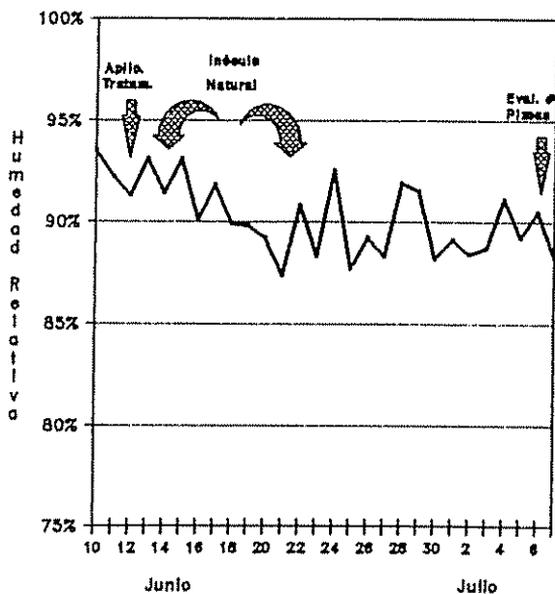


FIGURA 4: Humedad relativa (%) durante el período de Inoculación, desarrollo y evaluación de la prueba en CATIE. 1995.

El promedio de velocidad del viento fue bastante bajo durante el ensayo con un valor de 0,80 m/s (2,88 Km/h) (Anexo 6), lo cual se considera como un aire ligero y poco significativo (Heuveloop, 1986).

Sin embargo estos niveles pueden ser suficientes considerando que el viento juega un papel importante para la diseminación de las esporas una vez liberadas, pero determinante en el caso de distancias apreciables. Las plantas sanas fueron colocadas al pie de las infectadas por lo que el viento no fue un factor limitante.

4.1.2.2 Evaluación del efecto del uso de los coadyuvantes sobre la enfermedad mediante el conteo del número de pizcas.

La Figura 5 corresponde a la evaluación de la enfermedad (promedio) mediante el conteo del número de pizcas en los estados 2 y 3 de la escala de Mourichon, en un marquito de 9 cm², colocado al azar en dos posiciones de la hoja tres de cada planta.

Se aprecia en la figura que los tratamientos 5 (Aceite + R1) y 18 (Aceite) fueron los de menor número de pizcas en promedio, seguidos por los tratamientos de la combinación de la cepa R1 con el Nu-Film y el Agua Estéril (9 y 13 respectivamente).

Un análisis de varianza detectó que no existieron diferencias significativas entre los tratamientos como se muestra en el Cuadro 6, lo cual coincide con una prueba similar realizada por González, 1995. Pero muestra alta significancia ($p=0,01$) para las repeticiones, lo cual indica que existió una gradiente en algún factor no considerado.

La exposición a las condiciones ambientales del campo que sufren las plantas procedentes del invernadero, puede ser un factor determinante para el desarrollo de los síntomas.

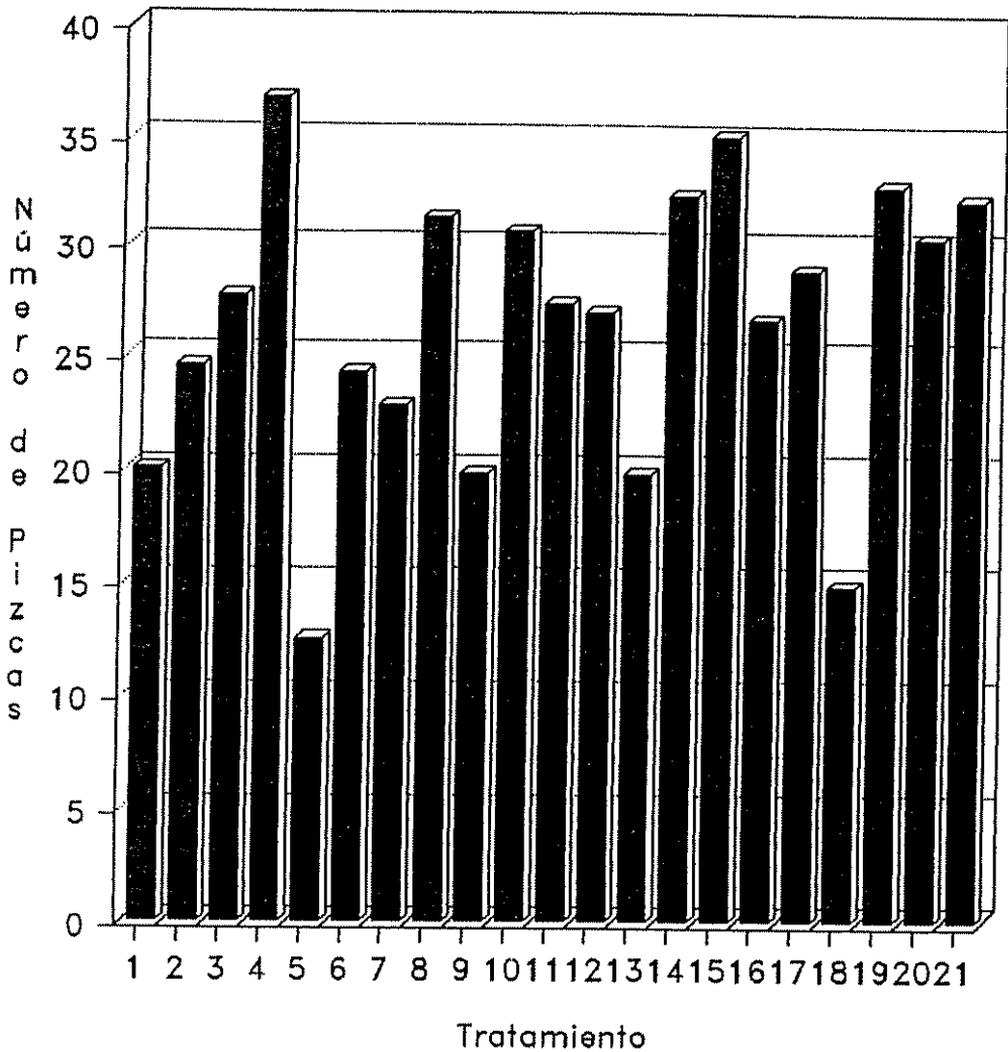


FIGURA 5: Efecto de los tratamientos sobre la severidad de la Sigatoka Negra, en invernadero. Número de pizcas en 9 cm²

- | | | | |
|-----------------|-------------------|-------------------|---------------|
| 1: Silwet + R1 | 6: Aceite + A23 | 11: Nu-Film + A30 | 16: Agua + Q2 |
| 2: Silwet + A23 | 7: Aceite + A30 | 12: Nu-Film + Q2 | 17: Silwet |
| 3: Silwet + A30 | 8: Aceite + Q2 | 13: Agua + R1 | 18: Aceite |
| 4: Silwet + Q2 | 9: Nu-Film + R1 | 14: Agua + A23 | 19: Nu-Film |
| 5: Aceite + R1 | 10: Nu-Film + A23 | 15: Agua + A30 | 20: Medlo |
| | | | 21: Agua |

Cuadro 6: Análisis de varianza para los datos transformados (log(promedio)) del número de pizcas en 9cm² de la hoja de banano. 1995.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Prob>F
Repeticiones	4	14.29	3.57	0.0001 **
Tratamientos	20	6.91	0.34	0.1972 ns
Error	77	20.26	0.26	
Total	101	41 45	R ² = 0.51	C.V. = 16.53

**= altamente significativo (p=0.01)

ns= no significativo

Las características externas y de adaptación del follaje requieren de algún tiempo que permita capacitar a la planta para un funcionamiento normal luego de un cambio en los niveles de los factores ambientales, tal y como el que se da en este caso.

La inoculación mediante la exposición en una plantación con alta infección del patógeno se justifica en la problemática que presenta el agente causal de la Sigatoka Negra para la esporulación en condiciones de laboratorio, por lo que una inoculación artificial presenta un alto grado de riesgo y dificultad.

Durante la exposición al inóculo en el campo, algunas plantas fueron colocadas al pie de las plantas enfermas, mientras que otras estaban alejadas aproximadamente a metro y medio o dos metros de la base de las mismas y esto pudo haber sido un factor determinante de los niveles de esa inoculación. Esto debe considerarse también como una variable que al no estar previsto su efecto sobre el índice de infección y no ser incorporada al análisis estadístico pudo provocar un aumento en la variación entre las repeticiones y perder así el efecto mismo del tratamiento.

Para tratar de determinar el efecto de cada cepa y de cada coadyuvante en forma independiente y las interacciones entre ellos, se realizó una descomposición de los

tratamientos en sus factores, considerando cuatro niveles de coadyuvante (Silwet, Aceite, Nu-Film y Agua Estéril como testigo) y cinco niveles de cepa (R1, A23, A30, Q2 y la ausencia de cepa como testigo), y se analizaron los datos como un diseño factorial.

En el Cuadro 7 se indican los valores del análisis y la significancia de cada factor.

Cuadro 7: Análisis factorial para los datos transformados (log(promedio)) del número de pizcas en 9cm² de la hoja de banano. 1995.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Prob>F
Repeticiones	4	12.85	3.21	0.0001 **
Coadyuvantes	3	1.74	0.58	0.1025 ns
Cepa	4	2.83	0.71	0.0423 *
Coadyuvante*Cepa	12	2.16	0.18	0.7810 ns
Error	73	19.79	0.27	
Total	96	39.36	R ² = 0.50	C.V. = 16.83

(1) La diferencia en el número de grados de libertad (G.L.) con respecto al diseño de bloques se debe a la no consideración del tratamiento Agua sola, que no era representativo en el diseño factorial.

** = altamente significativo (p=0.01)

* = significativo (p=0.05)

ns = no significativo.

Se observa que las cepas muestran significancia (p=0.05), mientras no la hay en para los coadyuvantes ni para la interacción de los dos factores. Es decir que al menos una cepa se comportó en forma diferente a las otras.

Según los resultados de una prueba de Duncan realizada con los datos transformados, la cepa R1 no muestra diferencias con respecto al testigo ni a la cepa A-30, pero sí muestra diferencias con respecto a las cepas A-23 y Q-2 (Cuadro 8).

Las características favorables de la cepa R-1 han sido comprobadas reiteradamente por González (1995), tanto a nivel de invernadero como en campo, y por Ruiz (1995) en

Cuadro 8: Diferencias del efecto de la cepa sobre el número de pizcas en 9cm² de la hoja de banano, de acuerdo a la prueba de Duncan.

Cepa	Media	(*)
R-1	2.778	(a)
A-30	3.107	(a)(b)
Testigo	3.115	(a)(b)
A-23	3.183	(b)
Q-2	3.289	(b)

(*) medias con letras iguales no muestran diferencias significativas entre sí (p=0.05).

combinación con substratos nutricionales. En esta prueba, a pesar de no mostrar diferencias estadísticas con el testigo, logra reducir la incidencia de la enfermedad más que cualquiera de las otras.

La no presencia de diferencias entre el uso o no de coadyuvantes también fue determinada por González en una prueba preliminar *in vitro*. Sin embargo, al considerar que existieron factores no contemplados en el análisis y que de alguna forma afectaron el desarrollo de la enfermedad y su relación con los tratamientos, no se descartó una diferencia en el comportamiento de dichos productos en condiciones de campo.

4.1.3 Prueba de antagonismo en campo.

4.1.3.1 Selección de tratamientos.

Con base en los resultados obtenidos en la prueba anterior con la evaluación del número de pizcas y de acuerdo a la metodología establecida se seleccionó a *Serratia marcescens* cepa R-1 como el único microorganismo que sería evaluado en campo. Se decidió además probar nuevamente la combinación de este microorganismo con los coadyuvantes Silwet L-77, Aceite Agrícola Agrol, Nu-Film 17 y con el agua, además de un testigo no tratado, pero ya en condiciones de campo y bajo un sistema agrícola de plantación comercial.

4.1.3.2 Análisis de fertilidad y fertilización del área seleccionada.

4.1.3.2.1 Condiciones de fertilidad.

Se realizó un análisis del suelo del área seleccionada a 60 cm de profundidad, en el Laboratorio Químico Suelos y Foliare de CORBANA S.A..

Los resultados se comparan con los promedios de la Zona Oeste, en la cual esta ubicada la EARTH según la zonificación de las áreas cultivadas de banano, y con los niveles óptimos de nutrimentos en el suelo según el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG), utilizados con éxito en el cultivo del banano. Los valores se presentan en el Cuadro 9.

En términos generales las condiciones de fertilidad del suelo utilizado son buenas y adecuadas con respecto al óptimo reconocido y el promedio de la zona. Individualmente se puede resaltar un excelente contenido de P, Mn y Materia Orgánica entre los aspectos nutricionales positivos, así como una alta concentración de Fe (muy relacionado con el pH), una ligera deficiencia en Zn (característico de la

Cuadro 9: Condiciones químicas del área experimental en la E.A.R.T.H, Pocora de Limón, y de la Zona Oeste.

Nutrimentos:		Area Exp. ¹	Zona Oeste ²	Optimo ³
Al	[cmol(+)/l]	0,21	1,19	0,30
Ca	[cmol(+)/l]	4,30	5,61	4-20
Mg	[cmol(+)/l]	1,28	1,61	1-10
K	[cmol(+)/l]	0,26	0,45	0,2-1,5
P	(mg/l)	36	15	10-40
Mn	(mg/l)	26	25	5-50
Zn	(mg/l)	2,9	1	3-15
Cu	(mg/l)	14	7	1-20
Fe	(mg/l)	575	180	10-50
pH		4,84	5,33	5,5-6,5
Materia Orgánica (%)		6,13	5,1	---
Relaciones:				
Ca/Mg		3,36	3,77	3,5-4,0
Ca/K		16,54	17,91	17,0-25,0
Mg/K		4,92	4,82	8,0-15,0
(Ca+Mg)/K		21,46	22,73	20,0-30,0
100 K/(Ca+Mg+K)		4,45	6,72	3,0-5,0
Textura ⁴ Franco (Arena 39,8%, Limo 42,6%, Arcilla 17,6%)				

(1) Fuente: Laboratorio Químico Suelos y Foliareas, CORBANA S.A.

(2) Fuente: López y Espinoza, 1995.

(3) Fuente: Bertach, 1986.

(4) Laboratorio de Suelos, CATIE.

zona) y un pH ligeramente ácido, entre los negativos.

Existe un desbalance marcado en la relación Mg/K y más ligero en las de Ca/Mg y Ca/K, siendo adecuado para los casos de $(Ca+Mg)/K$ y $100 K/(Ca+Mg+K)$.

La textura es franca según las proporciones de arena, limo y arcilla presentes, que puede considerarse la más adecuada para el cultivo, principalmente una vez que se eliminaron pequeños problemas de drenaje que se presentaron al inicio.

4.1.3.2.2 Fertilización realizada.

Considerando el análisis de suelo la fertilización se estandarizó con la realizada en la plantación comercial para área nuevas.

Al momento del trasplante se aplicaron 20 gramos de la fórmula 10-30-10 (NPK) en el fondo del hoyo, cubriendo el abono con un capa de tierra de unos cinco centímetros antes de colocar la planta. Dos semanas después se dispersaron 60 g/planta de sulfato de magnesio sobre la rodaja de cada una. A un mes y medio del trasplante se hizo una fertilización con nitrato de amonio (Nutran Fórmula Nitrogenada 60-0-0) en una dosis de 50 g/planta sobre la rodaja.

A partir del segundo mes desde el trasplante se realizó una aplicación mensual con fórmula completa (18-5-15-6-2).

4.1.3.3 Densidades de inóculo en la parcela experimental y en la plantación comercial.

El registro de los niveles de inóculo en la parcela experimental y en la plantación comercial se presentan en la Figura 6. La metodología seguida para el procesamiento de las cintas se presenta en el Anexo 7. El valor semanal es el promedio de ascosporas por metro cúbico de aire durante la semana respectiva.

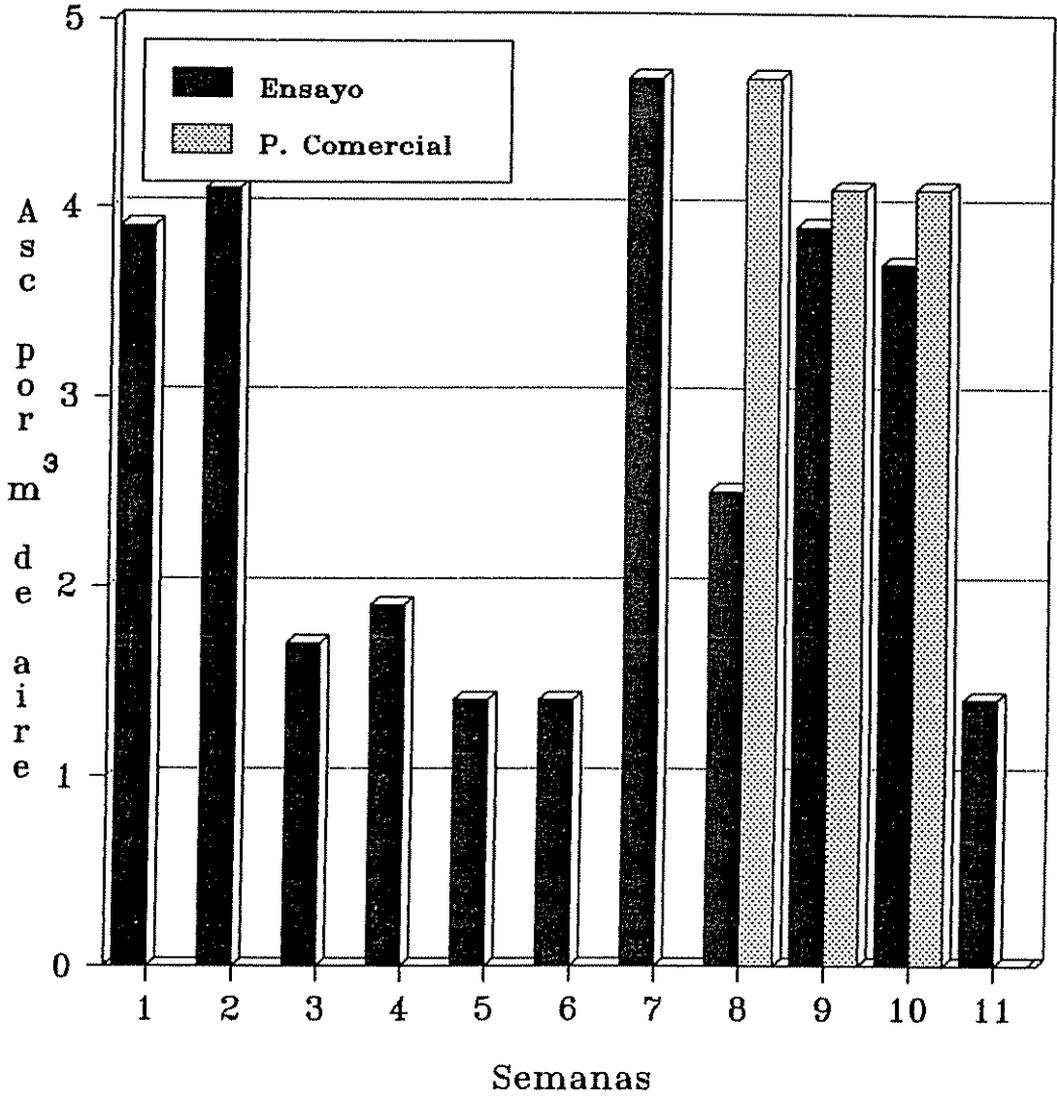


FIGURA 6: Número de ascosporas por metro cúbico de aire en las parcelas de ensayo y en la plantación comercial, EARTH.1995

Los valores correspondientes al área del ensayo no son superiores en ningún caso a las 5 asc/m³ de aire por semana, constituyéndose esto en un nivel extremadamente bajo de inóculo para todo el período de registro. El promedio semanal fue de 2,8 asc/m³ de aire.

Gaulh en 1985 registró en platanales sin manejo de la enfermedad de la Finca San Pablo, 28 Millas de Limón, y para la misma época del año, niveles de inóculo por semana en un rango de 1000 a más de 5460 asc/m³ de aire a una altura de 4,65 m. En todo su período de estudio reporta una mayor frecuencia de valores superiores a las 1000 asc/m³ de aire semanal (Gauhl, 1990).

González en 1994 trabajando con microorganismos antagonistas en una parcela alejada de plantaciones comerciales, pero al lado de una parcela de banano sin combate químico ni mantenimiento, registró niveles de inóculo muy altos, con promedio semanal de 11476 asc/m³ de aire (González, 1995).

La comparación entre los valores de la parcela experimental y la plantación comercial cercana, muestra que las diferencias son pequeñas pero, con excepción de la última semana, los niveles de inóculo en el aire son mayores en la plantación comercial. En esta área el combate de la Sigatoka Negra se realiza alternando los fungicidas de contacto y sistémicos tradicionalmente usados para tal fin, haciendo aplicaciones de acuerdo con el método de preaviso biológico, asesorados por la Corporación Bananera Nacional (CORBANA S.A.).

Al analizar las concentraciones de inóculo diariamente si es posible apreciar dos comportamientos claramente diferentes (Figura 7). En el área experimental se mantiene una concentración más baja pero constante a lo largo del período de observación, mientras que en el área comercial se producen picos altos separados por días de prácticamente cero ascoporas por metro cúbico de aire.

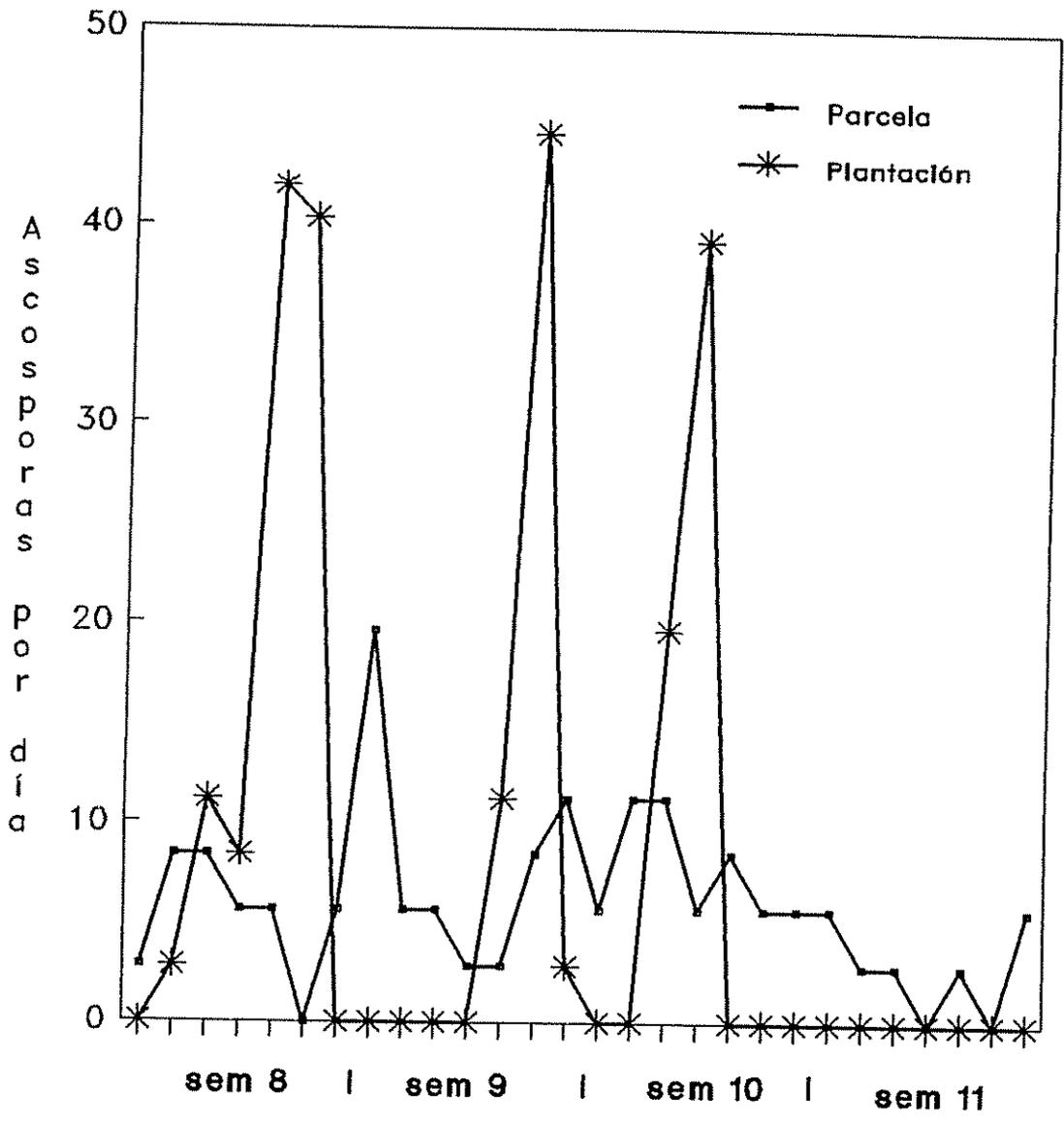


FIGURA 7: Registro diario de ascosporas en las trampas de la parcela de ensayo y de la plantación comercial. EARTH, 1995.

El comportamiento en la plantación manejada por la EARTH es bastante semejante, aunque con niveles mucho más bajos, al reportado por Gaulh para el caso de platanales con combate químico reducido de la enfermedad (Gaulh, 1990). Este comportamiento, su periodicidad e intensidad están estrechamente ligadas con las condiciones climáticas imperantes y sus variaciones.

Los valores registrados por las trampas en este ensayo pueden considerarse bajos con relación a los datos reportados por otros autores (Gauhl, 1990; González, 1995). En cualquier caso cabe considerar que la eficiencia de las trampas volumétricas depende directamente de la velocidad del viento, el tamaño de las partículas y otros factores como la composición del adhesivo utilizado.

Normalmente se logra una eficiencia del 75% (Bartlett y Bainbridge, 1978) o del $70\% \pm 20\%$ (Burkard Manufacturing Co.Ltd. s.f.), según las condiciones específicas de la medición.

En este caso uno de los factores más importantes pudo haber sido que el número de aumentos utilizados (200X) para el conteo, este pudo haber sido insuficiente y disminuido la capacidad del observador para visualizar las esporas en la cinta.

4.1.3.4 Precipitación semanal durante la realización de la prueba.

La precipitación registrada en el sitio del experimento durante el período de aplicación y evaluación de los tratamientos se presenta en la Figura 8. Para las semanas dos y tres se tuvo problemas con el pluviógrafo por lo que no se registro la precipitación correspondiente.

El acumulado de lluvias alcanza los 494,4 mm, con promedio de 195,5 mm por mes, que cumple los requerimientos necesarios de la planta de banano (Soto, 1985).

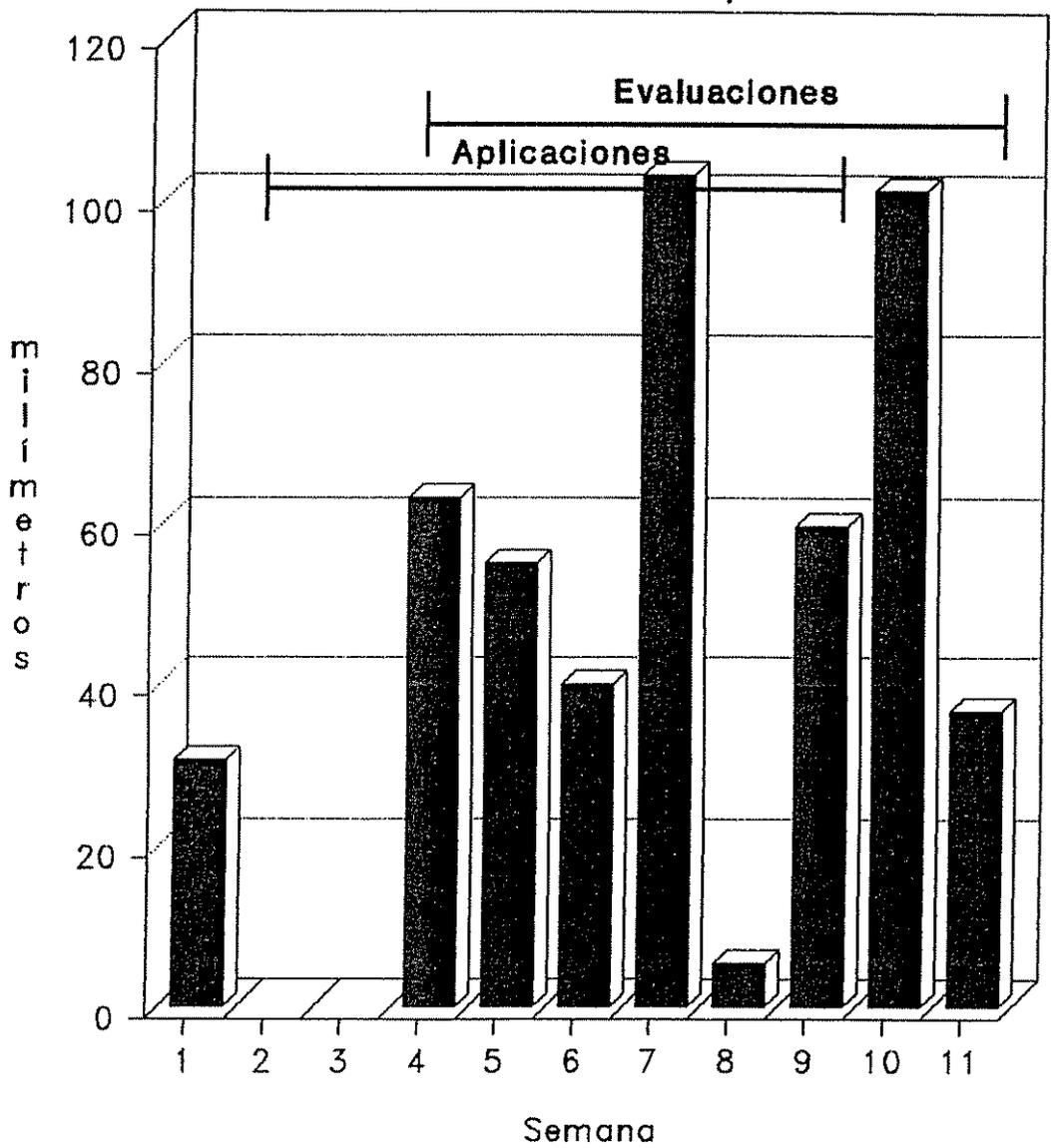


FIGURA 8: Precipitación semanal en mm, en el área experimental en la EARTH, Pocora, Limón. 1995.

4.1.3.5 Efecto del uso de coadyuvantes sobre el desarrollo y la severidad de la enfermedad.

La combinación de la cepa R-1 con el aceite agrícola resultó ser el tratamiento más eficiente para lograr la disminución de la tasa de infección de la enfermedad.

En la Figura 9 se presentan los comportamientos de los tratamientos durante las ocho semanas de evaluación. Como se aprecia durante todo el período el tratamiento Aceite+R1 es el de niveles más bajos de infección.

El análisis estadístico de los datos considerando el área bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) confirma las diferencias entre tratamientos (Cuadro 10).

Cuadro 10: Análisis de varianza para los valores de ABCPE de cada tratamiento, para la Sigatoka Negra en campo.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Prob>F
Repeticiones	4	13.54	3.38	0.0083 **
Tratamientos	5	23.01	4.60	0.0012 **
Error	20	14.64	159.22	
Total	29	51.18	R ² = 0.71	C.V. = 17.66

**= altamente significativo (p=0.01)

ABCPE calculada como $[T(i+1)-T_i][Y(i+1)+Y_i]/2$, donde T_i = Tiempo en la i -ésima observación y Y_i = Severidad en la i -ésima observación.

Los tratamientos resultaron altamente significativos (p=0.01), al igual que las repeticiones. La significancia de las repeticiones se esperaba pues fueron colocadas sobre una gradiente de distancia con respecto al área comercial (fuente de inóculo inicial).

Además, por razones de disponibilidad de material, una de las repeticiones fue sembrada con plantas procedentes de invernadero y no con plantas previamente adaptadas a las condiciones de campo como las utilizadas en las otras cuatro repeticiones. Este factor provocó que las plantas de

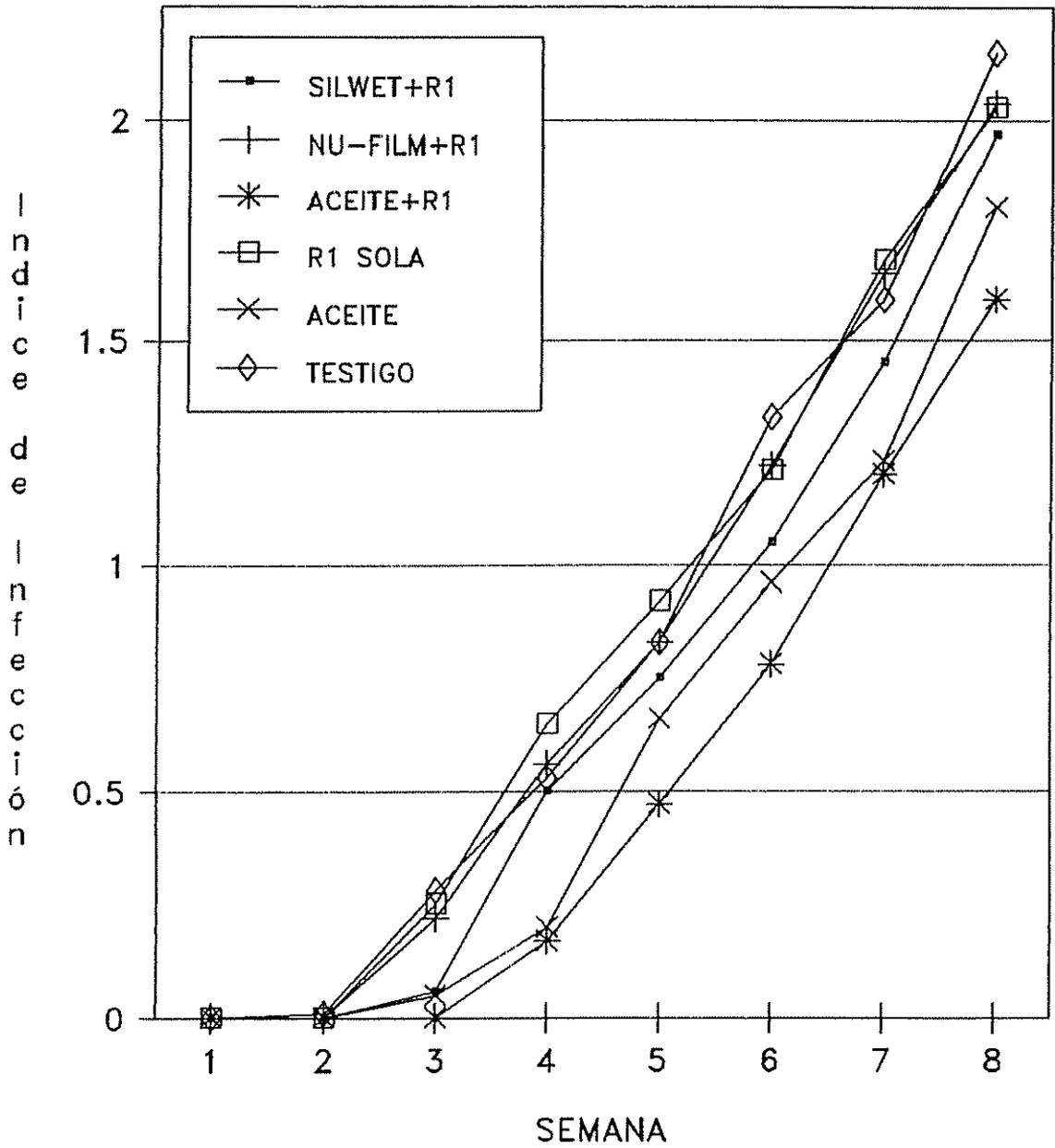


FIGURA 9: Efecto de los tratamientos en el desarrollo de la Sigatoka Negra en el campo, EARTH, Pocora, Limón. 1995.

invernadero se desarrollaran más lentamente pues debieron sufrir todo el periodo de adaptación.

Para determinar las diferencias entre tratamientos se realizó una prueba de medias (Duncan, $p=0.05$) para los valores medios del ABCPE de cada tratamiento (Figura 10). Los resultados se muestran en el Cuadro 11.

Cuadro 11: Diferencias entre los valores medios del ABCPE de cada tratamiento del ensayo de campo, según prueba de Duncan.

Tratamiento	Media	(*)
Aceite + R-1	3.417	(a)
Aceite	3.996	(a)(b)
Silwet + R-1	4.787	(b)(c)
Nu-Film + R-1	5.497	(c)
Testigo	5.644	(c)
R-1	5.725	(c)

(*): medias con letras iguales no muestran diferencias significativas entre sí ($p=0.05$).

Como lo muestra la prueba, los tratamientos Aceite+R1 y Aceite presentaron diferencias significativas ($p=0.05$) con respecto al Testigo, pero no las hubo entre ellos. No se dan diferencias entre el Aceite y la combinación del Silwet y la bacteria, pero si entre esta combinación y la respectiva entre aceite y el microorganismo.

Considerando el comportamiento fungistático reconocido del aceite agrícola y al no presentarse diferencias entre el control de la enfermedad ejercido por el producto aplicado solo o en combinación con el antagonista, no parece haber un efecto de la presencia del microorganismo; más aún considerando que las diferencias entre el Testigo y el tratamiento de bacteria sola no son estadísticamente significativas.

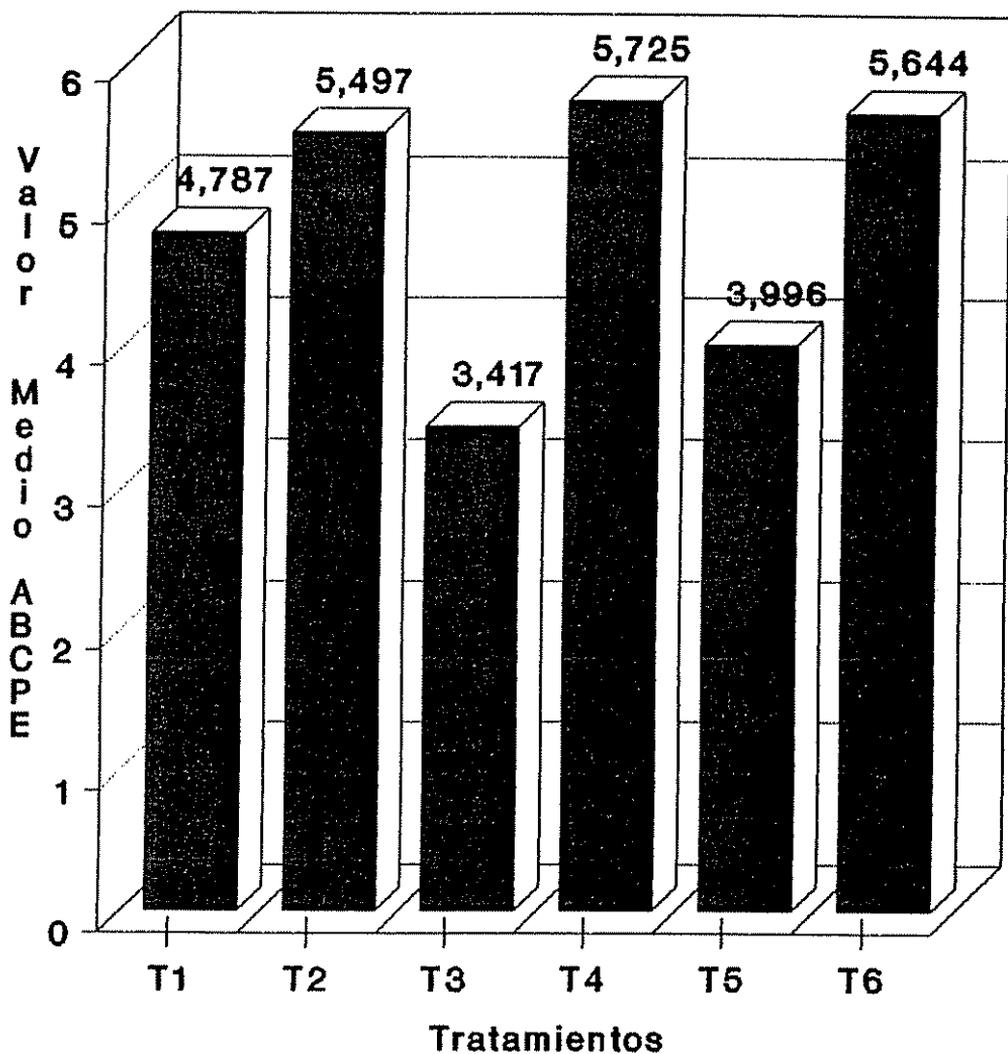


FIGURA 10: Efecto de los tratamientos sobre la severidad de la Sigatoka Negra, en campo, EARTH, Pocora, Limón. 1995.

T1: Silwet + R1

T2: Nu-Film + R1

T3: Aceite + R1

T4: R1

T5: Aceite

T6: Testigo

Sin embargo cabe retomar que la ausencia de diferencias estadísticas entre la combinación del Silwet más antagonista y el aceite solo indica un grado de control logrado claramente por el antagonista ya que no se conoce que el organosilicon tenga capacidad fungicida o fungistática.

González (1995) reporta un control eficiente con la aplicación del microorganismo sin necesidad de coadyuvantes, equivalente a la aplicación de la bacteria sola, en condiciones de niveles muy elevados del inóculo de la enfermedad presentes en el ensayo.

Ruiz no encontró diferencias entre el testigo y los tratamientos de aplicación mensual de la cepa R-1 en un ensayo con substratos bajo condiciones de baja densidad de inóculo. Mientras si reporta diferencias con respecto al tratamiento con fungicidas, siendo este último más eficiente (Ruiz, 1995).

Para el caso de la prueba realizada en campo se debe considerar que los niveles de inóculo fueron muy bajos y esto hace más difícil que se logren expresar diferencias entre los tratamientos; además, como en los otros ensayos (González, 1995; Ruiz, 1995) se estima que el diseño de parcelas contiguas implica un problema de deriva que podría significar un subsidio para el testigo.

4.2 UBICACION ENDOFITICA A TRAVES DE LA RAIZ.

El análisis del suelo utilizado (Anexo 8) lo identificó como un suelo arcilloso, con pH ligeramente ácido y niveles adecuados de las bases K, Mg y Ca, así como del contenido de materia orgánica. Con un nivel de fósforo muy cercano al límite inferior del óptimo recomendado, sin embargo se decidió no hacer aplicaciones de enmiendas o fertilizantes para evitar alterar las relaciones y con ello afectar el comportamiento y efecto de los tratamientos.

4.2.1 Observación directa de la superficie de las raíces tratadas.

Se colectaron muestras de la raíz de plantas tratadas con las cuatro cepas bacteriales utilizadas y del testigo tratado con agua destilada estéril, es decir cinco tratamientos.

Mediante el uso del microscopio electrónico se pudieron hacer observaciones de tres de los tratamientos. Se apreciaron las correspondientes a la cepa R-1 de *Serratia marcescens*, a la cepa A-30 de *Bacillus cereus* y a la cepa Q-2 del género *Bacillus sp.*

La primera observación fue de la muestra de la cepa A-30 y se lograron determinar sus detalles y distribución a 2200 aumentos. La forma de la célula bacterial era la de un pequeño cilindro con una relación largo:diámetro de unos 3:1, con un tono claro en su superficie.

La característica más interesante fue su distribución sobre la superficie de la raíz. Gran cantidad de células independientes estaban dispersas sobre la superficie radical, pero se observaron también una especie de pequeños cordones o cadenas constituidas por varias células unidas por los extremos, en grupos de cinco, ocho, diez o pocas más. Estas cadenas se ubicaron, igualmente, sobre cualquier parte de la superficie.

La segunda muestra analizada fue la de la cepa R-1, una *Serratia*. Para apreciar en detalle las características y distribución de estas células fue necesario utilizar entre 3700 y 4200 aumentos, casi el doble de los necesarios en la cepa anterior.

En este caso se trató de células independientes con forma ovoidal y un tono más opaco de su superficie con respecto a la anterior. La cantidad de células era mucho mayor a la de A-30 y su dispersión y distribución un poco más homogéneas sobre la raíz.

Finalmente se realizaron las observaciones de la cepa Q-2 del género *Bacillus*. Su forma y el tono de su superficie eran muy similares a las de A-30, pero su tamaño bastante menor casi un 50%. Sin embargo las observaciones se pudieron realizar a 2200 aumentos.

Sin duda los detalles más característicos en la cepa Q-2 fueron su dispersión y su distribución, las cuales además de algunas células independientes consistían principalmente en grandes conglomerados de células sobre una área pequeña de la superficie radical. Los grupos podrían ser de miles de células, pero no fue posible apreciar formaciones tipo cadena como las de A-30, más bien estaban colocadas o unidas por una masa.

Es importante resaltar que todos los tratamientos incluían una dosis de 0,05% v/v de Tween 80, como dispersante. Sin embargo solo en el caso de la cepa R-1 se apreció una distribución bastante homogénea sobre la superficie de la raíz. Las cadenitas de A-30 y las masas formadas por Q-2, indican que este coadyuvante no actuó eficientemente sobre ellas, lo cual puede ser un factor determinante en un posible ingreso de las células por los conductos o la misma opción de colonizar la raíz y el suelo circundante en una posible aplicación en esta área.

4.2.2 Presencia de microorganismos en gotas de agua expulsadas de la planta.

La recolección se realizó una sola vez sobre agar nutriente con quitina y sobre agar quitina. Se evaluó la presencia (positivo) o no (negativo) del microorganismo respectivo; para los testigos se consideró la presencia de cualquiera de los microorganismos de interés como resultado positivo y la ausencia de estos como negativo. Los resultados se presentan en el Cuadro 12.

Cuadro 12: Resultados de la prueba de recuperación de los microorganismos inoculados a través de la recolección de gotas de agua expulsadas por la planta.

Tratamiento	AN+Q Repetición			AQ
	1	2	3	1
1 R-1	+ ₁	+	+	- ₂
2 A-23	+	-	-	-
3 A-30	-	-	-	-
4 Q-2	-	-	-	-
5 Testigo	-	-	-	-
6 R-1 + substrato	+	+	+	-
7 A-23 + substrato	-	-	-	-
8 A-30 + substrato	+	+	+	-
9 Q-2 + substrato	-	-	-	-
10 Testigo + substrato	-	-	-	-

1* +: Presencia del microorganismo de interés.

2* -: No presencia del microorganismo de interés.

Los resultados obtenidos para la recolección sobre AN+Q son bastante precisos ya que con excepción del tratamiento 2, se pudo determinar la presencia o ausencia del microorganismo de interés en las tres repeticiones.

Solamente tres tratamientos mostraron resultados positivos: la *S. marcescens* cepa R-1 con y sin substrato y el *B. cereus* cepa A-30 con substrato. Resulta interesante que no se trate de un solo género como podría esperarse considerando las características de cada uno de ellos. Las *Serratias* son de menor tamaño que los *Bacillus* y por lo tanto posiblemente más fáciles de ser transportadas por los conductos. Sin embargo, el género *Bacillus* es el único capaz de producir pequeñas esporas que pueden ser acarreadas, sin dejar de considerar la posibilidad de ser los mismos bacilos arrastrados por el sistema de succión de la planta.

La ausencia de microorganismos en los testigos, tratamientos 5 y 10, permite asegurar que el comportamiento de los tratamientos 1, 6 y 9 se debe precisamente a la metodología utilizada.

La aplicación de substrato no parece tener efecto sobre la cepa R-1, que de por sí tiene una altísima habilidad reproductiva y de supervivencia comprobada por anteriores ensayos (González, 1995; Ruiz, 1995).

Para la cepa A-30 hay un efecto en el aumento de la disponibilidad de inóculo y el tiempo de exposición a través de la colocación del substrato inoculado. Como se aprecia, cuando este microorganismo fue inoculado únicamente a través de la exposición de las raíces a la solución concentrada, no fue posible determinar su presencia en las gotas de agua colectadas, mientras que al agregar el substrato se obtuvieron resultados positivos para las tres repeticiones.

El transporte a través del tejido interno de la planta, donde las condiciones del medio son tan diferentes

a las del exterior, puede significar un verdadero tamiz ejerciendo una presión de selección por individuos de la población de la cepa inoculada.

Las características particulares de esas poblaciones deberían ser evaluadas y comparadas con las de la población original, de tal forma que se mida el efecto, positivo o negativo, de la exposición de las cepas al ambiente endófito de la planta.

Okumoto (1993) encontró que la cepa A-30 creció menos en agar nutriente con quitina (ANQ) que en agar quitina (AQ) cuando se sembraron las poblaciones originales sobre platos de petri con los respectivos medios. Se atribuye este comportamiento a que esta cepa no podría utilizar bien la fuente de nutrición extra en presencia de quitina.

En este caso la recolección del producto de gutación de la planta sobre agar quitina (AQ) mostró resultados negativos para todos los tratamientos, lo que parece indicar que la recuperación en un medio poco nutritivo no es factible.

Es posible considerar que las concentraciones tan bajas de microorganismo que podrían ser transportadas y la propia viabilidad de estos habrían provocado esos resultados, pero también pudo ser el efecto del medio endófito.

Finalmente no se pueden descartar factores externos que pudieron influir en los resultados. Como puede ser por ejemplo la gran cantidad de organismos colonizadores que se desarrollaron sobre el substrato colocado en las macetas, la gran mayoría hongos como *Trichoderma sp*, entre otros, que pudieron ser competencia o al menos alterar el comportamiento de las plantas tratadas.

4.2.3 Recuperación de los microorganismos de la parte interna de la raíz.

La presencia de colonias de los microorganismos de interés en los platos con medio nutritivo es el más claro indicio del ingreso de los mismos a la raíz de las plantas tratadas.

Los resultados presentes en el Cuadro 13 incluyen la determinación de la presencia del microorganismo y los promedios de crecimiento de las colonias medido uno y tres días después de la siembra en el plato. Los valores de los tratamientos con y sin substrato para la primera evaluación son los mismos, pues se tomó una planta representativa para cada cepa ya que todavía no se había colocado el substrato.

De acuerdo con los resultados las cepas del género *Bacillus* (A-30, Q-2) tuvieron mayor facilidad para ingresar y colonizar la raíz de las plantas tratadas que las cepas del género *Serratia* (R-1, A-23). Es posible que esto se deba a la capacidad de producir esporas, más resistentes al medio y más pequeñas, característica de los *Bacillus*.

Para las cepas R-1 y A-23 no se nota un efecto de la colocación del substrato en las macetas, mientras que para las cepas A-30 y Q-2 se aprecia algún efecto al disminuirse la presencia y los promedios de crecimiento de las colonias cuando había substrato.

La colocación del substrato inoculado trajo consigo un problema de contaminación por la gran cantidad de microorganismos, principalmente hongos, que colonizaron y se desarrollaron sobre él.

Tanto los hongos como otros microorganismos presentes pueden causar una disminución de las poblaciones de las bacterias inoculadas mediante la producción de metabolitos y otros productos.

En los platos donde se pusieron muestras de los testigos con y sin substrato, y de algunas de las repeticiones de los tratamientos, se pudo apreciar el

Cuadro 13: Resultados de la prueba de recuperación de microorganismos de la parte interna de la raíz y medición del crecimiento de las colonias en cm.

Tratamiento	Eval. ²	1 d.d.s. ¹		3 d.d.s. ¹	
		Pres. ³	Prom. ⁴	Pres.	Prom.
R-1	1	++++	0,16	++++	0,36
	2	++++	0,10	++++	0,43
	3	----	0,00	----	0,29
A-23	1	++++	0,16	++++	0,37
	2	++++	0,10	++++	0,31
	3	----	0,00	----	0,12
A-30	1	++++	0,43	++++	0,72
	2	++++	0,20	++++	1,44
	3	++++	0,33	++++	1,43
Q-2	1	++++	0,55	++++	1,19
	2	++++	1,00	++++	2,10
	3	++++	0,55	++++	1,50
Testigo	1	----	0,00	----	0,00
	2	----	0,00	----	0,00
	3	----	0,00	----	0,00
R-1+Subst.	1	++++	0,16	++++	0,36
	2	++++	0,17	++++	0,50
	3	----	0,00	----	0,18
A-23+Subst.	1	++++	0,16	++++	0,37
	2	++++	0,14	++++	0,18
	3	----	0,00	----	0,21
A-30+Subst.	1	++++	0,43	++++	0,72
	2	+++-	0,30	+++-	1,26
	3	----	0,00	----	0,53
Q-2+Subst.	1	++++	0,53	++++	1,19
	2	++++	1,03	++++	1,67
	3	+++-	0,53	+++-	0,93
Test.+Subst.	1	----	0,00	----	0,00
	2	----	0,00	----	0,00
	3	----	0,00	----	0,00

1: (d.d.s.)=días después de la siembra en el plato.

2: Eval.=Evaluación:1=día de aplicación de los tratamientos;2=siete días después de la aplicación de los tratamientos;3=quince días después de la aplicación de los tratamientos.

3: Pres.=Presencia del microorganismo de interés en cada una de las cuatro repeticiones; +=presente; -=No presente.

4: Proa.=Promedio de las cuatro repeticiones del crecimiento de la colonia.

crecimiento de colonias bacteriales diferentes a las de los microorganismos inoculados, lo cual indica la presencia endofítica de otros microorganismos en forma natural, aunque no se puede descartar en este caso el escape de algunos microorganismos epífitos a la desinfección realizada.

Estas bacterias podrían ser eventualmente competidores o antagonistas de las cepas inoculadas como tratamientos y dificultar su ingreso y la colonización del interior de la planta.

Ese comportamiento no fue estudiado, sin embargo, Ruiz en una comunicación personal (1996), informó de evidentes disminuciones e inhibiciones del crecimiento de las colonias de las cepas de *Bacillus* cuando eran colocadas en extractos de hojas molidas, con respecto al crecimiento cuando eran colocadas en extractos de hojas obtenidos del lavado externo de la lámina foliar. El efecto parece haber sido producido por la presencia de microorganismos endófitos liberados a través de la molienda del tejido o de algún metabolito generado o liberado por ésta.

4.2.4 Efecto de la inoculación sobre dos variables de crecimiento: Diámetro del tallo y número de hojas.

El número de hojas no fue un parámetro adecuado por el corto período de evaluación ya que la emisión foliar en el caso del banano es casi semanal y difícilmente pueden detectarse diferencias en un mes. Sería valioso el parámetro para ensayos de mayor duración, preferiblemente en campo.

El diámetro del tallo si fue una variable adecuada. Se realizó el análisis utilizando los incrementos semanales del grosor del tallo a un centímetro de altura para eliminar el efecto de diferencias en el grosor inicial de las plantas, a pesar de ser estas bastante homogéneas.

La Figura 11 muestra los incrementos semanales para cada tratamiento. Se calculó el área bajo una curva trazada con dichos valores que permitió evaluar los tratamientos estadísticamente. En el Anexo 9 se reportan los valores numéricos de los incrementos semanales.

En el Cuadro 14 se aprecian los resultados del análisis estadístico. Donde encontramos que los tratamientos tuvieron diferencias altamente significativas ($p=0,01$), no así las repeticiones.

Cuadro 14: Resultados del análisis estadístico del área bajo la curva de incrementos semanales.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	Prob>F
Repeticiones	4	0.02	0.004	0.664 ns
Tratamientos	9	0.23	0.025	0.003 **
Error	35	0.25	0.007	
Total	48	0.50	$R^2 = 0.50$	C.V.= 30.65

ns= no significativo

**= altamente significativo ($p=0.01$)

ABCIS calculada como $[T(i+1)-T_i][Y(i+1)+Y_i]/2$, donde T_i = Tiempo en la i -ésima observación y Y_i =Beveridad en la i -ésima observación.

Para determinar el comportamiento de los tratamientos se realizó una prueba de medias de rango múltiple (Duncan, $p=0,05$), obteniendo los resultados del Cuadro 15.

Los tratamientos con la cepa A-30 sola (T3) y con substrato inoculado (T8) fueron los únicos que mostraron diferencias significativas ($p=0,05$) con respecto al testigo absoluto (T5). Este comportamiento parece indicar que la colocación del substrato inoculado no significó ninguna ventaja para la promoción del crecimiento de las plantas tratadas.

La cepa A-30 corresponde a un *B. cereus* y también mostró diferencias significativas con respecto a otro *Bacillus*, la cepa Q-2, probando así ser más efectiva en promover el crecimiento de las plantas.

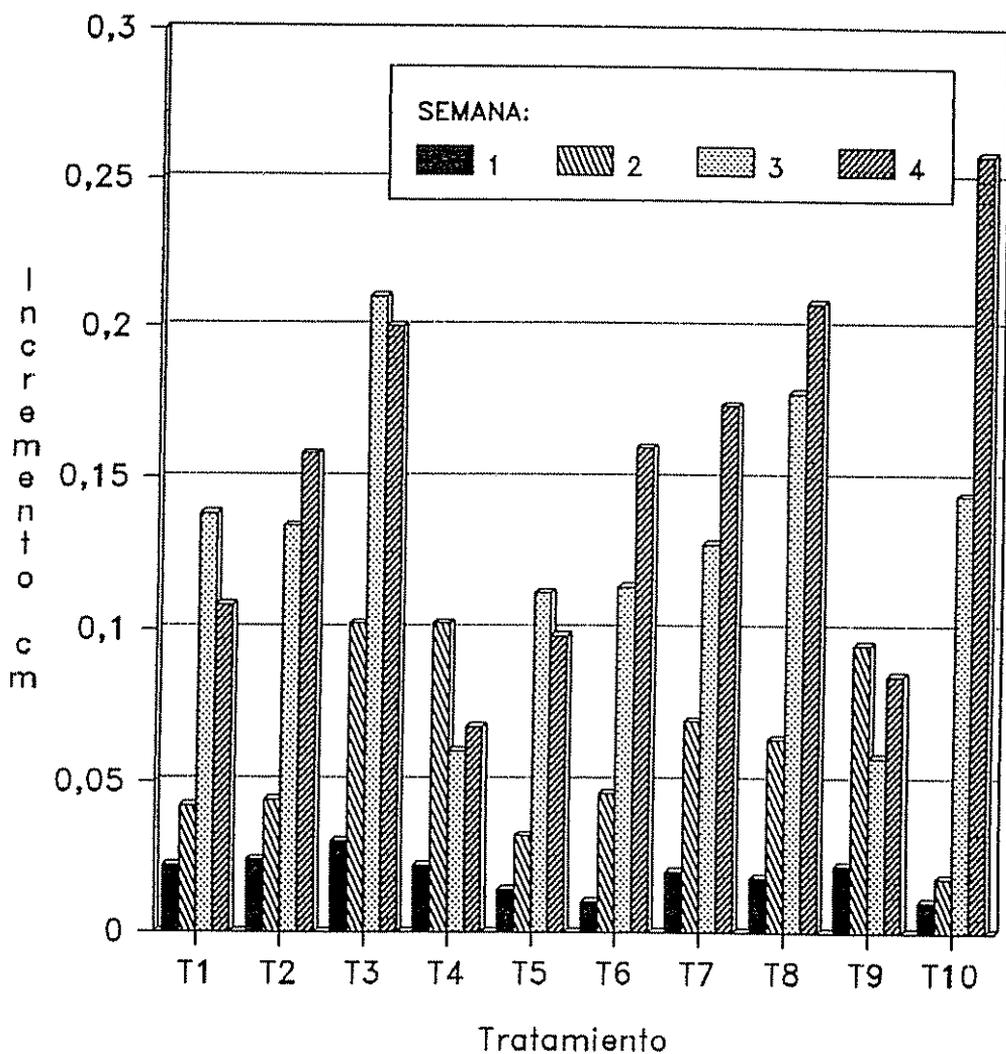


FIGURA 11: Incremento semanal (cm) del diámetro del tallo a 1 cm de altura en las plantas para cada tratamiento.

Cuadro 15: Diferencias entre los valores medios del ABCIS para cada tratamiento del ensayo de inoculación endofítica, según prueba de Duncan.

Tratamiento		Media	(*)
T3	A-30	0.427	(a)
T8	A-30 + substrato	0.355	(a)(b)
T10	Testigo + substrato	0.296	(b)(c)
T7	A-23 + substrato	0.295	(b)(c)
T2	A-23	0.269	(b)(c)
T1	R-1	0.245	(b)(c)
T6	R-1 + substrato	0.245	(b)(c)
T4	Q-2	0.207	(c)
T9	Q-2 + substrato	0.206	(c)
T5	Testigo	0.200	(c)

(*): medias con letras iguales no muestran diferencias significativas entre sí ($p=0.05$).

González reportó la apreciación visual de un crecimiento superior de plantas tratadas con tratamientos que incluían la cepa A-30 y la cepa R-1 (González, 1995).

Los dos tratamientos que involucraban la cepa R-1 no mostraron diferencias con respecto al tratamiento A-30 con substrato, pero sí con respecto al tratamiento con esa cepa sola. Esto parece indicar, y bajo el conocimiento del gran crecimiento de otros microorganismos sobre el substrato, que la cepa A-30 fue de alguna forma afectada por esos microorganismos.

Ese efecto no se nota para las otras cepas pues no existen diferencias en los comportamientos de los pares de tratamientos en que se involucran cada una de ellas.

La colonización tan alta por parte de microorganismos como *Trichoderma sp.*, parece ser la razón por la cual no se aprecian diferencias entre el Testigo con substrato y el

tratamiento de A-30+substrato.

Es posible que estos microorganismos tengan un efecto sobre el crecimiento de las plantas y a la vez afectar de alguna forma el efecto de la cepa A-30, que inoculada sola indica ser mejor para inducir incrementos en el crecimiento de las plantas de banano que las otras cepas.

4.3 DISCUSION GENERAL.

Los comportamientos de las cepas a lo largo de las pruebas con agentes tenso activos y de colocación endofítica realizadas en este trabajo es reflejo de las propiedades que se han estudiado y comprobado en ensayos de caracterización, antagonismo y de combinación con substratos realizados con estos microorganismos (González, 1995; Okumoto *et al*, 1993; Rodríguez, 1995; Ruiz, 1995).

Las cepas de *Bacillus*, como la A-30 y la Q-2, presentaron mejores comportamientos en la prueba de ubicación endofítica, pues su presencia fue más evidente y el crecimiento de las colonias recuperadas fue mayor, con respecto a las cepas del género *Serratia*, como la R-1.

Los bacilos mostraron mejores condiciones para adaptarse al ambiente interno de las plantas, al menos del tejido radical, de acuerdo con su comportamiento en las pruebas de recuperación de microorganismos de esas áreas. Sin embargo cuando se intentaron recuperar de la parte aérea de la planta la cepa R-1 fue la que actuó mejor.

La mejor adaptación de los bacilos (específicamente de la cepa A-30) en la zona radical pareció incidir en la capacidad de los mismos para inducir el crecimiento de las plantas. La cepa Q-2 no mostró ser un buen inductor del crecimiento, pero se adaptó mejor y sus colonias crecieron más rápidamente que todas las cepas.

La colocación del substrato aumentó la exposición de las raíces a los microorganismos y esto permitió que la cepa A-30 pudiera ser recuperada a través de la recolección de gotas de agua producto del proceso de gutación. Este resultado indica que al aumentar la presencia de las bacterias en la zona radical se puede lograr o motivar el ingreso de las mismas al tejido de las plantas en niveles más significativos y mejorar así las posibilidades del establecimiento endófito.

Por otra parte los bacilos no fueron tan eficientes cuando se trato de ubicarlos en la superficie foliar con ayuda de los coadyuvantes. En este caso la cepa R-1 mostró, como en otros ensayos (González, 1995, Ruiz, 1995), las mejores características tanto en adaptación como en antagonismo hacia el agente causal de la Sigatoka Negra.

La cepa R-1 ha mostrado en otras pruebas de campo niveles de control de la enfermedad solo un poco menores a los alcanzados por los fungicidas (González, 1995); en este caso no se utilizaron los productos fungicidas más tradicionales, pero si el aceite agrícola que es parte esencial del control actual de la Sigatoka en la plantaciones comerciales.

Las características propias del aceite agrícola fueron suficientes para lograr evitar y/o disminuir los niveles de la enfermedad con respecto al testigo, pero la combinación del microorganismo antagonista con el organosilicon Silwet L-77 logró igualar ese control. De tal forma que la eficiencia del microorganismo antagonista *Serratia marcescens* cepa R-1 fue superior cuando se le aplicó en la superficie foliar con el producto.

No se puede descartar la posibilidad de deriva entre tratamientos y de estos al testigo, lo cual pudo provocar un nivel bajo de infección generalizado en la parcela experimental, haciendo más difícil la identificación de diferencias entre los tratamientos.

El crecimiento de las plantas fue estimulado por el microorganismo antagonista *Bacillus cereus* cepa A-30 cuando las raíces se expusieron a una solución concentrada de la bacteria, pero no se logró determinar el efecto de esa inoculación sobre la incidencia y severidad de la enfermedad.

5 CONCLUSIONES.

5.1 USO DE COADYUVANTES EN LA APLICACION FOLIAR:

- Los coadyuvantes Silwet L-77, Nu-Film 17 y el aceite agrícola no afectaron la multiplicación y viabilidad de los microorganismos antagonistas.

- Bajo condiciones de baja precipitación y temperatura limitante para el patógeno, el uso de coadyuvantes no contribuyó a aumentar la eficiencia de las bacterias quitinolíticas, en plantas desarrolladas en invernadero.

- En esas mismas condiciones la cepa bacterial del antagonista fue más significativa que el coadyuvante utilizado, en cuanto al nivel de enfermedad permitido.

- La cepa R-1 de *S. marcescens* resultó ser la de mayor capacidad antagonista a nivel foliar sobre la Sigatoka Negra en plantas desarrolladas en invernadero, con inoculación natural de la enfermedad.

- Los niveles de inóculo de *M. fijiensis* en el aire fueron bajos durante las once semanas de duración del ensayo de campo.

- Durante el período de comparación el inóculo en el aire mostró comportamientos diferentes entre la parcela experimental (bajo y constante) y la plantación comercial (ciclos de aumentos y descensos súbitos).

- Bajo condiciones de campo y con niveles bajos de inóculo, la bacteria antagonista *S. marcescens* cepa R-1 aplicada en agua pura no mostró diferencia significativas con el testigo para el control de la Sigatoka Negra.

- El aceite agrícola solo y en combinación con la bacteria *S. marcescens* cepa R-1, alcanzaron los niveles más altos de control de la enfermedad, bajo las condiciones de campo descritas.

5.2 UBICACION ENDOFITICA A TRAVES DE LA RAIZ:

- La distribución de las cepas bacteriales sobre la superficie de la raíz fue diferente y puede ser un factor determinante ante la posibilidad de penetrar y/o colonizar la zona radical de las plantas inoculadas.

- La recuperación de los microorganismos de secciones de raíz desinfectados externamente comprobó la factibilidad del método de inoculación endofítica a través de la raíz.

- Las cepas A-30 y Q-2 del género *Bacillus* tuvieron mayor éxito al ingresar y colonizar el tejido interno de las plantas tratadas, aunque las cepas R-1 y A-23 del género *Serratia*, también fueron detectadas.

- La cepa A-30 promovió el crecimiento de las plantas en mayor grado que cualquiera de las otras cepas, y en más del doble con respecto al testigo.

6 RECOMENDACIONES.

- Continuar las evaluaciones de campo del efecto del uso del aceite agrícola y el Silwet L-77 en combinación con las cepas antagonistas bajo condiciones de niveles de inóculo más altos y mayor duración del ensayo, incluyendo análisis de productividad de las parcelas experimentales.
- La utilización de la trampa de esporas brinda un dato muy valioso, debería implementarse y estandarizarse su análisis para pruebas futuras. Un estudio más profundo de la epidemiología de la enfermedad en el área experimental y la plantación comercial debería ser una razón más para su uso.
- Realizar ensayos de invernadero y campo para evaluar el potencial de las bacterias quitinolíticas más eficientes como inductoras de crecimiento.
- Evaluar las características particulares de las poblaciones de las cepas bacteriales utilizadas durante las pruebas de inoculación endofítica y de las poblaciones reaisladas a través de los diferentes procedimientos de comprobación de la misma.
- Implementar metodologías de detección de posibles sustancias inductoras y niveles de quitinasas en la planta tratada durante la realización de evaluaciones de inducción de crecimiento y resistencia inducida.
- Hacer uso del microscopio electrónico para facilitar la comprensión de muchos hechos relacionados con la actividad antagonista de las bacterias en la planta.

6 BIBLIOGRAFIA.

- AGRIOS, G.N.. 1991. Fitopatología. Editorial LIMUSA. México DF. México.p 54-55.
- BAKER, K.F.; COOK, R.J.. 1974. Biological Control of Plant Pathogens. Ed. W.H. Freeman and Co. San Francisco. USA. 433p
- BARTLETT, J.P.; BAINBRIDGE, A.. 1978. Volumetric sampling of microorganism in the atmosphere. *In* Bartlett, J.T. and Bainbrige, A.. Plant Disease Epidemiology. London: Blackwell Scientific Publ. Seite. p 23-30
- BERTSCH, F.. 1986. Manual para interpretar la fertilidad de los suelos. Oficina de publicaciones de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 81p.
- BLAKEMAN, J.P.; FOKKEMA, N.J.. 1982. Potential for Biological Control of Plant Diseases on the Phylloplane. *In* Annual Rev. of Phytopathology. 1982. APS. USA. 20, p 167-192
- BURKARD MANUFACTURING Co.Ltd.. s.f. Operating Instructions. Seven day recording volumetric spore trap. England. 10p.
- BUSTAMANTE, M.; LOPEZ, S.. 1982. La Sigatoka Negra del plátano (Mussa AAA y AAB) y su impacto económico en Centroamérica y Sureste de México. Consejería Agrícola de México en C.A..México. 54p
- CALVO, S.; VARGAS, E.. 1989. Efecto de diferentes adherentes y formulaciones de una bacteria parasítica en el combate del Ojo de Gallo *Mycena Citricolor* (Berk & Curt) Sacc. en el café. *In* Turrialba. San José. Costa Rica. 39 (3). p 328-334.
- CALPOUZOS, L.. 1966. Action of oil in the control of plant disease. *In* Annual Review of Phytopathology. Edit. J.G. Horsfall and K.f. Baker. California, USA. Vol. 4. p 369- 390.

- COOK, J.. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. In Annual Review of Phytopathology. California, USA. Vol. 31. p 53-80.
- CORBANA. 1993. Sigatoka Negra. Un grave problema en los bananales de Costa Rica. Carta Informativa. Año 2. (9) Agost. 93. San José. Costa Rica. 2p.
- CORBANA. 1992. El Combate de la Sigatoka Negra. Boletín Informativo No. 4. San José. Costa Rica. 21p.
- DU PONT. s.f. Modo de acción de los fungicidas. Información Técnica. Du Pont de Colombia S.A.. División Agroquímicos. Bogotá, Colombia. 11p
- EARTH, 1994. Datos de los elementos del clima según el observatorio de meteorología de la escuela. Escuela de Agricultura de la Región Tropical Humeda. Octubre de 1994. Las Mercedes de Guácimo, Limón. Costa Rica. 15p.
- FAO. 1994. Anuario. Producción. Serie Estadística N. 112. Roma. Italia. Vol 47. p 166.
- GAULH, F.. 1992. Epidemiología y Ecología de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet) en Plátano (*Musa* sp.) en Costa Rica. Unión de Países Exportadores de Banano. Panamá. 114p.
- GONZALEZ Q., R. 1995. Efecto de microorganismos quitinolíticos en el desarrollo de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Tesis Mag. Sc. CATIE. Turrialba. Costa Rica. 93p.
- GUTIERREZ D., C.. 1991. Control de larvas de *Plutella xylostella* (L.) con la mezcla *Beauveria bassiana* (Bals.) VUILL. más Nu-Film 17. Tesis Mag. Sc. CATIE. Turrialba. Costa Rica. 73p.
- HEUVELDOP, J.; PARDO T., J.; QUIROS C., S.; ESPINOZA P., L. 1986. Agroclimatología Tropical. Editorial Universidad Estatal a Distancia. San José, Costa Rica. p 157.

- IICA. 1989. Compendio de Agronomía Tropical. Servicio Editorial IICA. San José. Costa Rica. Tomo II. p 94.
- ISRAELI, Y.; SHABI, E.; SLABAUGH, W.R. 1993. Effect of banana spray oil on banana yield in the absence of Sigatoka (*Mycosphaerella sp*). *Scientia Horticulturæ* 56: 107-177.
- JACOBSEN, B.; BACKMAN, P. 1993. Biological and cultural plant disease controls: alternatives and supplements to chemicals in IPM systems. *Plant Disease*, 77 (3): p 311-315.
- JIMENEZ M, J.M. 1986. Combate biológico de la moniliasis del cacao (*Theobroma cacao*) causada por el hongo *Moniliophthora roreri* (Cif. y Par.) Evans et al mediante bacterias epifitas en la Zona Atlántica de Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., Programa Universidad de Costa Rica/ CATIE. 103 p.
- JIMENEZ, J.; GALINDO, J.; RAMIREZ, C.. 1985. Estudios sobre combate biológico de *Mycosphaerella fijiensis* var *difformis* mediante bacterias epifitas. In Reunión ACORBAT (7, 1985, San José, Costa Rica). Memorias. Turrialba, Costa Rica. CATIE Serie Técnica, Boletín técnico no. 121. 503p.
- KIJIMA, T.. 1993. Control de enfermedades a través de microorganismos antagonicos. Uso de productos biológicos. Ed. Noubunkyou. Tokio, Japan. 193p (In Japanese). Traducción p 103-113.
- LINDOW, S.E. 1985. Foliar antagonists: status and prospects. In: *Biological control in agricultural IPM systems*. Ed. por Marjorie A. Hoy y Donald C. Herzog. Academic Press Inc. p 395-411.
- LOPEZ M., A.; ESPINOZA M., J.. 1995. Manual de nutrición y fertilización del banano. Instituto de la Potasa y el Fósforo. Quito, Ecuador. 82p.

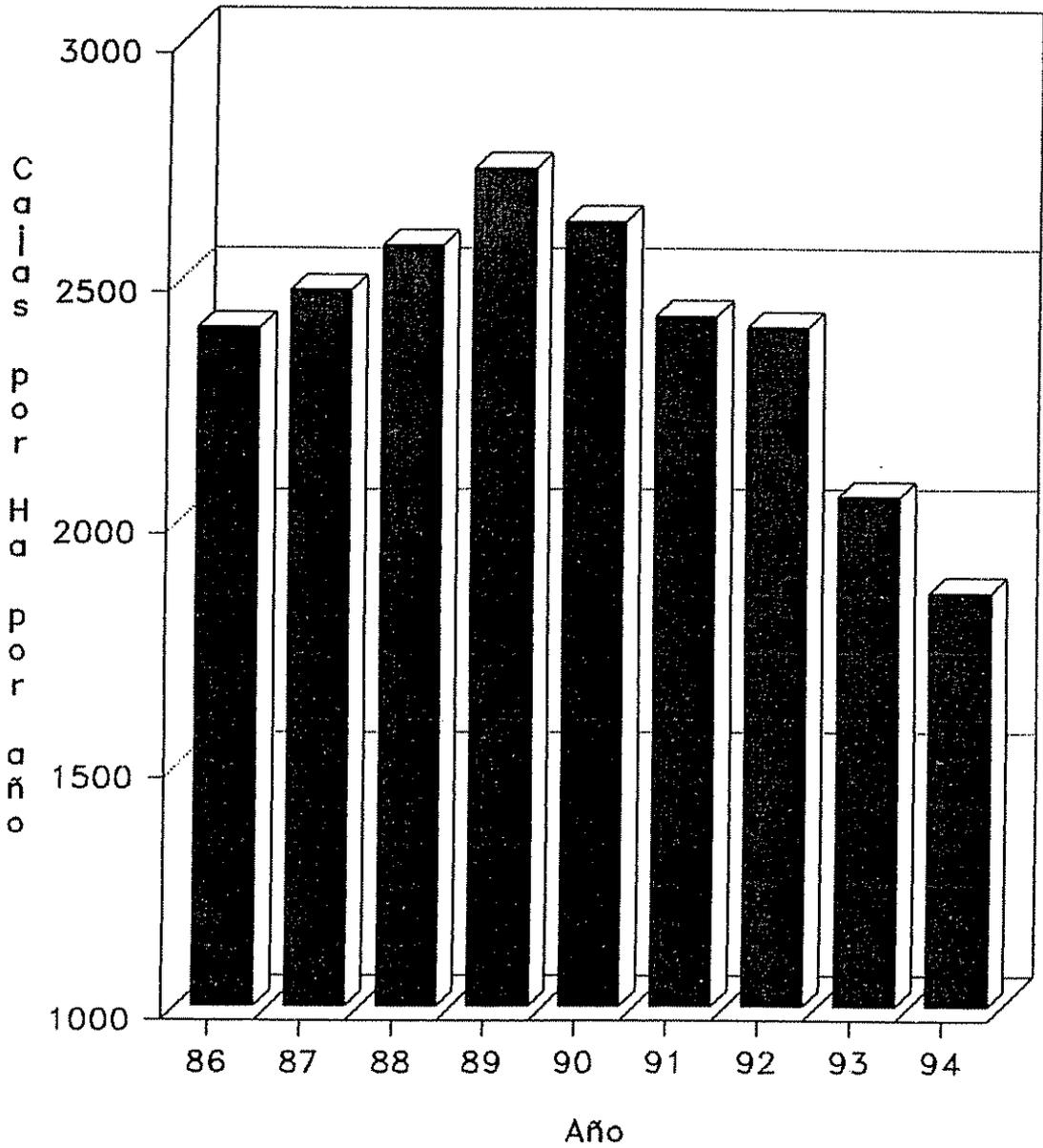
- MARIN, D.; ROMERO, R.. 1990. El efecto del aceite agrícola sobre el control de *Mycosphaerella fijiensis* y la producción del banano (Musa AAA, clon Grand Naine). In: Informe Anual 1989. Asociación Bananera Nacional. ASBANA. San José. Costa Rica. p 62.
- MEREDITH, D.; LAWRENCE, J. 1969. Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of the disease in Hawaii and notes on the conidial state of the causal fungus. Transactions of the British Mycological Society, 52(3): 459-476.
- MOURICHON, X.. 1990. Developpment de *M. musicola* (maladie de Sigatoka) et *M. fijiensis* (maladie de raies novies) sur les bananiers et plantains. Etude du cas particulier des productions d'altitude. Fruits 45(1)
- MULDER, J.L.; STOVER, R.H.. 1976. *Mycosphaerella* species causing Banana Leaf Spot. Trans. Br. Mycol. Soc., 67, p 77-82.
- OKUMOTO, S.; BUSTAMANTE, E.; GAMBOA, A.. 1993. Evaluación de la actividad de diferentes cepas de bacterias quitinolíticas *in vitro*. CATIE, Turrialba, Costa Rica. (en prensa)
- PEREZ, L.; PERALVER, L.; DELGADO, M. 1981. Acción del aceite sobre el desarrollo de *Mycosphaerella musicola*, agente causal de la mancha de la hoja (Sigatoka) en plátano. Ciencia y Técnica en la Agricultura Protección de plantas 4 (1): 49-59.
- PEREZ V, L. 1978. Control de *Mycosphaerella musicola* Leach (Sigatoka) con aceite y mezclas de fungicidas en aceite. Agrotecnia de Cuba 10(1): 83-104.
- ROMANTSCHUK, M. 1992. Attachment of plant pathogenic bacteria to plant surfaces. Annual Review Phytopathology 30: 225-243.
- RODRIGUEZ O., L.A. 1995. Antagonismo endófito de microorganismos a *Mycosphaerella fijiensis* del plátano y *Alternaria solani* del tomate. Tesis Mag. Sc. CATIE. Turrialba. Costa Rica. 76p.

- RUIZ S., C.A.. 1995. Efecto de substratos sobre bacterias antagonista a *Mycosphaerella fijiensis* en banano. Tesis Mag. Sc. CATIE. Turrialba. Costa Rica. 115p.
- _____. 1996. Comunicación personal. CATIE, Turrialba, Costa Rica.
- SANCHEZ, O.; BARRIENTOS, E. 1993. Informe anual de estadísticas de exportación de banano 1992. CORBANA. San José Costa Rica. 65 p.
- SAUMA, J.. 1995. CORBANA preocupada por baja productividad bananera del país. La República. Suplemento Nuestro Agro. San José, Costa Rica. 23 de marzo. p 5C
- SOTO, M.. 1985. Bananos. Cultivo y Comercialización. Litografía e Imprenta LIL, S.A.. San José. Costa Rica. 648p.
- SPURR, H.W.. 1990. The Philloplane. In New Directions in Biological control: Alternatives for Suppressing Agricultural Pest and Diseases. Edit. Alla R. Liss, Inc. p 271-278.
- _____. 1976. Experiments on foliar disease control using bacterial antagonist. In Annual Review of Phytopathology. s.f. p 369-381.
- STOVER, R.H.. 1989. Sigatoka leaf spots: Thirty years of changig control strategies: 1959-1989. In Sigatoka leaf spot diseases of bananas. INIBAP. Proceedings (International Workshop, San José, Costa Rica, March 28-April 1, 1989).p 66-74.
- _____. 1987. Producción de Plátano en presencia de la Sigatoka Negra. In Plagas y Enfermedades de carácter epidémico en cultivos frutales de la región centramericana. Proyecto MIP-CATIE. Panamá. p 27-36.
- TAPIA F., A.C.. 1993. Distribución altitudinal de la Sigatoka Amarilla (*Mycosphaerella musicola*) y la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en Costa Rica. Tésis Mag. Sc. UCR. San José, Costa Rica. 78p.

- TAPIA F., A.C.; VASQUEZ, N.; GALINDO, J.J.. 1989. Estudios sobre el proceso de infección, métodos de inoculación e identificación de la resistencia a *Mycosphaerella fijiensis* en *Musa sp.* In Reunión de Revisión Anual, CATIE. Resúmenes (13-18 de febrero, 1989) Turrialba. Costa Rica. p 18-19.
- VASQUEZ, N.. 1991. Desarrollo de lesiones y estructuras reproductivas de *Mycosphaerella fijiensis* en *Plátano* (*Musa AAB*) en dos épocas climáticas diferentes. Tesis Mag. Sc. UCR. San José, Costa Rica. 79p.
- ZIDACK, N.K.; BACKMAN, P.A.; SHAW, J.J.. 1992. Promotion of bacterial infection by an organosilicone surfactant: Implications for biological weed control. USA. Biological Control. (2) p 111-117.

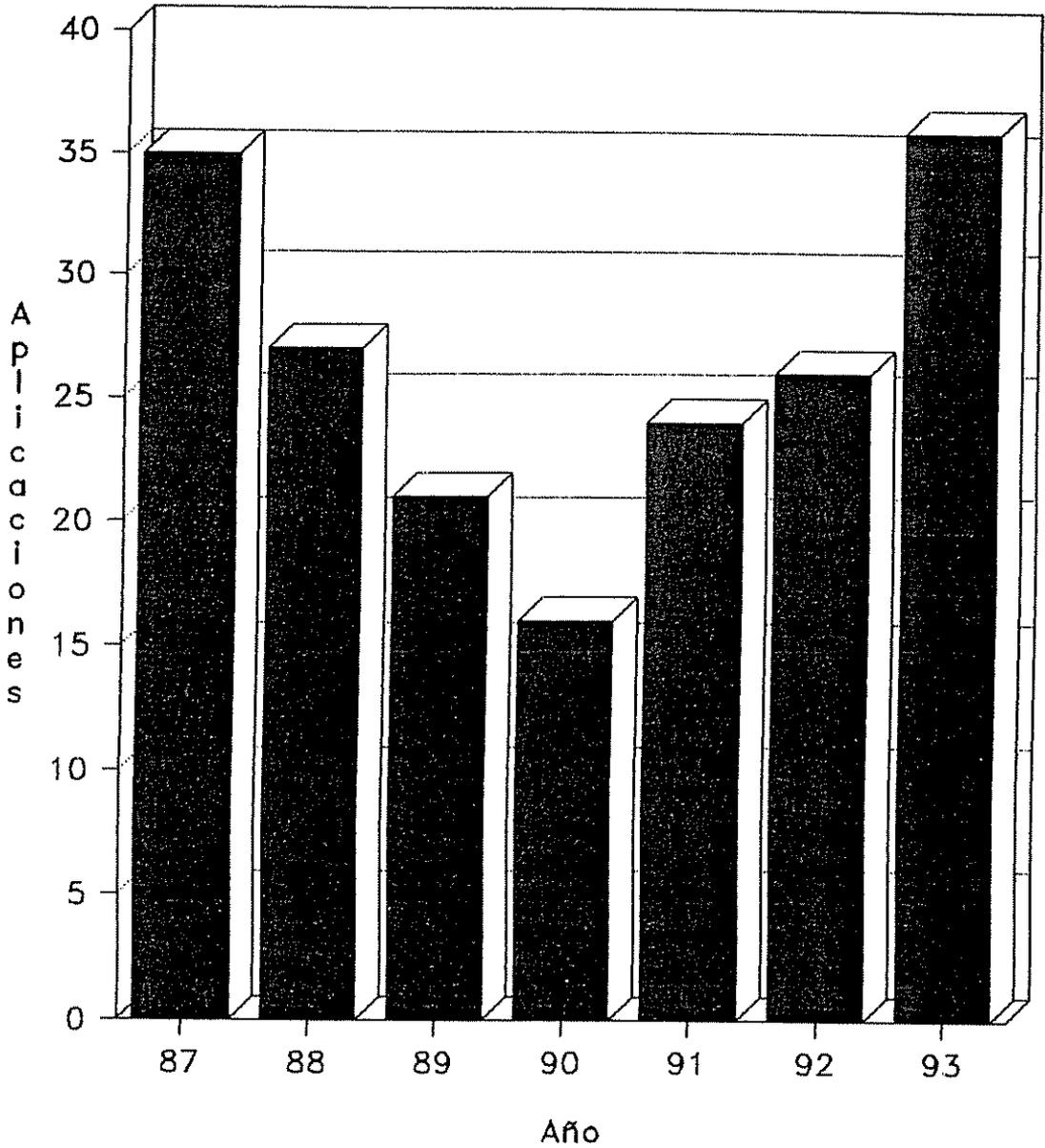
8 ANEXOS

Anexo 1.



Anexo 1: Productividad Promedio
Actividad Bananera en Costa Rica
Fuente: Sauma, 1995.

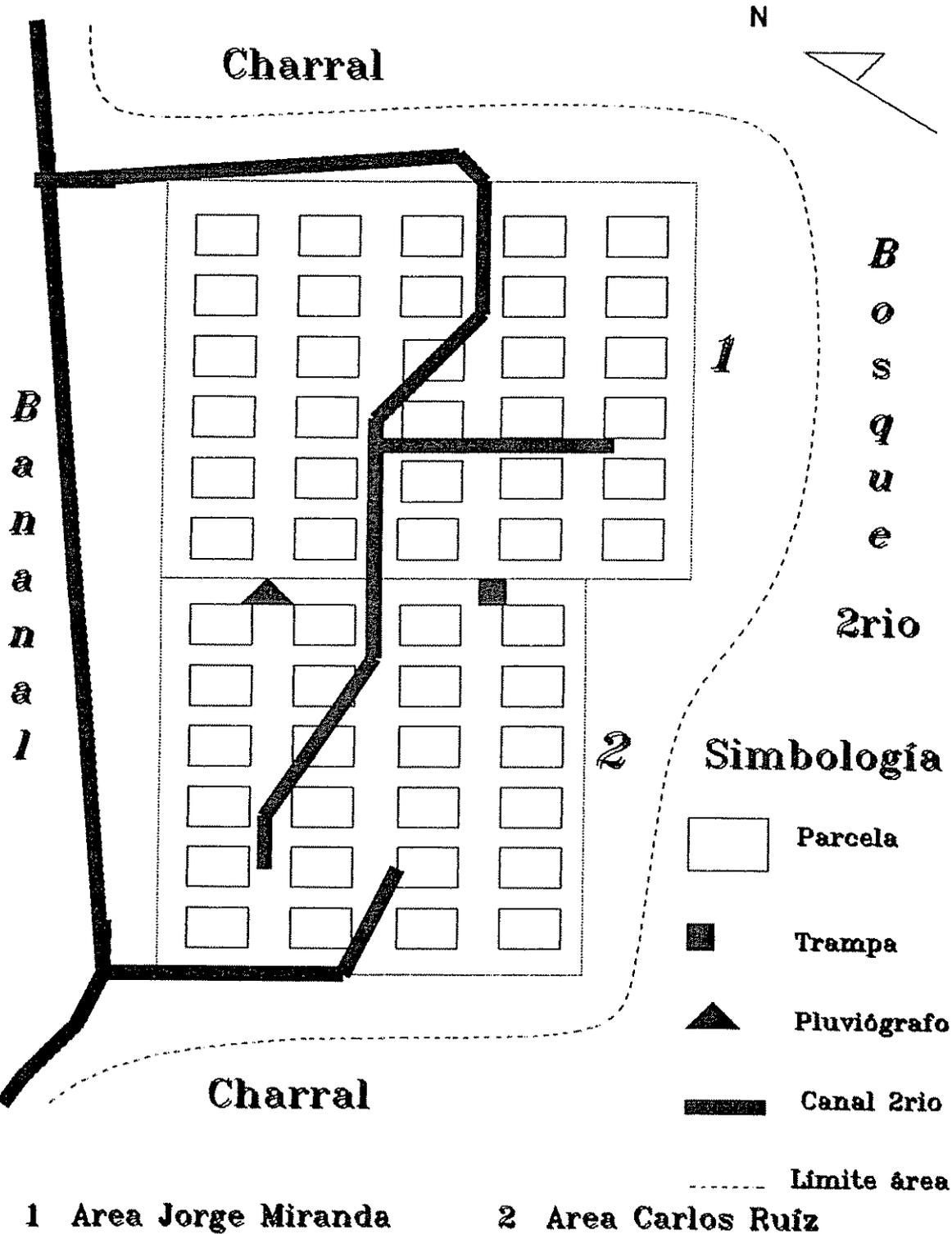
Anexo 2.



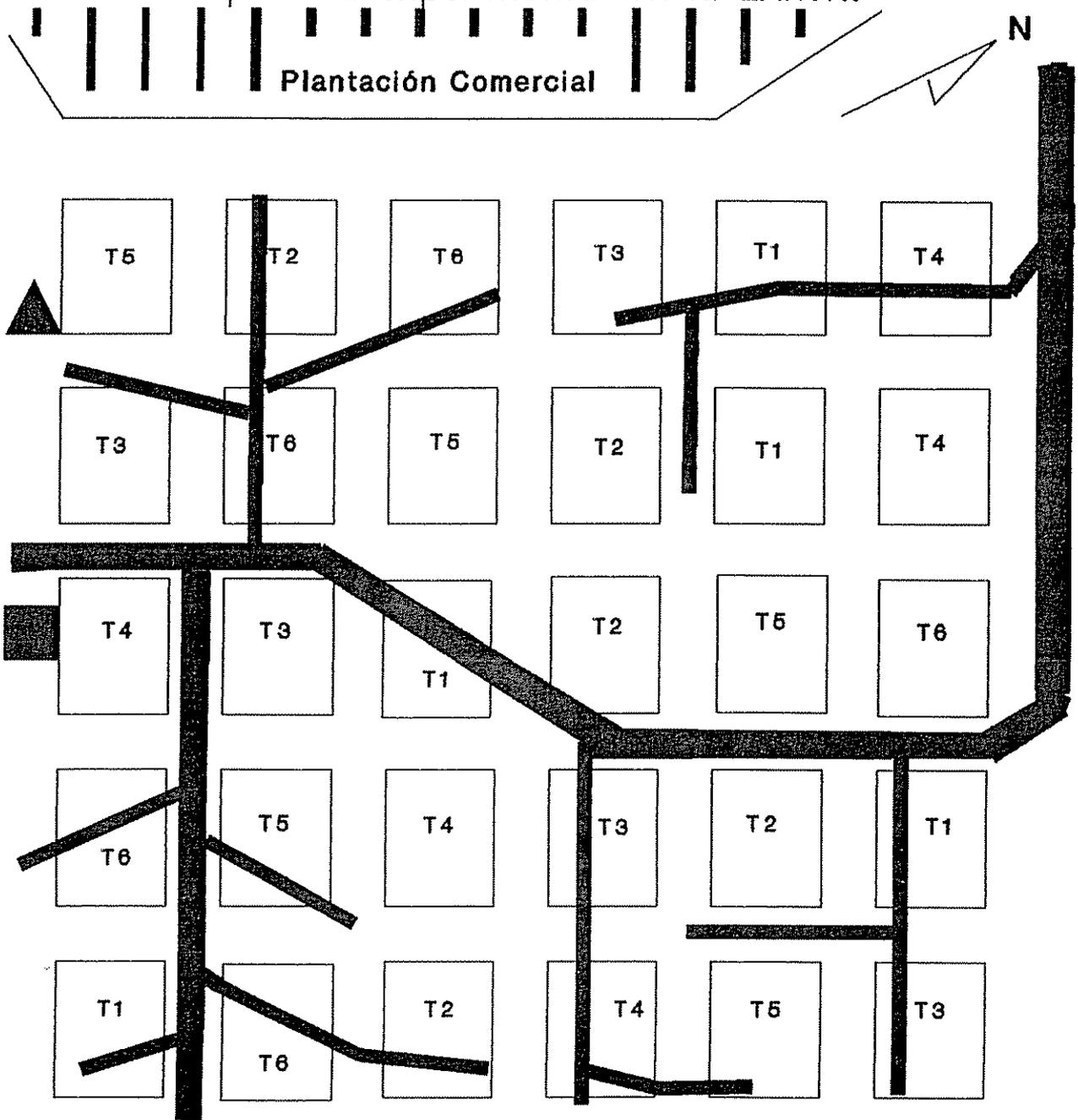
Anexo 2: Número de aplicaciones al año para el combate de la Sigatoka Negra.

Fuente: CORBANA, 1993. (1993=Estimado)

**Anexo 3: Ubicación de la parcela experimental.
Jorge Miranda, Carlos Ruiz.**



Anexo 4: Distribución de los tratamientos en la parcela experimental en la EARTH.



SIMBOLOGIA :

- | | | | |
|---|--|------------------|-------------|
|  TRAMPA ESPORAS |  CANAL 2RIO | T1: Silwet + R1 | T4: R1 |
|  PLUVIOGRAFO |  PARCELA | T2: Nu-Film + R1 | T5: Aceite |
|  CANAL 3RIO | | T3: Aceite + R1 | T6: Testigo |

Anexo 5.

Anexo 5: Resultados (ufc/ml) prueba de toxicidad de los coadyuvantes Silwet L-77, Nu-Film y el aceite agrícola sobre los microorganismos antagonistas a *M. fijiensis*.

Cepa	AGUA (hora 0)	AGUA	SILWET	ACEITE	NU-FILM
R-1	2.0×10^7	2.7×10^7	3.6×10^7	2.3×10^7	2.2×10^7
A-23	1.5×10^7	2.7×10^7	4.2×10^7	2.1×10^7	3.2×10^7
A-30	7.1×10^6	1.0×10^7	2.3×10^7	1.8×10^7	9.2×10^6
Q-2	1.6×10^7	6.9×10^6	2.7×10^7	1.9×10^7	7.0×10^6
Q-5	6.5×10^6	5.2×10^6	3.0×10^7	1.8×10^7	7.2×10^6

(ufc/ml) = Unidades formadoras de colonia por mililitro.

Anexo 6.

Anexo 6: Datos meteorológicos durante el período de inoculación, desarrollo y evaluación de la Sigatoka en la prueba de control en plantas desarrolladas en invernadero.

Fecha		Temperatura			Precipit.	Humedad	Velocidad
mes	día	max °C	min °C	med °C	Diaria mm	Relativa %	Viento m/s
Junio	12	28.6	20.4	22.1	1	91.3	0.80
"	13	30.8	20.2	22.2	18	93.1	0.85
"	14	26.1	19.0	21.0	0	91.4	0.80
"	15	29.8	19.0	22.4	23	93.1	0.87
"	16	29.8	18.8	22.4	11	90.1	0.68
"	17	30.0	19.6	23.4	1	91.8	0.87
"	18	30.3	20.5	23.6	28	89.9	0.83
"	19	30.2	18.7	22.4	43	89.8	0.90
"	20	30.4	18.4	22.6	2	89.2	0.94
"	21	31.2	20.4	22.9	4	87.4	0.69
"	22	30.9	20.7	23.9	0	90.8	0.74
"	23	30.9	19.0	22.1	2	88.3	0.56
"	24	30.9	17.7	22.2	17	92.5	0.97
"	25	28.7	18.4	21.5	0	87.7	0.81
"	26	29.1	18.0	22.6	0	89.2	0.93
"	27	28.4	19.8	21.8	0	88.3	0.64
"	28	28.9	19.3	22.0	6	91.9	0.75
"	29	29.2	18.7	22.1	1	91.5	0.98
"	30	26.4	18.2	20.5	2	88.2	0.83
Julio	1	30.1	18.4	22.2	52	89.1	0.90
"	2	29.5	19.4	23.4	1	88.4	0.93
"	3	28.6	20.3	22.5	3	88.7	0.78
"	4	30.1	19.3	23.2	0	91.1	0.83
"	5	27.6	19.6	21.1	0	89.2	0.91
"	6	29.2	19.7	22.0	25	90.5	0.95
Promedio		28.3	19.3	22.3	240 ¹	90.1	0.80

Fuente: Estación CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1995.

1= Es un acumulado no un promedio.

Anexo 7.

Estimación de la concentración de inóculo de *M. fijiensis* en el aire a partir de los datos registrados con la trampa volumétrica.

La metodología siguiente es la recomendada por la compañía productora de las trampas, según aparece en el manual de operación de las mismas. (BURKARD MANUFACTURING Co.Ltd.s.f.)

1. La cinta de la trampa es retirada y colocada sobre la regla calibrada de siete secciones que incluye el equipo. Cada sección de estas representa un día de la semana. El cilindro del reloj interno de la trampa expone dos milímetros de cinta cada hora, por lo que la sección o día mide exactamente 48 mm de largo, que es lo correspondiente a las 24 horas de cada día, por 14 mm de ancho, para un área total de 672 mm² por día.

2. Una vez separada cada sección, son colocadas en portaobjetos y cubiertas con Gelvatol y un cubreobjetos para evitar la humedad y el deterioro. Se recomienda guardarlas a 4°C para que no haya germinación de las esporas y posible contaminación con bacterias y hongos.

3. Para el conteo de las esporas se utiliza un microscopio con un aumento adecuado al tamaño de las partículas de interés. En este caso las observaciones se realizaron con 200 aumentos. Con estos aumentos se obtiene un campo óptico de 1 mm de diámetro.

4. La observación se realizó haciendo un muestreo de cinco desplazamientos desde la primera hasta la vigésima cuarta hora para cada sección (día), ubicados en cinco diferentes posiciones del ancho total de cinta y en sentido paralelo al movimiento del cilindro en la trampa. Contando las ascosporas que aparecían a lo largo de cada desplazamiento; la sumatoria de las esporas observadas en los cinco desplazamientos corresponde a las observadas en el muestreo (representadas por una X).

5. A partir de este dato se realizan los siguientes cálculos:

a. Área cubierta por cada desplazamiento:

diámetro del campo óptico * largo de la sección =

$$(1 \text{ mm} * 48 \text{ mm}) = 48 \text{ mm}^2$$

Anexo 7.
(continuación)

b. Area cubierta por muestreo:

$$\begin{aligned} \text{número de desplazamientos} * \text{área de cada desplazamiento} = \\ (5 * 48 \text{ mm}^2) = 240 \text{ mm}^2 \end{aligned}$$

c. Número de esporas registradas en el área total de la sección (día) (representadas por X'):

$$(\text{número de esporas contadas por muestreo}) * (\text{área total por día o sección}) * (\text{área por muestreo}) =$$

$$(\text{esp./muestreo}) * (672 \text{ mm}^2 \text{ día}^{-1}) / (240 \text{ mm}^2/\text{muestreo}) = X'$$

o lo que es lo mismo:

$$(X * 2.8) = X' \text{ esporas/día}$$

d. Esporas por metro cúbico de aire:(representadas por X'')

Dato importante suministrado por el manual: succión de la trampa= 0.6 m³ de aire/hora, es decir:

$$0.6 * 24 = 14.4 \text{ m}^3 \text{ de aire/día}$$

por lo tanto:

Esporas por metro cúbico de aire se calcula:

número de esporas por día / metros cúbico de aire por día

$$X' \text{ esporas/día} / 14.4 \text{ m}^3/\text{día} = X''$$

En resumen, para el caso de 200 aumentos y cinco desplazamientos por muestreo, cada espora observada en la cinta representa:

$$(2.8 / 14.4) = 0.2 \text{ esporas por m}^3 \text{ de aire.}$$

Factor de conversión:

Esporas por metro cúbico de aire= (esporas por día * 0.2)

Anexo B.

Anexo B: Resultados análisis de suelo utilizado en la prueba de ubicación endofítica a través de la raíz. (*)

Nutrimientos:	Suelo	Optimo ¹
Ca	4,52	4-20
Mg	1,23	1-10
K	0,20	0,2-1,5
P	9,70	10-40
pH	4,9	5,5-6,5
Materia Orgánica (%)	5,83	5,1
Relaciones:		
Ca/Mg	3,67	3,5-4,0
Ca/K	22,60	17,0-25,0
Mg/K	6,15	8,0-15,0
(Ca+Mg)/K	28,75	20,0-30,0
100 K/(Ca+Mg+K)	3,36	3,0-5,0

Textura: Arcilloso (Arena 26,4%, Limo 31,6%, Arcilla 42,0%)

(*) = Laboratorio de suelos CATIE.

(1) = Fuente: López y Espinoza, 1995.

Anexo 9.

Anexo 9: Incrementos semanales (cm) del diámetro del tallo a un centímetro de altura para las plantas tratadas en la prueba de inoculación endofítica por la raíz.

Tratamientos	Semana			
	1	2	3	4
R-1	0,022	0,042	0,138	0,108
A-23	0,024	0,044	0,134	0,158
A-30	0,030	0,102	0,210	0,200
Q-2	0,022	0,102	0,060	0,068
Testigo	0,014	0,032	0,112	0,098
R-1 +Subst.	0,010	0,046	0,114	0,160
A-23 + Subst.	0,020	0,070	0,128	0,174
A-30 + Subst.	0,018	0,064	0,178	0,208
Q-2 + Subst.	0,022	0,095	0,058	0,085
Test. + Subst.	0,010	0,018	0,144	0,258