

**AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE HONGOS ANTAGONISTAS EN
PLANTACIONES DE BANANO (*Musa* AAA) PARA EL COMBATE
BIOLÓGICO DE LA SIGATOKA NEGRA**

CLAUDIANA CARR RODRÍGUEZ

Trabajo final de graduación presentado a la Escuela de Agronomía como requisito parcial
para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería en Agronomía

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

SEDE REGIONAL SAN CARLOS

ESCUELA DE AGRONOMÍA

2009

**AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE HONGOS ANTAGONISTAS EN
PLANTACIONES DE BANANO (*Musa* AAA) PARA EL COMBATE
BIOLÓGICO DE LA SIGATOKA NEGRA**

CLAUDIANA CARR RODRÍGUEZ

Trabajo final de graduación presentado a la Escuela de Agronomía como requisito parcial
para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería en Agronomía

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
SEDE REGIONAL SAN CARLOS
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

2009

**AISLAMIENTO Y SELECCIÓN DE HONGOS ANTAGONISTAS EN
PLANTACIONES DE BANANO (*Musa* AAA) PARA EL CONTROL
BIOLÓGICO DE LA SIGATOKA NEGRA**

CLAUDIANA CARR RODRÍGUEZ

Aprobado por los miembros del Tribunal Evaluador:

Ing. Agr. Mauricio Guzmán Quesada, M.Sc.

Asesor Externo
CORBANA S.A

Biólogo. Omar Gätjens Boniche, M.Sc.

Asesor Interno
I.T.C.R.

Ing. Agr. Alejandro Rodríguez Morales, Lic.

Jurado
CORBANA S.A

Ing. Agr. Xiomara Mata Granados, Lic.

Jurado
I.T.C.R.

Ing. Agr. Fernando Gómez Sánchez, MAE

Coordinador de Trabajos Finales de
Graduación

I.T.C.R.

Ing. Agr. Arnoldo Gadea Rivas, MAE

Director de la Escuela de Agronomía

I.T.C.R

2009

DEDICATORIA

A mi familia, Ana Rodríguez, Claudio Carr, Katherine Carr y Claudio César Carr
creer en mí, por el apoyo, la paciencia y el amor que me dan siempre.

AGRADECIMIENTO

A Dios por darme la oportunidad de llegar hasta aquí y las fuerzas para no rendirme nunca.

A todas las personas que estuvieron conmigo en el camino de mis estudios, a los profesores y compañeros del TEC. Especialmente Jennifer Monge, Sofía Monge, Melissa Pérez (hermanas de vida), Marilyn Sánchez, Keinner Araya, Alex Ramírez y Pablo Zúñiga compañeros de generación y de mil historias juntos, que estuvieron siempre en las buenas y en las no tan buenas. Y a mis compañeros de cursos, siempre sinceros, con buena energía, excelentes amigos: Jorge Rodríguez, Jorge Álvarez, Didier Rodríguez, Ronny Barrantes y Fernando Araya. A Teresita Fallas y Julissa Alcázar por ayudarme y hacerme reír muchas veces.

A todo el personal de CORBANA S.A. que siempre estuvieron dispuestos a ayudar en este proyecto, me brindaron su amistad, colaboración y apoyo, especialmente a los laboratorios de fitopatología: Donny Vargas, Sergio Duran, Ronny Castillo, Juan Angulo, Carlos Ramos, Ing. Ricardo Villalta (Compañero de giras), Ing. Igor Martínez (compañero social) y al Ing. Gilberth Murillo. Control Biológico: Alberto Guevara, José Peña y al Ing. Alejandro Rodríguez y Biología Molecular: Rogelio Gómez y al Ing. Olman Vargas. Porque me hicieron sentir parte del grupo, por los consejos y los momentos en que fuimos compañeros y amigos, gracias por ser parte de este proyecto.

A los profesores Xiomara Mata y Omar Gatjens gracias por su colaboración.

Al Ing. Mauricio Guzmán por darme la oportunidad de realizar este proyecto, por sus consejos (para el trabajo y de vida), paciencia, su apoyo y confianza, por estar siempre dispuesto a escucharme y ayudar.

A todos gracias.

TABLA DE CONTENIDOS

DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTO	v
TABLA DE CONTENIDOS	vi
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ANEXOS	xiii
RESUMEN	xiv
ABSTRACT	xvii
1. INTRODUCCION	1
OBJETIVOS.....	4
2.1. Objetivo general:.....	4
2.2. Objetivos específicos:	4
3. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
3.1. Generalidades del cultivo de Banano	5
3.2. Estado actual de la producción bananera en Costa Rica	5
3.3. Combate Biológico.....	6
3.3.1. Antibiosis como mecanismo de combate biológico.....	7
3.4. Sigatoka negra (<i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet).....	11
3.4.1. Etiología.....	12
3.4.2. Desarrollo de los síntomas de la Sigatoka negra	13
3.4.3. Combate químico, cultural y genético de la Sigatoka negra	14
3.4.4. Combate biológico de Sigatoka negra.....	16
4. MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1. Ubicación del experimento.....	23
4.2. I Etapa. Desarrollo de una metodología para el aislamiento y selección preliminar de hongos con potencial como agentes de combate biológico (ACB)	

4.2.1. Obtención de un medio semiselectivo para aislar hongos con bajos requerimientos nutricionales y actividad quitinolítica	23
4.3. II Etapa. Colecta de muestras en fincas y aislamiento de los potenciales ACB	24
4.3.1. Colecta de las muestras	24
4.3.2. Aislamiento de los potenciales hongos agentes de combate biológico (ACB) de las fincas	27
4.4. III Etapa. Purificación y conservación de los aislamientos de los potenciales ACB	28
4.4.1. Purificación inicial de los aislamientos	28
4.4.2. Obtención de cultivos de porciones mínimas de micelio de los aislamientos	28
4.4.3. Conservación de los aislamientos	29
4.5. IV Etapa. Producción de metabolitos secundarios de los potenciales ACB31	
4.5.1. Siembra y producción de los metabolitos secundarios de los aislamientos	31
4.5.2. Separación de los metabolitos secundarios de los potenciales ACB	32
4.6. V Etapa. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad biológica de los metabolitos secundarios sobre <i>M. fijiensis</i>	33
4.6.1. Descargas de ascosporas de <i>M. fijiensis</i>	33
4.6.2. Variables evaluadas	34
4.6.3. Diseño experimental de la evaluación <i>in vitro</i> de la actividad fungicida con los metabolitos secundarios	35
4.6.4. Análisis de los datos	36
4.7. VI Etapa. Evaluación en condiciones de invernadero de la eficacia biológica sobre la Sigatoka negra de los metabolitos secundarios que mostraron mayor actividad <i>in vitro</i>	36
4.7.1. Material vegetal	37
4.7.2. Inoculación del patógeno y aplicación de los tratamientos	37
4.7.3. Manejo de las plantas después de la inoculación y aplicación de los tratamientos	39

4.7.4. Diseño experimental.....	39
4.7.5. Análisis estadísticos	40
4.7.6. Variables evaluadas	40
5. RESULTADOS.....	41
5.1. I Etapa. Desarrollo de una metodología para el aislamiento y selección preliminar de hongos con potencial como agentes de combate biológico (ACB)	41
5.1.1. Obtención de un medio semiselectivo para aislar hongos con bajos requerimientos nutricionales y actividad quitinolítica	41
5.4. IV Etapa. Producción de metabolitos secundarios de los potenciales ACB45	
5.5. V Etapa. Evaluación in vitro de la actividad fungicida de los metabolitos secundarios	46
5.5.1. Comparación de la eficiencia de las dos técnicas de separación de metabolitos secundarios (calor/presión vs filtrado al vacío).....	49
5.6. VI Etapa. Evaluación en condiciones de invernadero de la eficacia biológica sobre la Sigatoka negra de los metabolitos secundarios que mostraron mayor actividad in vitro	51
6. DISCUSIÓN	56
7. CONCLUSIONES	62
8. RECOMENDACIONES	64
9. BIBLIOGRAFIA	65
10. ANEXOS	82

LISTA DE CUADROS

Número	Título	Página
1	Características de las fincas seleccionadas para la toma de muestras.	26
2	Cantidad de hongos aislados de las fincas como candidatos a agentes de combate biológico de la Sigatoka negra.	43
3	Tratamientos evaluados por finca y la cantidad de aislamientos que mostraron un efecto inhibitorio destacado.	47
4	Ordenamiento de los aislamientos con metabolitos más activos según el método de extracción de los mismos. Como referencia se utilizó la sumatoria del porcentaje de ascosporas no germinadas y con tubos cortos y distorsionados (NG + CyD).	48
5	Comparación de la eficiencia de las dos técnicas de separación de metabolitos secundarios (calor/presión vs filtrado al vacío).	49
6	Comparación del efecto del método de extracción sobre la eficacia <i>in vitro</i> de 10 metabolitos. Se utilizó como referencia la sumatoria del porcentaje de esporas no germinadas y esporas con tubos cortos y/o distorsionados.	51
7	Medias de severidad (% de necrosis) de la Sigatoka negra en los tratamientos, aplicados 24 y 96 horas después de la inoculación del patógeno en condiciones de invernadero. Evaluación realizada 50 días después de la inoculación.	53

LISTA DE FIGURAS

Número	Título	Página
1	Composición general de la pared celular de un hongo que muestra la presencia de proteínas y mananoproteínas, glucanos y quitina. Modificado de http://aem.asm.org/cgi	9
2	Ciclo de infección de Sigatoka negra. Modificado de Mourichon <i>et al.</i> (1997).	13
3	Tipo de material colectado en las diferentes fincas. Tejido foliar, depositado en el suelo y con lesiones de Sigatoka negra	25
4	Esquema que representa el procedimiento general empleado para el aislamiento de los agentes de combate biológico (ACB) de las fincas.	27
5	Equipo de liofilización del laboratorio de Biología Molecular de CORBANA, utilizado para el tratamiento de los aislamientos.	30
6	Medio YEGK rico en quitina. (A) Homogeneizado por agitación y (B) en reposo, nótese la precipitación de la quitina coloidal. (C) Suspensión madre de un cultivo puro con la que se inoculó el medio.	31
7	Producción de metabolitos en medio líquido mineral. (A) Agitador orbital utilizado para la incubación dinámica de los cultivos y (B) crecimiento de los potenciales agentes de combate biológico después de 14 días en medio YEGK rico en quitina.	32
8	Diferentes tipos de respuestas en germinación de ascosporas por efecto de los metabolitos secundarios. (A) No germinadas, (B) Tubos cortos, (C) Tubos cortos y malformados, (D)	34

	Germinación normal, (E) Tubos malformados y (F) Tubos múltiples o ramificados.	
9	Molde utilizado para la demarcación de las áreas en las hojas. En el cuadrado del centro se aplicaron los tratamientos y los rectángulos funcionaron como testigos.	38
10	Forma de aplicación del inoculo y los tratamientos, mediante la utilización de un aerógrafo.	39
11	Crecimiento de hongos en medios PDA (100 – 25 - 12,5 - 6,25 y 0 %) + quitina coloidal 1 %. Nótese el abundante crecimiento de los hongos a 100, 25 y 12,5 % que dificulta la selección y purificación de candidatos por el abundante crecimiento de micelio. Por el contrario, cuando no se adiciona PDA el crecimiento es muy pobre, lo que también limita la elección de candidatos. El balance adecuado se estableció es cuando se adicionó un 6,25 % de PDA (2,43 g/L).	42
12	Algunos hongos candidatos a ACB de <i>M. fijiensis</i> en un medio PDA al 6,5 % + quitina coloidal 1 % + antibiótico. La flecha de color blanco indica un halo de degradación de la quitina, evidencia de la presencia de un hongo con actividad quitinolítica.	43
13	A. Crecimiento de algunos aislamientos sometidos a la primera purificación. B. Algunos cultivos monospóricos de los potenciales ACB. Nótese la reducida cantidad de UFC por plato y la uniformidad y pureza de las colonias.	44
14	(A) Algunos aislamientos conservados en aceite mineral y listos para almacenar. (B) Algunos aislamientos liofilizados y listos para ser conservados. (C) Desecador cubierto con papel	45

	aluminio para mantener los cultivos liofilizados en la oscuridad.	
15	Crecimiento de los potenciales agentes de combate biológico en medio líquido de YEGK después de 14 días de haber sido sembrados. El vial del centro sirve de referencia ya que no fue inoculado. Nótese en el vial de la izquierda el cambio de coloración del medio por la producción de un pigmento amarillo y en el vial de la derecha el abundante crecimiento de micelio y la degradación de la quitina coloidal que típicamente se deposita en el fondo.	46
16	Comparación de la eficiencia, en términos del efecto sobre la germinación de ascosporas, de las dos técnicas de separación de metabolitos secundarios utilizadas en el estudio.	50
17	Identificación morfológica de los hongos más promisorios que fueron llevados a pruebas de invernadero.	55

LISTA DE ANEXOS

Número	Título	Página
1	Metodología para obtener quitina coloidal a partir de caparazones de camarones (Salazar y Okumoto).	82
2	Protocolo de extracción de ADN utilizado en el Laboratorio de Biología Molecular de CORBANA S.A.	84
3	Análisis de varianza para la evaluación de la actividad <i>in vitro</i> de los diferentes metabolitos de los aislamientos seleccionados.	85
4	Ordenamiento de los 25 aislamientos que produjeron los metabolitos más activos <i>in vitro</i> (esporas no germinadas + esporas con tubos cortos $\geq 50\%$) sobre la germinación de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> .	86
5	Análisis de varianza para la evaluación de la actividad <i>in vivo</i> de los metabolitos secundarios evaluados en invernadero	87

RESUMEN

El combate químico es todavía la herramienta más empleada y efectiva en el manejo de la Sigatoka negra en banano. Sin embargo, existe mucho interés por incorporar el combate biológico, como parte de estrategias de manejo de la enfermedad más integrales y sostenibles. Para lograr lo anterior se requiere seleccionar, preferiblemente dentro de las mismas plantaciones, microorganismos con alta capacidad antagonista. Esta investigación se desarrolló con el objetivo de aislar y seleccionar de plantaciones de banano, con diferentes formas de manejo, hongos con actividad quitinolítica y antagonista contra *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra.

Se tomaron muestras en plantaciones de fincas comerciales (con historial de alta y baja presión de la enfermedad), plantaciones orgánicas, parcelas testigo (con manejo convencional excepto que no se aplican fungicidas) y huertos mixtos (huertos caseros en los que las plantas de banano coexisten con otras plantas de interés agrícola ornamental o medicinal). En ellas se colectaron partes de hojas de banano, depositadas en el suelo, con lesiones maduras de la enfermedad, sobre las cuales se distinguía algún tipo de crecimiento de hongos diferentes de *M. fijiensis*. De estas lesiones se realizaron aislamientos en medio semiselectivo (con antibiótico, pobre en nutrientes y rico en quitina) para discriminar y seleccionar aquellos menos exigentes a condiciones nutricionales y con actividad quitinolítica. Se logró aislar un total de 196 hongos candidatos a agentes de combate biológico de *M. fijiensis*. La cantidad de aislamientos varió entre 13 y 39 por finca, con una tendencia a mayor frecuencia de candidatos en los huertos mixtos y las fincas orgánicas, el 39,8 % de todos los aislamientos presentó actividad quitinolítica.

Los aislamientos seleccionados se cultivaron en un medio líquido mineral rico en quitina, durante 14 días, para promover la producción de los metabolitos secundarios (MSs), los cuales se separaron del material vivo por dos métodos: calor/presión (autoclavado) y filtración al vacío. Se preparó medio agar-agua con 5 % de los MSs de cada aislamiento, el cual se vertió en platos de Petri, sobre los cuales, una vez endurecidos, se indujeron descargas de ascosporas desde

lesiones maduras de la enfermedad. Los platos se incubaron por 48 horas a 27 °C y en la oscuridad y posteriormente, se evaluó el porcentaje de ascosporas no germinadas (NG), germinadas normalmente (GN), esporas con tubos cortos ($\leq 5 \mu\text{m}$), con tubos distorsionados (C y D) y con tubos germinativos múltiples o ramificados (R). El experimento se estableció bajo un diseño de bloques completos al azar, con arreglo factorial (163 MSs de hongos x 2 métodos de extracción), para un total de 326 tratamientos con 5 repeticiones (cada repetición fue un plato de Petri). En cada repetición se evaluaron 50 ascosporas, para un total de 250 por tratamiento. La extracción por filtración permitió obtener metabolitos con mayor actividad inhibitoria ($P \leq 0,0093$), el autoclavado redujo la actividad *in vitro* de los MSs hasta en un 100 %. De los 326 tratamientos evaluados, 33 mostraron un efecto inhibitorio destacado sobre la germinación de ascosporas. El mayor efecto inhibitorio se observó en los aislamientos obtenidos de los huertos mixtos de San Carlos (SC).

En invernadero se evaluó la eficacia biológica contra la Sigatoka negra de los 7 MSs que mostraron mayor efecto inhibitorio *in vitro* sobre el patógeno: SC-19 (*Paecilomyces lilacinus*), VE-05 (*Penicillium* sp.), SCQ-07 (*Fusarium* sp.), SC-03 (no identificado), VMQ-02 (*Fusarium* sp.), LR-12 (*Penicillium* sp.), T-06 (probable *Chalara* sp.), los dos primeros identificados mediante técnicas moleculares (100 % y 99 % de homología respectivamente) y el resto por morfología de estructuras. Como referencia se utilizó el fungicida clorotalonil a 5.000 mg/L. Los tratamientos se distribuyeron dentro del invernadero en un diseño de bloques completos al azar con arreglo factorial (8 tratamientos x 2 momentos de aplicación: 24 y 96 horas después de la inoculación del patógeno), más un testigo absoluto. Cuando los MSs se aplicaron 24 horas después de la inoculación del patógeno no se observaron diferencias entre ellos ($P \geq 0,5188$), ni entre los MSs SC-19, T-06 y SCQ-07 y el clorotalonil ($P \leq 0,0368$). Sin embargo, cuando los MSs se aplicaron 96 horas después de la inoculación, no fueron diferentes del testigo absoluto ($P \geq 0,2087$).

Los resultados obtenidos en esta investigación confirman el potencial del combate biológico como alternativa para el manejo integrado de la Sigatoka negra y la metodología desarrollada se convierte en una herramienta para el aislamiento y selección, en plantaciones de banano, de hongos antagonistas a *M. fijiensis*. La implementación sistemática de la misma en diferentes nichos ecológicos, donde coexistan el patógeno y el hospedero, aumentaría las posibilidades de aislar y seleccionar hongos altamente promisorios.

Palabras clave: metabolitos secundarios, métodos de extracción, identificación, conservación de microorganismos.

ABSTRACT

The chemical control still be the most common and effective tool in the management of black Sigatoka in banana. However, there is much interest in incorporating biological control as part of strategies for disease management more integrated and sustainable. To achieve this requires selecting, preferably within the same plantations, antagonistic microorganisms with high capacity. This research was developed with the aim of isolating and selecting banana plantations, with different forms of management, fungal chitinolytic and antagonistic activity against *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka.

Samples were collected in plantations of commercial farms (with a history of high and low disease pressure), organic plantations, plots (with conventional management but do not apply fungicides) and mixed gardens (vegetable gardens where banana plants coexist with other ornamental plants of agricultural or medicinal). They collected parts of banana leaves, placed in the ground with mature lesions of the disease, which was distinguished any different fungal growth of *M. fijiensis*. Of these injuries took place amid semi-selective isolates (with antibiotic, poor in nutrients and rich in chitin) to discriminate and choose the less demanding nutritional conditions and chitinolytic activity. Was isolated a total of 196 candidates fungal biological control agents of *M. fijiensis*. The number of isolates varied between 13 and 39 per farm, with a tendency to increased frequency of joint candidates in gardens and organic farms, 39.8% of all isolates submitted chitinolytic activity.

The selected isolates were cultured in a liquid medium rich mineral chitin for 14 days, to promote the production of secondary metabolites (SMs), which separated the living material by two methods: heat / pressure (autoclaving) and filtration empty. Was prepared water-agar with 5% of the SMs of each isolate, which poured in Petri dishes, on which, once hardened, is induced discharge of ascospores from mature lesions of the disease. The plates were incubated for 48 hours at 27 ° C in the dark and then assessed the percentage of ungerminated

ascospores (NG), germinated normally (GN), spores with short tubes ($\leq 5 \mu\text{m}$), distorted tubes (C and D) and with multiple or branched germ tubes (R). The experiment design was established under a randomized complete block factorial arrangement (163 MSs Fungi x 2 extraction methods), for a total of 326 treatments with 5 repetitions (each repetition was a Petri dish). Each iteration 50 ascospores were assessed for a total of 250 per treatment. The filter extraction allowed to obtain metabolites with greater inhibitory activity ($P \leq 0.0093$), the autoclaving reduced the *in vitro* activity of the MSS up to 100%. Of the 326 treatments evaluated, 33 showed a prominent inhibitory effect on germination of ascospores. The greatest inhibitory effect was observed in isolates obtained from mixed orchards of San Carlos (SC).

In greenhouse biological efficacy was assessed against black Sigatoka 7 MSs that showed greater inhibitory effect *in vitro* on the pathogen: SC-19 (*Paecilomyces lilacinus*), EV-05 (*Penicillium* sp.) SCQ-07 (*Fusarium* sp.), SC-03 (not identified), VMQ-02 (*Fusarium* sp.), LR-12 (*Penicillium* sp.), T-06 (likely *Chalara* sp.), the two first identified by molecular techniques (100% and 99 % homology, respectively) and the remaining structures by morphology. As reference was used fungicide chlorothalonil at 5,000 mg / L. Treatments were distributed inside the greenhouse in block design randomized complete factorial arrangement (8 treatments x 2 application times: 24 and 96 hours after inoculation of pathogen), plus an absolute witness. When SMs was applied 24 hours after inoculation of the pathogen have not difference between them ($P \geq 0.5188$), or between MSs SC-19, T-06 and SCQ-07 and chlorothalonil ($P \leq 0, 0368$). However, when the SMs were applied 96 hours after inoculation, the witness were not different absolute ($P \geq 0.2087$).

The results obtained in this investigation confirm the potential of biological control as an alternative to the integrated management of black Sigatoka and the developed methodology becomes a tool for isolation and selection, banana plantations, fungi antagonistic to *M. fijiensis*. The systematic implementation of it in different ecological niches, where coexist the pathogen and the host would increase the chances of fungal isolate and select highly promising.

Keywords: secondary metabolites, methods of extraction, identification, preservation of microorganisms.

1. INTRODUCCION

La Sigatoka negra, causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (anamorfo *Pseudocercospora fijiensis*), (Crous y Mourichon 2002), es la enfermedad de mayor importancia en el cultivo de banano (Stover y Simmonds 1987, Mourichon *et al.* 1997, Marín *et al.* 2003, Pérez *et al.* 2003, Romero y Guzmán 2006). El patógeno infecta las hojas en sus primeras etapas de desarrollo y evoluciona rápidamente hasta la aparición de manchas necróticas, las que pronto coalescen, destruyendo las hojas (Meredith y Lawrence 1969, Stover 1980, Fouré 1985, Marín *et al.* 2003).

En ausencia de medidas de combate la enfermedad puede reducir la producción en un 100 %, debido a que los frutos no alcanzan el peso y medidas requeridas para la exportación (Marín *et al.* 2003, Romero y Guzmán 2006). En presencia de medidas de combate, el mayor impacto de la enfermedad se refleja en el riesgo de maduración prematura de los frutos (Mourichon *et al.* 1997, Marín *et al.* 2003, Romero y Guzmán 2006, Chillet *et al.* 2008). Este fenómeno puede ocurrir en el campo, pero principalmente durante el tránsito a los puertos de destino en Estados Unidos de Norteamérica, Europa y Asia. Los cultivares del subgrupo Cavendish, utilizados en las plantaciones comerciales para exportación, son altamente susceptibles a la enfermedad, razón por la cual se deben implementar estrictas medidas de manejo del problema (Meredith y Lawrence 1969, Mourichon *et al.* 1997, Romero y Guzmán 2006)

La aplicación aérea de fungicidas (combate químico), es la herramienta más empleada y efectiva en el combate de la Sigatoka negra en las plantaciones de banano (Stover 1980, Mourichon *et al.* 1997, Romero 1997, Marín *et al.* 2003). Sin embargo, por su uso continuo y modo de acción específico, algunos de estos fungicidas han generado poblaciones del patógeno resistentes, lo que ha conllevado progresivamente, a aumentos en el número de aplicaciones (48 a 52 ciclos promedio por año) y en el costo de combate de la enfermedad (hasta \$2.200 ha/año), con un mayor riesgo ambiental (Martínez y Guzmán 2005, Murillo y Guzmán 2005, Guzmán 2009¹).

Las normativas ambientales internacionales (ISO14001, Global Gap y Rain Forest Alliance), la legislación del país, los grupos ambientalistas y los consumidores, exigen una producción de banano con un menor impacto ambiental y un producto inocuo (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación 2002, Laprade 2002, Izquierdo y Rodríguez 2006). Lo anterior requiere la búsqueda de estrategias de manejo de la enfermedad más integrales y sostenibles. Desde esta perspectiva, el combate biológico es una oportunidad y aunque en el caso de la Sigatoka negra, ha sido poco explorado, existen buenos ejemplos de su potencial (Jiménez *et al.* 1985, Mercado y Mora 1990, González 1995, González *et al.* 1996a y 1996b, Miranda 1996, Ruiz Silvera *et al.* 1997, Arango 2002, Ochoa 2002, Riveros *et al.* 2003, Navarro *et al.* 2004, Patiño *et al.* 2006, Zualaga *et al.* 2007, Soto 2008), lo que ha faltado son estudios de campo rigurosos y continuos.

Desde el punto de vista fitopatológico, el combate biológico es la reducción del inóculo o la actividad de un patógeno, por la acción de uno o más organismos (Blakeman y Fokkema 1982, Andrews 1990, Baker y Griffin 1995, Arauz 1998, Haggag y Mohamed 2007). Arauz (1998) menciona que este se puede llevar a cabo por medio de la introducción de agentes biocontroladores específicos, o por medio del manejo del ambiente, para favorecer los organismos biocontroladores nativos. Un organismo biocontrolador puede ejercer su efecto antagonista de diversas formas que incluyen el parasitismo, la competencia por espacio y nutrientes y la antibiosis (Blakeman y Fokkema 1982, Andrews 1990, Baker y Griffin 1995, Arauz 1998, Haggag y Mohamed 2007). Riveros y Arciniegas (2003) consideran que el concepto de combate biológico debe extenderse además, a la utilización de productos naturales como feromonas, productos de fermentación controlada de cultivos de bacterias u hongos (moléculas tipo metabolitos secundarios o proteínas de bajo peso molecular), téis orgánicos (compostajes, lixiviados de lombricompost) y extractos de plantas con algún efecto biocida.

La antibiosis es un fenómeno que está relacionado con la producción de metabolitos secundarios (compuestos orgánicos de bajo peso molecular), los

cuales abarcan una amplia gama de productos naturales con actividad biológica producidos por microorganismos. Estos incluyen enzimas líticas, compuestos volátiles, sideróforos, toxinas, pigmentos y feromonas (Demain 1986, Fravel 1988, Baker y Griffin 1995, Calvo *et al.* 2002, Haggag y Mohamed 2007). En términos generales, los metabolitos pueden causar modificaciones en la morfología del organismo, cambios en algunos procesos fisiológicos, hasta la completa destrucción del organismo. Específicamente, a nivel celular, pueden causar vacuolación, granulación, coagulación, desintegración y lisis (Reilly *et al.* 1945, Fravel 1988, Stefanova *et al.* 1999, Calvo *et al.* 2002, Pontón 2008).

Las bacterias son los principales grupos de microorganismos que se han evaluado como controladores biológicos de *M. fijiensis*. Entre los géneros más importantes estudiados están *Pseudomonas* sp. (Jiménez *et al.* 1985), *Serratia* sp. (Rodríguez 1995, González 1995, Miranda 1996, Patiño 2006) y *Bacillus* sp. (González 1995, Miranda 1996, Riveros *et al.* 2003, Villalta y Guzmán 2006). Los estudios con este último género se han orientado a la selección de microorganismos con capacidad para secretar enzimas hidrolíticas (glucanolítica y quitinolítica). Estas enzimas rompen los enlaces glucosídicos, hidrolizando el respectivo polímero en oligómeros y monómeros. Al actuar sobre los componentes principales presente en la pared celular del hongo, la quitina y el glucano, pueden causar su muerte por lisis (Sastoque *et al.* 2007, Pontón 2008).

Una buena cantidad de estudios demuestran la producción de metabolitos secundarios por parte de hongos filamentosos, que inhiben *in vitro* la germinación de esporas y reducen el crecimiento de los fitopatógenos (Grossbard 1952, Mauchm *et al.* 1988, Cherif y Benhamou 1990, Sutton *et al.* 1997, Tarabily *et al.* 2000, Zhang y Yuen 2000, Okumoto *et al.* 2001, Calvo *et al.* 2002, Ochoa 2002, Freeman *et al.* 2004, Huang *et al.* 2005). Sin embargo, son pocas las investigaciones orientadas a la utilización de metabolitos secundarios producidos por hongos filamentosos para el combate de la Sigatoka negra. De lo anterior se genera el interés por el desarrollo de la presente investigación.

OBJETIVOS

2.1. Objetivo general:

Aislar y seleccionar de plantaciones de banano, con diferentes formas de manejo, hongos con actividad quitinolítica y antagonista contra *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra.

2.2. Objetivos específicos:

1. Desarrollar una metodología para el aislamiento y selección preliminar de hongos con actividad quitinolítica provenientes de plantaciones de banano, como potenciales agentes de combate biológico de *M. fijiensis*.
2. Seleccionar *in vitro* los aislamientos de los hongos que producen metabolitos secundarios con mayor actividad antagonista contra *M. fijiensis*.
3. Evaluar en invernadero la eficacia biológica contra la Sigatoka negra, de los metabolitos secundarios que muestren mayor actividad *in vitro* contra el patógeno.

¹Guzmán, M. 2009. Com. Pers. CORBANA S.A.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. Generalidades del cultivo de Banano

El banano es una planta monocotiledonea del género *Musa* (Familia: *Musaceae*, orden: *Zingiberales*). Es una herbácea gigante, con pseudotallo aéreo no lignificado que puede alcanzar más de 3 metros de altura (Champion 1986, Stover y Simonds 1987, Soto 1992, Heslop-Harrison y Schwaracher 2007). Su centro de origen se ubica en el sur-este asiático (India a Polinesia) y su centro de distribución, se ubica en Malasia o Indonesia. Este es el cuarto cultivo más importante en los países en desarrollo, con una producción aproximada a las 100 millones de toneladas métricas, se siembra en todo el trópico húmedo y en los subtrópicos de las Américas, África y Asia (Stover y Simonds 1987, Robinson 1996, Heslop-Harrison y Schwaracher 2007).

Mundialmente son reconocidos más de cien cultivares, la mayoría de estos se derivan de cruces inter e intraespecíficos entre dos especies silvestres diploides *Musa acuminata* (AA) y *Musa balbisiana* (BB); de estos cruces surgen diploides, triploides y tetraploides. Muchas de las musáceas domesticadas que son triploides ($22n=3x=33$), con una constitución de AAA (mayoría de banano dulce), AAB o ABB (mayoría pero no exclusivo de los plátanos y bananos de cocción), (Champion 1986, Stover y Simonds 1987, Robinson 1996, Heslop-Harrison y Schwaracher 2007).

3.2. Estado actual de la producción bananera en Costa Rica

Las regiones del país donde se produce banano en forma comercial para exportación son: Pococí (18,5 %), Siquirres (17,6 %), Matina (24 %), Guácimo (6 %), Limón (9 %), Sarapiquí (14 %) y Talamanca (5 %), todas estas localizadas en la Vertiente del Caribe del país. El resto de la producción se localiza en el Pacífico Central y Sur de Costa Rica (CIB 2008).

Actualmente, la industria bananera está formada por un 40 % de productores nacionales y el otro 60 % lo constituyen empresas comerciales extranjeras que cultivan y exportan, tales como: Standard Fruit Co. (DOLE), Del Monte, Chiquita Brands y FYFEES (CIB 2008). Para el año 2007 la producción de banano representó un 7,7 % del total de exportaciones de Costa Rica y un 45 % de las exportaciones concernientes a la actividad agrícola, lo cual ubica al sector bananero como la principal actividad en este rubro en el ámbito nacional (CIB 2008). Además, esta actividad fue la responsable de generar cuarenta mil empleos directos y aproximadamente ciento cincuenta mil indirectos (Sauma 2008).

Así mismo, Sauma (2008) indica que el valor total de las exportaciones para el 2007, superó los \$660.000.000 (seiscientos sesenta millones de dólares) y que en este mismo año se registró un incremento en la producción bananera, con lo que se aumentó las exportaciones en aproximadamente 4 millones de cajas.

En la actualidad Costa Rica es el tercer país exportador de banano a nivel mundial, con una exportación de más de 100 millones de cajas de 18,14 kg. Estas exportaciones permiten al país proveer el 18 % del banano total que se exporta en el mundo, el primer lugar lo ostenta Ecuador con una producción de 220 millones de cajas anuales (CIB 2008)

3.3. Combate Biológico

El combate biológico es la reducción del inóculo o la actividad de un patógeno, por la acción de uno o más organismos, incluyendo la planta hospedera y excluyendo al hombre (Blakeman y Fokkema 1982, Ocho 2002, Haggag y Mohamed 2007). En los últimos años el concepto se ha extendido a la utilización de productos naturales como productos de fermentación controlada de cultivos de bacterias u hongos (moléculas tipo metabolitos secundarios o proteínas de bajo peso molecular), téis orgánicos (compostajes, lixiviados de lombricompost) y extractos de plantas con algún efecto biocida (Riveros y Arciniegas 2003). Estas alternativas pueden desempeñar un papel importante en la protección de cultivos, si se maneja bajo el concepto de Manejo Integrado de Plagas (Blakeman y Fokkema 1982, Fravel 1988, Vargas y Wang 1999).

El combate biológico posee el potencial para reducir los daños causados por los patógenos (Blakeman y Fokkema 1982, Haggag y Mohamed 2007), pero algunos investigadores consideran que la disminución en el éxito de este tipo de combate, se debe a la falta de entendimiento de los procesos y relaciones que se presentan en los agroecosistemas donde se desarrollan (Vargas y Wang 1999). Además, es de suma importancia entender completamente la biología y ecología del agente de combate biológico, para que el control de la enfermedad sea exitoso (Papaviza 1985, Andrews 1990). El combate biológico puede darse por mecanismos antagónicos (competencia por nichos o nutrientes en el hospedero, hiperparasitismo, antibiosis e hipovirulencia) y no antagónicos (resistencia adquirida y protección cruzada) (Vargas y Wang 1999, Haggag y Mohamed 2007), aunque la gran mayoría de investigaciones se centran en los mecanismos antagónicos.

3.3.1. Antibiosis como mecanismo de combate biológico

La antibiosis es el fenómeno mediante el cual un microorganismo antagonista inhibe o destruye a un organismo por medio de la producción metabólica de pequeñas moléculas tóxicas, compuestos volátiles y de enzimas líticas. Estas últimas disuelven o dañan polímeros estructurales, como quitina y β 1-3-glucanos, de la pared celular en la mayoría de los microorganismos fitopatógenos (Fravel 1998, Baker y Griffin 1995, Brodhagen *et al.* 2003).

Haggag y Mohamed (2007) señalan que los antibióticos antifúngicos pueden actuar de dos formas, por efectos fungistáticos (no permite el crecimiento) o por efecto fungicida (elimina al patógeno). Los modos de acción incluyen: limitación de la formación de la pared celular o su degradación, inhibición o interferencia en la síntesis de proteínas y ADN, bloqueo de procesos metabólicos, entre otros.

3.3.1.1. Metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios (idiolitos) son compuestos de bajo peso molecular especiales, los cuales no son esenciales para el crecimiento del hongo en cultivos

puros, pero si tienen función para su sobrevivencia en la naturaleza. Dentro de estos se incluye a: micotoxinas, antibióticos, pigmentos, feromonas, fenoles y alcaloides (Demain 1986, Calvo *et al.* 2002, Haggag y Mohamed 2007).

Demain (1986), señala que los cultivos de los hongos muestran dos fases diferenciadas, la primera donde se da el crecimiento del microorganismo (trofofase), y la segunda en donde se da la producción de metabolitos secundarios (idiofase). Para la idiofase existen mecanismos específicos que regulan el inicio de la síntesis de idiolitos, que incluyen la supresión de las fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato y la inducción enzimática (Duffy y Défago 1999, Calvo *et al.* 2002). Algunos de los idiolitos producidos *in vitro* son capaces de inhibir la germinación de esporas y el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos. Los microorganismos capaces de producir este tipo de metabolitos son potenciales Agentes de Combate Biológico (ACB) (Grossbard 1952, Duffy y Défago 1999, Johnson y DiLeone 1999, Chernin *et al.* 1995, Okumoto *et al.* 2001, Calvo *et al.* 2002, Freeman *et al.* 2004).

3.3.1.2. Metabolitos secundarios en el combate de patógenos

Los hongos son uno de los principales grupos de microorganismos con la capacidad de producir sustancias antibióticas. Los efectos que pueden tener estas sustancias (metabolitos secundarios) resultan en cambios en la morfología de los organismos, en los mecanismos fisiológicos o en la completa destrucción del organismo (Reilly *et al.* 1945, Calvo *et al.* 2002).

Pontón (2008) señala que la pared celular de los hongos está compuesta básicamente de polisacáridos (glucanos, quitina) y glicoproteínas (Figura 1). Al ser la pared celular una estructura esencial para los hongos, su eliminación o su malformación, tienen efectos negativos profundos en el crecimiento y la morfología de la célula fúngica, y puede causar su muerte por lisis. Este tipo de efecto puede ser causado por enzimas como las quitinasas, glucanasas y proteasas (Calvo *et al.* 2002).

Wilkins y Harris (1944), en su compilación de estudios sobre hongos productores de antibióticos con efecto en patógenos, citan los trabajos de Waksman y colaboradores (1941), quienes demostraron que actinomicetes antagonistas prevalecían y estaban ampliamente distribuidos en la naturaleza. De 244 actinomicetos aislados y probados, 106 mostraron un efecto antagonista a *Bacillus subtilis* y 164 contra *Staphylococcus aureus*. Además, Alexopoulos (1941), realizó experimentos para determinar que tan general era la producción de sustancias tóxicas contra hongos por parte de actinomicetes, de un total de 80 actinomicetos probados, 45 inhibieron el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporoides*.

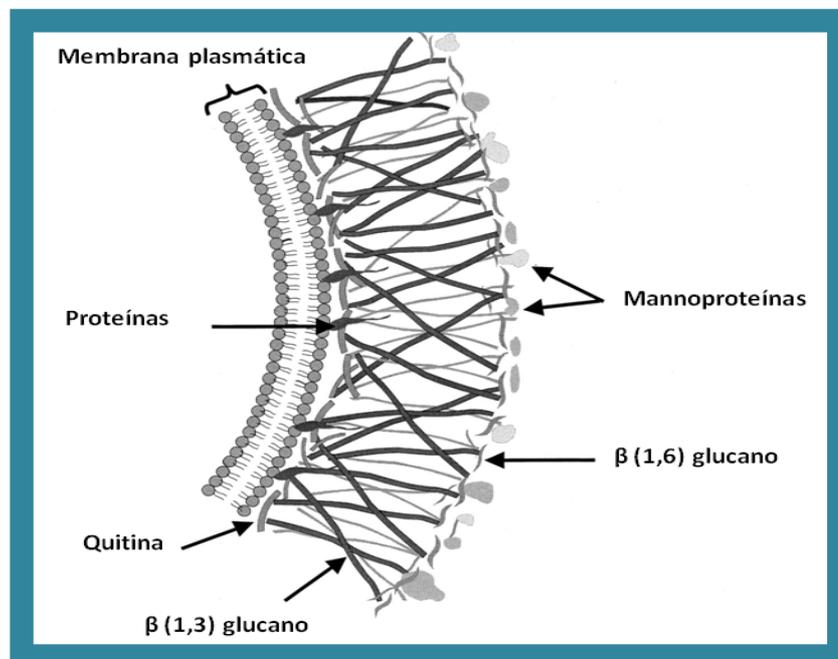


Figura 1. Composición general de la pared celular de un hongo que muestra la presencia de proteínas y mananoproteínas, glucanos y quitina. Modificado de <http://aem.asm.org/cgi>

Wilkins y Harris (1944), citan una serie de estudios en producción de antibióticos desarrollados por ellos mismos (1942, 1943). En la primera investigación evaluaron 100 hongos, donde encontraron que el 40 % de especies de *Aspergillus* y 25 % de *Penicillium* mostraron resultados positivos contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* y *Pseudomonas pyocyanea* (*P. aeruginosa*); en la

segunda evaluación, estudiaron otros 100 hongos, en esta también encontraron que las aislamientos de *Penicillium* y *Aspergillus* fueron los más promisorios, de 33 *Penicillium* evaluados, 12 mostraron actividad contra *E. coli*, 31 contra *Staphylococcus aureus* y 7 contra *P. pyocyanea*, mientras de que el 50 % de las cepas de *Aspergillus* mostraron resultados promisorios para los patógenos evaluados. Además, del total de basidiomicetes y ascomicetes evaluados, el 30 % mostraron actividad antibiótica.

Diversos estudios han demostrado que algunos aislamientos de los hongos *Trichoderma* y *Clonostachys spp.* producen una variedad de metabolitos secundarios volátiles y no volátiles. Algunos de estos inhiben a otros microorganismos con los cuales nunca entran en contacto, estas sustancias inhibitorias son consideradas antibióticos volátiles. De los metabolitos antifúngicos mejor conocidos producidos por *Clonostachys spp.* son las gliotoxinas, viridina y la glioviridina (Howel y Stipanovis 1983) mientras que la PPT para *Trichoderma* (Claydon *et al.* 1987) citados por Hjeljord y Tronsmo (1998).

Chérif y Benhamou (1998) comentan que aislamientos de *Trichoderma spp.* son eficientes productores de polisacaridasas, proteasas y lipasas, compuestos que pueden ser usados en la degradación de la pared de las células del patógeno. Stefanova *et al.* (1999) estudiaron en este mismo hongo, su actividad metabólica y el efecto de estos metabolitos en cuatro fitopatógenos de suelo (*Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora capsici*, *Rhizoctonia solani* y *Pythium spp.*) y encontraron que los aislamientos de *Trichoderma spp.* producen metabolitos no volátiles con actividad antifúngica, los cuales redujeron el crecimiento de *Phytophthora nicotianae* y *Rhizoctonia solani*.

En estudios realizados con 22 aislamientos de *Trichoderma spp.*, se probó la producción de enzimas hidrolíticas (glucanasas y quitinasas) y el efecto de estas sobre *M. fijiensis* en condiciones *in vitro* y se encontró que ambos tipos de enzimas afectan el crecimiento del micelio del patógeno. El efecto inhibitorio fue de un 31,53 % con glucanasas y en un 24,67 % con quitinasas a los 49 días (Ochoa 2002).

Michel *et al.* (2005) señalan que algunos aislamientos del hongo *Trichoderma spp.* por medio de la producción de glucanasas y quitinasas, logra inhibir el crecimiento del micelio de *Fusarium subglutinans* y *F. oxysporum* en un 34 y 27 %, respectivamente. Los mismos metabolitos secundarios lograron reducir el potencial reproductivo en la producción de conidios de los patógenos en un 95 y 86 %, respectivamente.

Quiroz *et al.* (2008), mediante enfrentamientos *in vitro*, evaluaron la actividad antagonista de 22 cepas de hongos (*Trichoderma* y *Aspergillus* aislados de plantaciones de ajo) hacia *Penicillium sp.* y *Fusarium spp.*, que afectan el cultivo del mismo. Del total de aislamientos evaluados, encontraron que 8 producían algún tipo de inhibición en el crecimiento de los patógenos. Los autores observaron que uno de los principales mecanismos de acción fue la antibiosis y describieron agrupamientos, deformación y lisis de conidios y de micelio.

3.4. Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet)

La Sigatoka negra se identificó por vez primera en 1963 en la costa sudeste de Viti Levu (Islas Fiji) y la aparición de esta enfermedad en América Latina, se describió por primera vez en Honduras en 1972 (Stover y Dickson 1976, Stover 1980, Stover y Simmonds 1987, Marín *et al.* 2003), se cree que desde allí se diseminó por el resto de la región centroamericana (Stover 1980, Mourichon *et al.* 1997, Aguirre *et al.* 2003, Marín *et al.* 2003). El agente causal de la enfermedad es el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*, Morelet. A esta enfermedad se le considera como el principal problema fitosanitario de las musáceas, ya que causa el mayor impacto económico en la producción mundial de banano (Meredith y Lawrence 1969, Jones 2000, Marín *et al.* 2003).

La enfermedad ocasiona la pérdida prematura de gran parte de superficie foliar (incluso de toda la hoja), lo que conlleva a una disminución en la tasa fotosintética, que da como resultado retardos en la madurez fisiológica normal, racimos más pequeños de lo normal, dedos pequeños y angulares, y una maduración prematura antes de la cosecha. Además, la Sigatoka negra retrasa el crecimiento vegetativo de la planta y sus hijos y el promedio de emergencia de hojas nuevas

(Stover y Simmonds 1987, UPED 1992, Mourichon *et al.* 1997, Marín *et al.* 2003, Guzmán 2006, Romero y Guzmán 2006, Chillet *et al.* 2008).

Mycosphaerella fijiensis se disemina por el aire y se propaga principalmente en las regiones de las tierras bajas, donde se cultiva el plátano y el banano (Kitume 2002). La incidencia y severidad de la enfermedad se ven condicionados por las interacciones que existan entre patógeno y los factores climáticos como humedad relativa, temperatura y precipitación y la susceptibilidad del cultivar (Stover 1980, Marín *et al.* 2003).

3.4.1. Etiología

En las plantaciones se pueden encontrar tanto la fase imperfecta (asexual) como la fase perfecta (sexual) del hongo (Mourichon *et al.* 1997, Ortiz *et al.* 2001, Marín *et al.* 2003). La fase imperfecta (*Pseudocercospora fijiensis*) aparece en lesiones jóvenes (estadios 2, 3 y 4 de la enfermedad) y se disemina por medio de estructuras de reproducción llamadas conidios (Figura 2). Según Guzmán (2003) los conidios se producen más abundantemente durante periodos de alta humedad, sobre todo si una película de agua libre está presente sobre la hoja, además, este indica que los conidios se dispersan por medio del salpique de la lluvia y el escurrimiento del agua por la superficie de la hoja, por lo que este proceso se asocia principalmente con infecciones a corta distancia, entre las hojas de la misma planta, de la planta madre a los hijos y entre plantas cercanas.

La fase perfecta *M. fijiensis* aparece en el centro de las lesiones, a medida que se van secando las estructuras de reproducción llamadas pseudotecios, los cuales contienen ascas con ascosporas. Las ascosporas son liberadas y trasladadas por el viento a cientos de kilómetros de distancia, por lo que son la principal forma de dispersión a largas distancias (Stover 1980, Ortiz *et al.* 2001, Guzmán 2003).

Los conidios y las ascosporas infectan la hoja vía estoma y estos son más abundantes en la superficie abaxial de las mismas (Lorenzo *et al.* 1978, Flores *et al.* 1985, Guzmán 2003), por cada estoma que haya en el haz se encuentran tres a seis en el envés. Guzmán (2003) menciona que, para germinar e infectar el

tejido tanto conidios como ascosporas, requieren una alta humedad relativa (92-100 %) para conidios y (98-100 %) para ascosporas, y de temperaturas que oscilen en un rango de 26,5-28 °C .

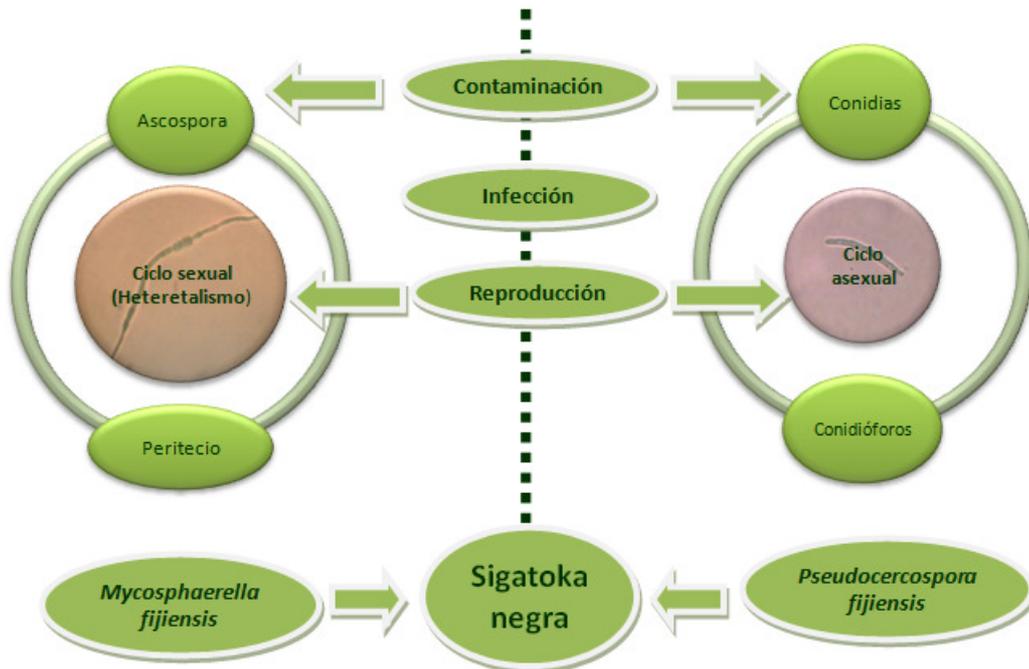


Figura 2. Ciclo de infección de Sigatoka negra. Modificado de Mourichon *et al.* (1997).

Romero (1996) menciona que varios factores epidemiológicos hacen difícil el control de la enfermedad y dentro de estos menciona, los numerosos ciclos de reproducción sexual durante el año, la alta producción de inóculo y la alta cantidad de infecciones en la parte abaxial de las hojas nuevas, durante su apertura. El problema se agrava debido a su posición y ángulo de inserción, por lo que esta hoja recibe menor cantidad de fungicida.

3.4.2. Desarrollo de los síntomas de la Sigatoka negra

Después de la germinación de las ascósporas y la penetración de las hifas por los estomas de las hojas, se han reconocido seis estados de los síntomas de la

enfermedad: tres de raya, una de transición y dos de mancha (Meredith y Lawrence 1969, Fouré 1985, Marín *et al.* 2003).

En el estado 1, aparecen pequeñas puntuaciones de color amarillo pálido de 0,25 mm de diámetro que son visibles por el envés de la hoja; en el estado 2 los puntos se alargan como rayas de 1 mm de ancho por 2 mm de largo, generalmente de color castaño y son visibles por el haz. El estado 3 se caracteriza por que las rayas se alargan hasta alcanzar 20-25 mm de longitud y 2 mm de ancho, además, toman una coloración marrón oscuro y son visibles sobre el envés como rayas amarillas. En el estado 4, sobre el envés, las rayas se ensanchan, se tornan de un color marrón oscuro y son rodeadas por una zona amarilla pálida, este puede considerarse el primer estado de mancha. En el estado 5 los centros de color negro de las manchas empiezan a colapsarse, mientras rodean el tejido con un halo amarillo y finalmente el estado 6 se caracteriza por que los centros de las manchas secas se tornan color gris claro y son rodeadas por un anillo negro bien definido, el cual también es rodeado por un halo amarillo (Fouré 1985, Manzo 2001, Marín *et al.* 2003).

3.4.3. Combate químico, cultural y genético de la Sigatoka negra

Romero (1997) comenta que la principal estrategia de combate de la Sigatoka negra en plantaciones comerciales de banano es mediante el uso de fungicidas. Sin embargo, estos han perdido buena parte de su efectividad, por el desarrollo de resistencia en el patógeno (Stover 1980, Sánchez *et al.* 2002, Romero 2006, Guzmán 2006).

La Sigatoka negra ha causado gran incertidumbre sobre el futuro de la producción de bananos y plátanos. La compleja naturaleza de este patógeno le brinda un alto potencial de adaptación a nuevas condiciones climáticas, fungicidas y genotipos de huésped (Manzo 2001, Guzmán 2000). Esto ha quedado demostrado ante la acelerada pérdida de la eficiencia de algunos productos químicos usados para su combate, como benzimidazoles, triazoles y estrobirulinas (Guzmán *et al.* 2000).

Según Marín y Romero (1998), los fungicidas utilizados para el combate de la Sigatoka negra se clasifican en tres categorías, con base en su modo de acción: fungicidas de contacto o protectantes, de acción sistémica local y fungicidas sistémicos. En cuanto a los fungicidas protectantes (mancozeb y clorotalonil), estos son utilizados en rotación y mezcla con fungicidas sistémicos (benzimidazoles, triazoles, aminos y Qol's), y por lo general son aplicados en emulsiones con aceite mineral (Romero 2006).

Murillo y Guzmán (2007) indican que para el año 2006 en Costa Rica la forma en la cual se compensó la pérdida de sensibilidad del hongo a los fungicidas sistémicos, mediante una estrategia de manejo químico basada en la utilización de triazoles en mezcla con tridemorph y en aplicaciones de mancozeb, en intervalos cortos y a dosis altas de hasta 1.500 g i.a/ha por aplicación.

El combate cultural es parte del manejo integrado de la enfermedad y un importante complemento, del combate químico. El objetivo del combate cultural es reducir la presión de inóculo en las plantaciones, evitar condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad e incrementar el vigor de las plantas (Orozco-Santos *et al.* 2006, Arauz 1998).

En el caso de la Sigatoka negra, el combate químico debe ser apoyado con prácticas de cultivo que permitan reducir las aplicaciones de fungicidas, los costos de producción y la contaminación (Marín y Romero 1992, Marín *et al.* 2003, Orozco-Santos *et al.* 2006).

Guzmán y Villalta (2006) señalan que el combate cultural de Sigatoka negra, consiste principalmente en la eliminación selectiva del tejido foliar enfermo por medio de la deshoja sanitaria y sus variantes: despunte, cirugía y deslaminado. Por otro lado, Orozco-Santos *et al.* (2006) comentan que además de la reducción de fuentes de inóculo existen prácticas de manejo que consisten en reducir las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, estas prácticas incluyen: manejo de la densidad de siembra, sistemas de drenaje, control de malezas, fertilización química, fertilización biológica (micorrizas y bacterias del género *Azospirillum*) y combate de nematodos.

Para el caso de la Sigatoka negra, otro tipo de combate de la enfermedad es la búsqueda de variedades resistentes, principalmente para los pequeños productores a los que se les dificulta la implementación del combate químico, por el alto costo de este (Mourichon *et al.* 1997, Marín *et al.* 2003). Según Mourichon *et al.* (1997) para introducir la resistencia a la enfermedad, los programas clásicos de mejoramiento se basan en la utilización de especies silvestres de *Musa* como *M. acuminata* ssp. *burmannica*, ssp. *malaccensis* y ssp. *siamea* y en cultivares diploides como Paka (AA) y Pisang lilin (AA). Además, estos comentan que aún no se ha conseguido crear un banano postre de tipo Cavendish resistente a Sigatoka negra, aunque si se han identificado tres tetraploides de la Fundación Hondureña de Investigación Agrícola, FHIA: 01, 02 y 03, los dos primeros plátanos postre y el tercero plátano de cocción.

3.4.4. Combate biológico de Sigatoka negra

De manera general, el combate biológico de enfermedades foliares, ha sido poco estudiado. No obstante, debido a los problemas ecológicos y toxicológicos que se derivan del uso de compuestos químicos, es indispensable investigar a fondo otras

alternativas como el combate biológico y con esto lograr un manejo de la enfermedad más amigable con el ambiente y con menor riesgo para la salud.

La germinación de las esporas de *M. fijiensis* ocurre en 2-3 horas y el tubo germinativo de este tarda de 46-72 horas en penetrar el estoma (Stover 1980). En este lapso de tiempo el hongo está expuesto y es más susceptible a cualquier mecanismo de combate biológico, donde se pueden destacar la competencia por espacio o nutrientes, parasitismo y la antibiosis (Jiménez y Ramírez 1987).

Jiménez et al. (1985) aislaron bacterias epífitas de hojas de banano y probaron el antagonismo de estas sobre *M. fijiensis* in vitro e in vivo. De 225 aislamientos de bacterias, 12 presentaron un efecto antagonista hacia el patógeno, 3 de estas correspondieron al género *Pseudomonas* sp. En las pruebas en invernadero este antagonista detuvo el desarrollo del hongo, y fue superior en control al testigo comercial (clorotalonil), el cual presentó un 25 % de infección.

Mercado y Mora (1990) aislaron fitoalexinas en hojas de banano atacado por la enfermedad. En las hojas enfermas encontraron una sustancia que estaba ausente en las hojas sanas, después de varias pruebas lograron corroborar que se trataba de una fitoalexina con propiedades antibióticas que se sitúa en el grupo de metabolitos secundarios y con potencial para el combate de *M. fijiensis*.

Esquivel (1992) investigó sobre las características morfológicas y taxonómicas de algunos hongos hiperparásitos de *M. fijiensis* y logró identificar 72 hongos a nivel de género y especie, la mayoría saprófitos. De estos solo cinco fueron hiperparásitos de *M. fijiensis* y el más común fue *Hansfordia pulvinata*, que se asocia a la fase imperfecta del patógeno.

González (1995) realizó una búsqueda de microorganismos quitinolíticos antagónicos a *M. fijiensis* y evaluó su eficiencia bajo condiciones de campo. Logró aislar 120 microorganismos quitinolíticos de plantas de Gran Enano, de los 4 aislamientos más promisorios en laboratorio dos fueron identificados como *Serratia marcescens*, un *Bacillus* sp. y una *Serratia entomophyla*. En condiciones de invernadero los microorganismos fueron tan eficaces como los fungicidas. En

campo, se observó un control de 40,1 % con los microorganismos y de un 60 % con de los fungicidas con respecto al testigo.

Se ha evaluado el efecto de sustratos foliares sobre bacterias antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis* en banano (Ruiz 1995), y se ha observado en condiciones de laboratorio que sustratos como la leche y la melaza presentaron un efecto positivo sobre el crecimiento de los antagonistas a *M. fijiensis*. Lo mismo se observó en las pruebas en casa malla, encontrando que la mejor combinación para el combate de la enfermedad fue melaza + *Serratia marcescens*. Sin embargo, en las evaluaciones en campo no se detectaron diferencias estadísticas entre los tratamientos con sustratos y el testigo sin protección.

Gutiérrez (1996) estudió la capacidad de cuatro bacterias (*Serratia marcescens*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens* y *P. cepacia*), un hongo (*Trichoderma harzianum*) y un inductor químico (KH_2PO_4 y K_2HPO_4), para inducir resistencia a *M. fijiensis* y promover el crecimiento de plantas de banano. Para esto estableció dos experimentos; en el primero aplicó suspensiones de las bacterias y el hongo a la rizosfera de la planta y esto lo combinó con aplicaciones aéreas con las sales de fosfato. El segundo, aplicó los mismos microorganismos en tres sustratos (bagazo, cachaza y broza). El autor informó que ni las suspensiones de las bacterias y el hongo de los microorganismos, ni las sales de fosfatos, lograron inducir el crecimiento de la planta ni la resistencia. En cuanto a los sustratos, estos lograron promover el crecimiento solamente en la variable área foliar e indujeron algún grado de resistencia en la planta, sin embargo, el porcentaje más bajo de infección correspondió al tratamiento con el fungicida Tilt (propiconazole) (testigo comercial).

Vega (1996) evaluó en campo el efecto de *Serratia marcescens* sobre Sigatoka negra y utilizó como indicadores las variables: hojas por planta (H/P), hoja más joven enferma (HMJE), hojas infectadas (HI) y promedio ponderado de infección (PPI). El número de H/P en el tratamiento (8,0) fue mayor que en el testigo (5,1), la posición de la HMJE en el testigo estuvo en la hoja 3,7 mientras que en el

tratamiento, estuvo en la hoja 7,4 o sea en las hojas más adultas. El número de HI en el tratamiento fue de 0,6 y en el testigo este valor ascendió a 1,4. El PPI en la parcela testigo fue de 1,8 mientras que en el tratamiento dicho valor fue menor (0,49). Los resultados obtenidos mostraron una efectividad del 50 por ciento de la *Serratia marcescens* en el control de la Sigatoka negra.

Miranda (1996) estudio la acción antagonista de algunos microorganismos sobre *M. fijiensis*, ya sea colocadas en el interior de la planta mediante un método de inoculación endofítica, o en el exterior de la misma a través del uso de algunos coadyuvantes. No se encontró efecto de los coadyuvantes sobre la multiplicación de los microorganismos antagonistas. Además, *Serratia marcescens* mostró niveles más bajos de la enfermedad, pero no hubo diferencias significativas con respecto al testigo para la reducción del número de pizcas producidas por el patógeno.

Eguez (2000) evaluó el efecto de los microorganismos eficientes (E.M) para el combate biológico de la Sigatoka negra en Bolivia. El autor encontró que para los parámetros evaluados, grado de infección en hoja y hoja más joven enferma, el efecto de los microorganismos fue similar al combate químico y el costo con el E.M fue 31 % más bajo que con el químico.

Patiño (2001) investigó el efecto de una fuente de energía (melaza), tres inductores de resistencia (acibenzolar-s-metil, Asm), fracción cruda de *M. fijiensis*, suspensión rizobacteria + *Pseudomonas* sp. y un sustrato foliar (quitina + glucano + Ca + Nufilm®) sobre el desarrollo de la Sigatoka negra en banano. Se encontró que el Asm produjo una alta inducción de resistencia, mientras que la rizobacteria y la fracción cruda de *M. fijiensis* solo lo lograron en presencia de la fuente de energía, este último solo redujo los niveles de enfermedad, cuando se combinó con lombricompost. Por otro lado, el lombricompost disminuyó la severidad de Sigatoka negra en invernadero, además, que incrementó la efectividad de los inductores de resistencia y favoreció el crecimiento (altura) de las plantas en invernadero y campo. La suspensión rizobacteria + *Pseudomonas* sp. no mostró inducción de resistencia, pero si redujo la severidad de la enfermedad cuando se

dispuso de la fuente de energía. El sustrato foliar ofreció un buen control de la enfermedad bajo condiciones de invernadero.

Arango (2002) también evaluó el efecto de la aplicación de diferentes sustratos al filoplano como alternativa para el combate de *Mycosphaerella fijiensis* y observó que con la utilización de los sustratos melaza + quitina + leche y quitina + glucano + nitrato de calcio, cuando son aplicados de manera alternada con los fungicidas tradicionales, permitieron reducir hasta en un 40 % la aplicación de estos últimos. La autora sugirió que las poblaciones de microorganismos que se establecieron con la aplicación de estos sustratos, debido al cambio en las condiciones (físicas y nutricionales) del filoplano de la plantación, lograron provocar algún efecto en el control de la enfermedad, convirtiéndose en una alternativa de gran potencial.

Ramos (2002) por su parte, evaluó el uso de extractos de compost para el combate de *Mycosphaerella fijiensis* y demostró que el extracto de compost fue más efectivo que el tratamiento control (clorotalonil) en la inhibición de la germinación de esporas. Además, observó una tendencia a la reducción del tubo germinativo de las esporas y en forma visual (sin diferencias significativas) una tendencia a mantener una mayor área foliar libre de Sigatoka negra. Riveros y Arcieniegas (2003) evaluaron productos naturales de origen vegetal para el combate de *M. fijiensis* en condiciones *in vitro* y encontraron 8 diferentes extractos que mostraron una actividad antifúngica promisorio, con un alto poder fungistático y fungicida, ya que inhibieron el crecimiento del tubo germinativo e impidieron el desarrollo micelial del hongo.

El efecto antagónico *in vitro* y en invernadero de cepas de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis*, fue evaluado por Arzate et al. (2006), quienes encontraron, en pruebas de cultivos “apareados”, que el fitopatógeno detuvo su crecimiento al contacto con las cepas de los antagonistas. *Trichoderma* spp. creció sobre el patógeno cubriendo el 100 % del medio de cultivo. En condiciones de invernadero algunas cepas de *Trichoderma* fueron superiores y ejercieron un mejor control de la enfermedad.

En evaluaciones con extractos botánicos y hongos endofíticos para el combate de la Sigatoka negra en banano, Osorio (2006) señaló como promisorio el extracto de *Senna reticulata* como candidato en un programa de manejo integrado de la enfermedad por su acción protectante, mientras que los hongos endofíticos necesitan una mayor investigación para optimizar su eficiencia. Villalta y Guzmán (2006) evaluaron el potencial de una formulación comercial de la bacteria *Bacillus subtilis* (Serenade®) para el combate de la Sigatoka negra. El biofungicida por sí solo no ejerció control de la enfermedad, pero sí mostró algún efecto en mezcla con mancozeb y aceite mineral. Los autores sugieren realizar más estudios para optimizar el efecto del producto.

Riveros et al. (2006) estudiaron el efecto de lixiviados de compost y vermicompost en campo, sobre el desarrollo de Sigatoka negra en hojas de plátano. Encontraron que los lixiviados de compost provenientes de broza de café y de estiércol vacuno, mostraron tasas más bajas de crecimiento de la enfermedad que los testigos agua más adherente y clorotalonil, según los autores los lixiviados funcionaron principalmente como protectantes.

Zualuaga et al. (2007), analizaron en condiciones de campo, en la zona bananera de Urabá-Colombia, el efecto de inductores de resistencia y bacterias quitinolíticas sobre el desarrollo de la Sigatoka negra en plantas de banano del cultivar Gran Enano. Como inductores de resistencia se utilizaron acibenzolar-s-metil (ASM) y ácido salicílico (AS), cada uno en rotación y en mezcla con fungicidas utilizados en el combate convencional de la enfermedad. Se evaluó también la mezcla de estos inductores con bacterias quitinolíticas aisladas de la filósfera de banano; así como el efecto del fungicida biológico Biofun® en rotación con fungicidas y en mezcla con ASM. La aplicación de ASM en rotación y en mezcla con fungicidas convencionales presentó un control de la enfermedad hasta un 50 % mayor al obtenido con el control convencional. Los tratamientos que incluyeron AS en rotación y mezcla con fungicidas convencionales, al igual que el producto Biofun® en rotación y en mezcla con ASM, mostraron un control de la enfermedad estadísticamente igual al obtenido con el control convencional, lo cual reveló una

reducción de 46 – 100 % de la cantidad de fungicidas convencionales usados en el combate de la enfermedad.

Soto (2008) realizó una evaluación de bioles (biofermentos) inoculados con microorganismos naturalmente antagónicos, para el manejo biológico de *M. fijiensis* y observó un efecto positivo de estos sobre el avance del patógeno, además los tratamientos con biol + aceite mineral tuvieron un mejor control que el testigo comercial. De acuerdo con la autora, la introducción de microorganismos tuvo un efecto positivo dentro del manejo del avance de la enfermedad en las plantas.

En una investigación realizada por Villalta y Guzmán (2008) con microorganismos eficientes (ME) y una cepa de *Trichoderma* sp. para el combate biológico de Sigatoka negra en condiciones de campo, encontraron que la mezcla y alternancia de *Trichoderma* sp. con los ME no mejoró el control de la enfermedad. Además, observaron que la alternancia de mancozeb con los ME resultó efectiva y se aproximó al control logrado con aplicaciones consecutivas de estos, los autores sugieren realizar más estudios con aislamientos diferentes y combinadas con otras sustancias que aumenten la actividad de los microorganismos.

Villalta y Guzmán (2008) evaluaron la eficacia biológico en campo de tres bacterias (*Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia* y *Bacillus subtilis*) y tres fermentos de microorganismos benéficos (EM Plus®, TerraBiosa® y Microorganismos Descomponedores®) para el combate biológico de la Sigatoka negra en banano (*Musa* AAA). Los tratamientos con microorganismos (M) presentaron valores más bajos de severidad que el testigo absoluto (TA), lo que evidencia un efecto de control la enfermedad.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. Ubicación del experimento

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología y el Centro de Control Biológico y Biología Molecular de la Dirección de investigaciones de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA S.A.), ubicados en La Rita, cantón de Pococí, provincia de Limón. El periodo experimental se ubicó entre los meses de julio de 2008 y octubre de 2009.

4.2. I Etapa. Desarrollo de una metodología para el aislamiento y selección preliminar de hongos con potencial como agentes de combate biológico (ACB)

En esta etapa se desarrollaron las metodologías necesarias para llegar a obtener los potenciales agentes de combate biológico, ya que serían el material de partida necesario para las etapas posteriores.

4.2.1. Obtención de un medio semiselectivo para aislar hongos con bajos requerimientos nutricionales y actividad quitinolítica

El objetivo fue obtener un medio pobre en nutrientes, pero rico en quitina, que permitiera la selección de hongos con bajos requerimientos nutricionales e idealmente con capacidad para degradar la quitina (producción de metabolitos secundarios, enzimas quitinolíticas).

A. Medios con quitina molida

En primera instancia se realizó una prueba con quitina grado práctico (Sigma[®]), la cual fue molida (QM) para obtener partículas lo más pequeñas posibles. Se preparó medio Agar – agua al cual se le agregaron 10, 20, 30, 50 y 100 g/L de quitina molida. Los medios se vertieron en platos de Petri de vidrio y posteriormente se inoculó un disco de 20 mm con micelio de un aislamiento de *Trichoderma* sp. y se observó el crecimiento de este hongo en los medios con las diferentes concentraciones de QM.

B. Medios con quitina coloidal

Se realizaron pruebas con medio Agar-agua (Oxoid[®]) y diferentes diluciones del medio Papa dextrosa agar (Oxoid[®]) más quitina coloidal y se observó la cantidad de hongos que crecieron, así como la velocidad de crecimiento de los mismos. Los medios evaluados fueron: Agar-agua y el medio PDA al 100, 25, 12,5 y 6,25 %. En todos los casos se adicionó quitina coloidal al 1 % y el antibiótico Agri-Mycin[®] 16,5 (estreptomina + terramicina) al 1 %. La quitina coloidal se obtuvo de someter la quitina grado práctico a la metodología propuesta por Salazar y Okumoto (Anexo 1), en González (1995).

Para evaluar los medios se seleccionaron 20 discos de hoja de 10 mm de diámetro con lesiones de Sigatoka negra y se colocaron en un tubo de ensayo de 25 ml, con 10 ml de agua desionizada estéril y Tween[®] 20 (Merck-Schuchardt), el cual se agitó por espacio de 1 minuto con la ayuda de un vortex (Thermolyne[®], Maxi Mix II). Los discos de hoja se escogieron de aquellas lesiones que mostraban crecimiento de algún tipo de hongo sobre la superficie de las mismas.

4.3. II Etapa. Colecta de muestras en fincas y aislamiento de los potenciales ACB

4.3.1. Colecta de las muestras

Se muestrearon 8 plantaciones (Cuadro 1) de banano de la Vertiente del Caribe y de la Zona Norte de Costa Rica. Dos correspondieron a plantaciones comerciales de banano con alta presión de Sigatoka negra (San Pablo y La Victoria), dos fincas comerciales con una baja presión de la enfermedad (Valle de la Estrella y Hacienda Rio Palacios), en donde se aplican entre 45-55 ciclos de fungicidas por año para el combate de la enfermedad; dos plantaciones testigo (La Rita y 28 Millas; ambas pertenecen a CORBANA) en las que se realizan prácticas de manejo del cultivo pero no se aplican fungicidas, una plantación orgánica (Talamanca) bajo sombra de árboles nativos y finalmente, huertos mixtos (San Carlos) donde las plantas de banano se encontraban combinadas con otras plantas y árboles de valor agrícola, medicinal u ornamental.

En cada finca se tomaron muestras en 5 puntos. En el caso de las fincas comerciales (San Pablo, La Victoria, Hacienda Río Palacios y Valle de la Estrella) estos puntos de muestreo se distribuyeron en diferentes secciones de la finca y distantes entre sí unos 200 m, el área de cada punto de muestreo fue de aproximadamente ½ ha. En las fincas testigo sin tratamiento de fungicidas (La Rita y 28 Millas), debido a su menor tamaño (0,5-2 ha), se distribuyeron los puntos de muestreo tratando de abarcar toda el área. La muestra de plantación orgánica se tomó de dos fincas; una localizada en Shiroles (Sr. Víctor Chale propietario) y la otra en Suretka (Sra. Maritza Hurtado propietaria). En la primera se hicieron dos puntos de muestreo y en la segunda tres y finalmente, la muestra de los huertos mixtos, que se tomó de 5 diferentes puntos (huertos) localizados entre San Clara, Jabillos y La Vega de San Carlos.

En todos los casos se colectaron partes de hojas de banano depositadas en el suelo y con lesiones de Sigatoka negra, sobre las cuales se distinguiera crecimiento de (micelio y estructuras) algún tipo de hongo diferente de *M.fijensis*. Se evitó coleccionar lesiones que presentaran un estado avanzado de descomposición (Figura 3). La muestra colectada en cada punto fue de aproximadamente 0,5 kg y se trasladaron al laboratorio en bolsas de plástico. Una vez en el laboratorio se almacenaron en un refrigerador Polaris a 8°C, por un periodo que no excedió las 24 horas mientras se procesaban las mismas.



Figura 3. Tipo de material colectado en las diferentes fincas. Tejido foliar, depositado en el suelo y con lesiones de Sigatoka negra.

Cuadro 1. Características de las fincas seleccionadas para la toma de muestras.

Finca	Ubicación	Fecha de muestreo (2008)	Características generales
San Pablo	Siquirres	9 setiembre	Finca comercial de más de 30 años de edad (285 ha).
La Victoria	Sarapiquí	17 setiembre	Finca comercial de más de 15 años de edad (340 ha).
Valle de la Estrella	Talamanca	21 octubre	Finca comercial de más de 50 años de edad (2.000 ha).
Hacienda Río Palacios	Matina	1 octubre	Finca comercial de más de 15 años de edad.
La Rita	Pococí	11 setiembre	Finca experimental sin tratamiento de fungicidas por 10 años (1/2 ha).
28 Millas	Matina	25 setiembre	Finca experimental sin tratamiento de fungicidas por 10 años (3 ha).
Orgánicas	Talamanca	15 octubre	Plantaciones bajo sombra de árboles nativos sin aplicaciones de agroquímicos.
Huertos mixtos	San Carlos	8 octubre	Pequeños grupos de plantas de banano ubicados en patios o fincas de pequeños agricultores en combinación con otras plantas de interés agrícola, medicinal u ornamental.

4.3.2. Aislamiento de los potenciales hongos agentes de combate biológico (ACB) de las fincas

El material colectado en las diferentes fincas fue llevado al laboratorio y se le aplicó el procedimiento general, que se describe en la figura 4.

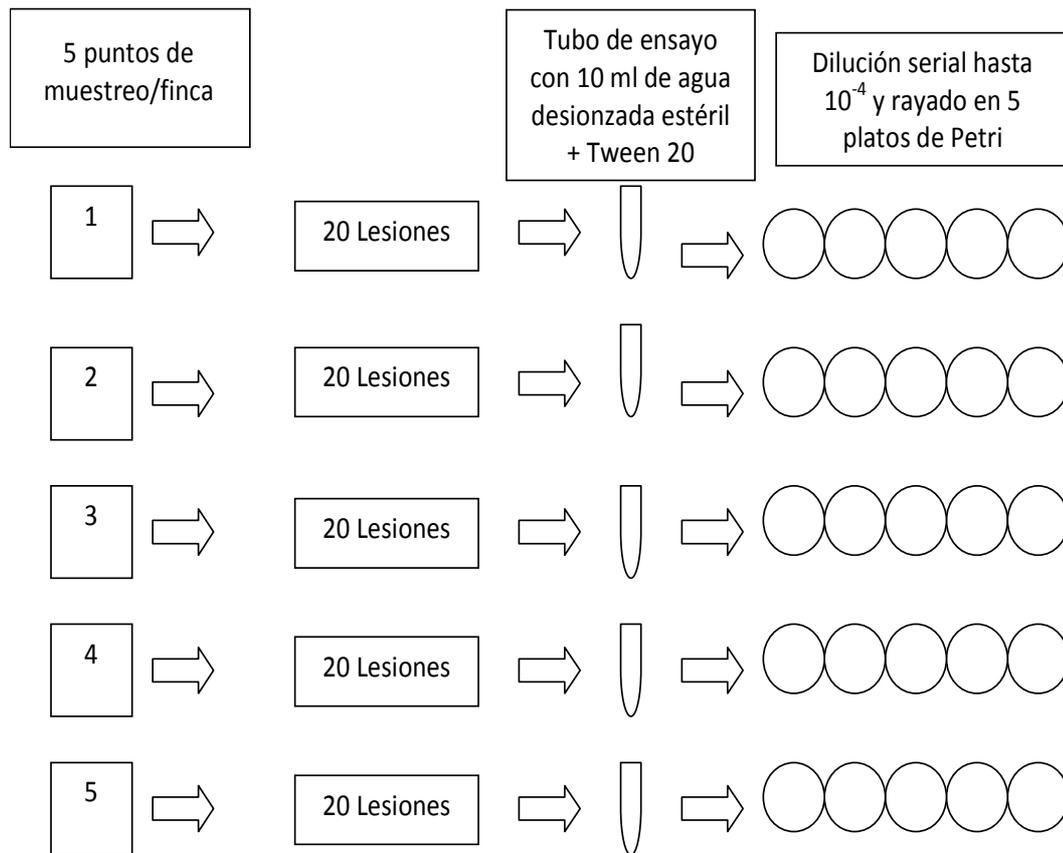


Figura 4. Esquema que representa el procedimiento general empleado para el aislamiento de los agentes de combate biológico (ACB) de las fincas.

De cada muestra se seleccionaron 20 lesiones con evidencia de crecimiento de algún tipo de hongo sobre ellas. Las 20 lesiones se colocaron en un tubo de ensayo de 25 ml que contenían 10 ml de agua desionizada estéril + Tween[®] 20 (0,05 %). El tubo de ensayo se agitó por 2 min, luego se dejó en reposo por 1 hora

y se agitó nuevamente por 1 min con la ayuda de un vortex, la suspensión resultante se diluyó hasta 10^{-4} y de las diluciones 10^{-3} y 10^{-4} se tomó una alícuota de 0,2 ml la cual se rayó sobre el medio rico en quitina previamente seleccionado. Los medios inoculados se incubaron a 26°C, bajo condiciones de oscuridad y se inspeccionaron de día por medio para observar el crecimiento y avance de los aislamientos. A los siete días de incubación se contabilizaron las unidades formadoras de colonia (UFC) y se realizó la purificación de los mismos.

La selección se realizó tomando aquellos hongos que lograran degradar la quitina (halos de hidrólisis) o aquellos que mostrarán un mayor crecimiento.

4.4. III Etapa. Purificación y conservación de los aislamientos de los potenciales ACB

4.4.1. Purificación inicial de los aislamientos

Los hongos candidatos fueron llevados a una serie de etapas de purificación sucesiva para asegurarse que estuviesen libres de otros hongos y de bacterias contaminantes. Esto se realizó en una cámara de flujo laminar (EACI, Envirco) y consistió en inocular una mínima porción de micelio del hongo de interés en medio PDA, el cual contenía 1 % de Agri-Mycin 16,5 para suprimir el crecimiento de bacterias.

4.4.2. Obtención de cultivos de porciones mínimas de micelio de los aislamientos

Una vez purificados los cultivos y de cerciorarse que estos se encontraban libres de otros hongos y de bacterias contaminantes, se procedió a una segunda etapa de purificación, que consistió en la obtención de cultivos monospóricos o de porciones mínimas de micelio. Con este tipo de cultivos se daría inicio a la etapa de conservación segura a mediano plazo, en aceite mineral y por liofilización, así como la producción de metabolitos secundarios para las pruebas de antagonismo *in vitro*.

Para la obtención de los cultivos de porciones mínimas de micelio, se desarrolló una metodología basada en diluciones seriales. Para ello, de los cultivos que se purificaron en una primera etapa, se tomaron dos discos de 10 mm de diámetro de medio con micelio de los aislamientos, se agregaron a un tubo de ensayo de 25 ml que contenía 10 ml de agua destilada estéril y se agitó en un vortex (Thermolyne® Maxi Mix II) durante dos minutos, para obtener así una suspensión madre (SM) de conidios y partes de micelio. A partir de la SM, se tomaron alícuotas de 100 µl y se realizaron diluciones sucesivas 10^{-30} en agua desionizada estéril. De esta última dilución se tomaron 100 µl y se sembraron en medio PDA más Agri-Mycin 16,5. Con este tipo de procedimiento se buscó obtener la menor cantidad de UFC por plato de Petri (entre 1 y 3 UFC) y de esta forma asegurar que los cultivos se derivan de material biológico de alta pureza y uniformidad genética.

4.4.3. Conservación de los aislamientos

La conservación de los aislamientos se consideró una etapa clave dentro del proyecto, ya que por lo general los cultivos de hongos son muy vulnerables y se pueden contaminar o mutar perdiéndose alguna característica importante. Los hongos inclusive pueden morir si no son preservados de la manera adecuada. Para el caso de esta investigación se decidió conservar los aislamientos empleando dos métodos: uno de ellos fue utilizando aceite mineral, que se basa en el principio de reducción de la tasa metabólica y el otro método utilizado fue la liofilización, en donde se induce la dormancia de los conidios o esporas y del micelio del hongo mediante deshidratación.

4.4.3.1. Conservación en aceite mineral

En viales de vidrio de 25 ml se dispensaron 10 ml de PDA y este se dejó reposar con una inclinación aproximada de 30° hasta el endurecimiento del medio. Una vez endurecido, se sembró en la superficie del mismo una suspensión de conidios y partes de micelio obtenida de los cultivos puros. La suspensión se obtuvo al mezclar un disco de 10 mm de diámetro de la colonia con 3 ml de agua desionizada estéril y posterior agitación en un vórtex durante 2-3 minutos. De esta suspensión se inocularon 100 µl en el vial de vidrio y cuando el cultivo alcanzó un

buen desarrollo, aproximadamente 7 días después, se agregó el aceite mineral estéril, hasta cubrir por completo el cultivo. De cada uno de los aislamientos se prepararon dos viales.

4.4.3.2. Conservación por liofilización

Para la conservación de los potenciales ACB por liofilización se siguió la siguiente metodología: primeramente se desarrollaron cultivos puros de cada uno de los aislamientos en medio PDA y cuando estos tenían de 7 a 10 días de edad, se tomaron 10 discos de 10 mm de diámetro de medio cubierto con micelio del hongo y se depositaron en tubos de ensayo estériles. Los tubos se sellaron con membranas de nitrocelulosa de 0,1 μm , para evitar la salida de esporas o el ingreso al tubo de algún contaminante y se colocaron en el liofilizador (LABCONCO, Freezone 2,5 plus, Figura 5) por un periodo de 36 horas, para asegurar la total desecación del material. Cuando estos estuvieron liofilizados, se trasladaron a viales de vidrio estériles (5,8 alto x 1,5 cm de diámetro) con tapa de rosca, los cuales se colocaron en un desecador, para evitar la reabsorción de humedad ambiental, dentro de una cámara de enfriamiento a 10 °C y en la oscuridad.



Figura 5. Equipo de liofilización del laboratorio de Biología Molecular de CORBANA, utilizado para el tratamiento de los aislamientos.

4.5. IV Etapa. Producción de metabolitos secundarios de los potenciales ACB

En esta etapa se desarrolló una metodología con el fin de obtener los metabolitos secundarios (principalmente quitinasas) producidos por los potenciales agentes de combate biológico (ACB).

4.5.1. Siembra y producción de los metabolitos secundarios de los aislamientos

Consistió en inocular por separado los diferentes aislamientos en el medio líquido mineral YEGK (Figura 6), rico en quitina. El medio estuvo compuesto por 2 g de extracto de levadura, 10 g de glucosa, 3 g de nitrato de potasio, 2 g de fosfato monopotásico y 5 ml de quitina coloidal por litro, con un pH ajustado a 6. La quitina coloidal se incluyó al medio para estimular en los aislamientos de los hongos una mayor producción de quitinasas.



Figura 6. Medio YEGK rico en quitina. (A) Homogeneizado por agitación y (B) En reposo, nótase la precipitación de la quitina coloidal. (C) Suspensión madre de un cultivo puro con la que se inoculó el medio.

Para ello se esterilizaron viales de vidrio de 25 ml en los que se depositaron 15 ml de medio líquido mineral rico en quitina. En ellos se sembró una alícuota de 100 μ l de una suspensión de conidios y partes de micelio obtenida de cultivos puros de cada aislamiento. La suspensión se obtuvo al mezclar 3 ml de agua desionizada estéril con dos discos de 10 mm de diámetro de medio PDA cubierto con micelio del aislamiento y su posterior agitación, durante dos minutos, en un vortex.

Los viales inoculados se sellaron y se colocaron en un agitador orbital (New Brunswick modelo R-2) a 70 rpm dentro de una incubadora (27 ± 1 °C) (Figura 7) bajo condiciones de oscuridad. La agitación se mantuvo durante los primeros 4 días de cultivo, para estimular una tasa de crecimiento activo y posteriormente, se mantuvieron en reposo durante 10 días más, para aumentar el crecimiento micelial y esperar la idiofase donde se da la mayor producción de metabolitos secundarios. De cada uno de los aislamientos se prepararon dos viales.



Figura 7. Producción de metabolitos en medio líquido mineral. (A) Agitador orbital utilizado para la incubación dinámica de los cultivos y (B) crecimiento de los potenciales agentes de combate biológico después de 14 días en medio YEGK rico en quitina. El vial del medio no fue inoculado, nótese la presencia de gran cantidad de micelio en los viales de los lados.

4.5.2. Separación de los metabolitos secundarios de los potenciales ACB

Debido a que se contaba con dos viales de cada aislamiento, se utilizaron dos técnicas para obtener los respectivos metabolitos secundarios. La primera de ellas

(basada en temperatura y presión) que consistió en autoclavar los cultivos a 121 °C y 157 kPa durante 4 minutos. La segunda técnica de separación consistió en realizar un filtrado al vacío, con un bioreactor y un vacuómetro se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa de 0,2 µm, dentro de una cámara de flujo laminar para evitar la contaminación de los filtrados. Los respectivos metabolitos se guardaron en la oscuridad y a 10 °C hasta ser utilizados, esto para asegurar que no se vieran afectados por luz ni por temperatura.

4.6. V Etapa. Evaluación in vitro de la actividad biológica de los metabolitos secundarios sobre *M. fijiensis*

Se evaluó el efecto de los metabolitos sobre la germinación de ascoporas de *M. fijiensis*. Cualquier efecto de alteración del crecimiento normal del tubo germinativo de las ascoporas del patógeno, como la no germinación y tubos cortos o distorsionados, evidenciaría la existencia de sustancias con algún efecto inhibitorio.

4.6.1. Descargas de ascoporas de *M. fijiensis*

Se siguió la metodología utilizada por CORBANA para obtener descargas de ascoporas de *M. fijiensis* de lesiones maduras de Sigatoka negra. La misma consiste en seleccionar, con un sacabocados, discos de hoja de 20 mm de diámetro, con lesiones de la enfermedad que posean una alta densidad de pseudotecios del hongo. Se graparon 4 discos a hojas de papel bond, se sumergieron durante 8 minutos en agua desionizada para la hidratación de los pseudotecios, se les eliminó el exceso de agua con una toalla absorbente y luego se colocaron en las tapas de platos de Petri para que las ascoporas descargadas se depositaran sobre el fondo del plato que contenía medio Agar-agua con un 5 % (v/v) del respectivo metabolito, el metabolito se aplicó una vez el medio había solidificado, este se distribuyó de manera homogénea sobre el medio y se dejó que este se absorbiera.

El tiempo de descarga de ascoporas fue de 30 minutos y una vez cumplido este periodo, los platos fueron colocados dentro de una incubadora (Presición

Scientific) a 27 °C, en la oscuridad, por 48 horas. Se debe recalcar que todo el material vegetal utilizado provenía de la parcela testigo de CORBANA S.A., en La Rita, en la cual no se aplican fungicidas.

4.6.2. Variables evaluadas

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a observar al microscopio la germinación de las ascosporas y estas se clasificaron en 4 categorías, Figura 8:

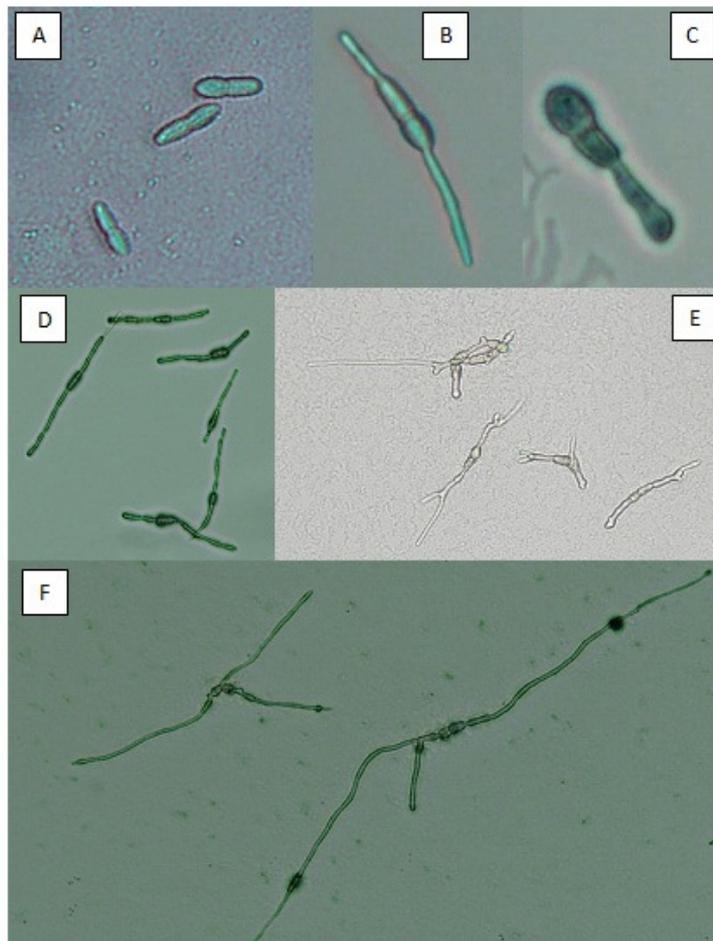


Figura 8. Diferentes tipos de respuestas en germinación de ascosporas por efecto de los metabolitos secundarios. (A) No germinadas, (B) Tubos cortos, (C) Tubos cortos y malformados, (D) Germinación normal, (E) Tubos malformados y (F) Tubos múltiples o ramificados.

Para efectos de la investigación, la actividad inhibitoria de un determinado metabolito se asoció con una alta frecuencia de esporas no germinadas o distorsionadas y cortas. Con base en estas características se estableció un ordenamiento de los aislamientos de mayor a menor efecto inhibitorio sobre el patógeno, para evaluar a nivel de invernadero los aislamientos con metabolitos más activos.

4.6.3. Diseño experimental de la evaluación *in vitro* de la actividad fungicida con los metabolitos secundarios

En total se evaluaron los metabolitos de 163 aislamientos de hongos, los que fueron obtenidos mediante dos formas: filtrado y autoclavado. El experimento se estableció bajo un diseño de bloques completos al azar, con arreglo factorial 163 x 2 (163 metabolitos x dos formas de extracción), para un total de 326 tratamientos con 5 repeticiones (cada repetición fue un plato de Petri). En cada repetición se evaluaron 50 ascosporas, para un total de 250 por tratamiento.

El modelo estadístico para un diseño de Bloques Completos al Azar con un arreglo factorial, es el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + A_j + D_k + AD_{jk} + E_{ijkl}$$

En este modelo:

B_i = efecto del i -ésimo bloque

A_j = efecto del método de extracción

D_k = efecto del metabolito secundario

AD_{jk} = efecto de la interacción del método de extracción y el metabolito secundario

E_{ijkl} = error experimental

4.6.4. Análisis de los datos

Por medio de análisis de varianza se determinó el efecto de las diferentes fuentes de variación (tratamiento, bloque y método de extracción) y de la interacción del metabolito (tratamiento) por método de extracción. Cuando la interacción arrojó diferencias significativas, aplicando la prueba de contrastes ortogonales, se comparó el efecto de los metabolitos según su forma de extracción y por medio de una prueba de Duncan se separaron las medias de los diferentes metabolitos según el método de extracción.

4.7. VI Etapa. Evaluación en condiciones de invernadero de la eficacia biológica sobre la Sigatoka negra de los metabolitos secundarios que mostraron mayor actividad *in vitro*

Los 7 aislamientos que mostraron los mejores resultados en la prueba *in vitro* en cuanto a la inhibición de germinación de las esporas y acortamiento de los tubos germinativos, fueron evaluados en condiciones de invernadero, utilizando plantas jóvenes de banano e inoculaciones controladas del patógeno.

4.7.1. Material vegetal

Plantas del cultivar Grande Naine (*Musa* AAA), obtenidas por cultivo *in vitro* de ápices, fueron transplantadas a macetas plásticas de un volumen de 2 litros, para completar su desarrollo en vivero por un periodo de siete semanas. Posteriormente, las plantas se trasladaron al invernadero para su aclimatación por tres semanas y recibieron un programa de fertilización cada dos semanas con 5 gramos por planta de fórmula 15-3-31(N-P₂O₅-K₂O). Además, se eliminó por medio de deshoja cualquier lesión de Sigatoka negra que arrastraran estas del vivero

4.7.2. Inoculación del patógeno y aplicación de los tratamientos

Cuando las plantas emitieron 5 hojas en el invernadero (aproximadamente 30 cm de altura) se marcaron en las hojas 1 y 2, en su parte central, un cuadrado de 4 x 4 cm (16 cm²) y a cada lado de este un rectángulo de 4 x 2 cm (8 cm²). Tanto en el cuadrado central, como en los rectángulos de los lados (Figura 9), se inoculó el patógeno, pero solo en el cuadrado central se aplicaron los tratamientos y los rectángulos sirvieron como testigos absolutos para valorar algún tipo de efecto sistémico o de inducción de resistencia en la hoja por efecto de aplicación del metabolito.

Para la obtención del inóculo se preparó una suspensión de conidios y partes mínimas de micelio del cultivo monospórico, que se obtuvo al agregar en 4 ml de agua destilada estéril con Tween[®] 20 al 0,05 %, micelio del hongo y agitar por 5 minutos en un vortex, de la suspensión resultante se tomaron 0,5 ml y se sembraron en medio V8, el que se incubó a 26 °C y luz continua por 10 días, para estimular la producción de conidios. Transcurridos los 10 días, a los medios de cultivo se les agregó agua desionizada estéril más Tween[®] 20 al 0,05 % y se realizó un raspado suave con un pincel para desprender los conidios y las partes de micelio. La suspensión se filtró con gasa estéril y se procedió a realizar el conteo de los conidios y las partes mínimas de micelio en un hemacitometro, para luego llevarla a la concentración deseada por medio de diluciones.

Para la inoculación, las plantas fueron extraídas momentáneamente de las cámaras de incubación y se ubicaron en una sala adyacente, esto para evitar la dispersión de inóculo dentro de las cámaras. Las áreas demarcadas se asperjaron con una suspensión de 15.000 conidios y parte de micelio ml^{-1} del patógeno por el envés de la hoja. El inóculo provino de cultivos monospóricos del hongo, obtenidos de plantaciones comerciales.

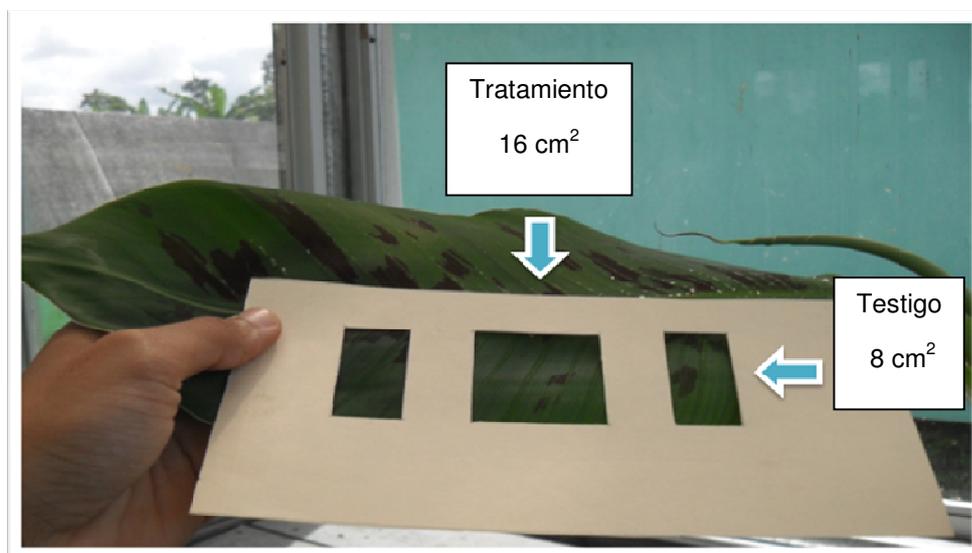


Figura 9. Molde utilizado para la demarcación de las áreas en las hojas. En el cuadrado del centro se aplicaron los tratamientos y los rectángulos funcionaron como testigos.

Transcurridos 30 minutos después de la inoculación, las plantas fueron devueltas al invernadero y 24 horas después de inoculadas se les aplicó el respectivo tratamiento en la hoja 1 y 96 horas después en la hoja 2. Tanto la inoculación del patógeno como la aplicación de los metabolitos, se realizó con aerógrafo (Mini Spray Gun BADYER[®], Modelo 250.4) (Figura 10). La suspensión de conidios del patógeno contenía 0,05 % de Tween[®] 20 para facilitar la adhesión a la superficie de la hoja, mientras que los metabolitos se aplicaron con este mismo adherente pero al 0,1 %.



Figura 10. Forma de aplicación del inoculo y los tratamientos, mediante la utilización de un aerógrafo.

4.7.3. Manejo de las plantas después de la inoculación y aplicación de los tratamientos

Durante los primeros tres días después de la inoculación del patógeno, el riego en el invernadero se realizó por espacio de un minuto cada hora (6 a.m a 6 p.m) para promover la infección del hongo. Luego de transcurrido este tiempo, se realizó por espacio de dos minutos cada dos horas (6 a.m a 6 p.m) hasta la aparición de los primeros síntomas. Cuando esto ocurrió, el riego cambió a un minuto cada tres horas de 6 a.m a 6 p.m. El riego fue programado y controlado con un equipo automático controlado y programado electrónicamente (Rain bird controller, modelo MIC-4, HO).

4.7.4. Diseño experimental

El diseño experimental utilizado en esta prueba fue bloques completos al azar con arreglo factorial 8 x 2; 8 tratamientos (7 metabolitos y un testigo comercial (clorotalonil a 5.000 mg L⁻¹), por dos momentos de aplicación (24 y 96 horas después de la inoculación), más un testigo inoculado (testigo absoluto), con 5 repeticiones por tratamiento.

$$Y_{ijkl} = \mu + B_i + A_j + D_k + AD_{jk} + E_{ijkl}$$

En este modelo:

B_i = efecto del i -ésimo bloque

A_j = efecto del momento de aplicación

D_k = efecto del metabolito secundario

AD_{jk} = efecto de la interacción del método de extracción y el metabolito secundario

E_{ijkl} = error experimental

4.7.5. Análisis estadísticos

El efecto de los tratamientos y del momento de la aplicación así como la interacción entre ambos, se estudio mediante el análisis de varianza, así como la interacción entre ambos. Por medio de contrastes ortogonales se comparó el efecto de los metabolitos con respecto al testigo absoluto y al testigo comercial (clorotalonil).

4.7.6. Variables evaluadas

Se evaluaron los siguientes parámetros de infección:

- Periodo de incubación (PI): tiempo transcurrido entre la inoculación y la aparición de los primeros síntomas.
- Severidad de la enfermedad: se evaluó la severidad de la enfermedad (área foliar afectada de la hoja) cada tres a cuatro días. La severidad se estimó como el porcentaje del área de la hoja con lesiones de la enfermedad que son claramente visibles por el haz de la misma (necrosis).

5. RESULTADOS

5.1. I Etapa. Desarrollo de una metodología para el aislamiento y selección preliminar de hongos con potencial como agentes de combate biológico (ACB)

5.1.1. Obtención de un medio semiselectivo para aislar hongos con bajos requerimientos nutricionales y actividad quitinolítica

El hongo inoculado (*Trichoderma* sp.) logró crecer en los medios Agar - agua con las diferentes dosis de quitina molida (QM), principalmente cuando se adicionaron 30 y 50 g/L. Sin embargo, este medio presentó dos inconvenientes: (i) la quitina molida (grado práctico) precipita, debido a que no es soluble en el medio, por lo que los resultados fueron muy heterogéneos y (ii) con la QM no se podía distinguir entre cepas productoras de quitinasas. Debido a lo anterior se decidió trabajar con quitina coloidal.

El PDA + quitina coloidal (QC) promovió un crecimiento acelerado y abundante de diversos hongos, inclusive cuando el PDA se diluyó hasta 12,5 %, condición que dificultaba la selección y purificación de los aislamientos. Solo cuando la concentración de PDA se redujo al 6,25 % (2,4 g/L) el crecimiento de los hongos (en cantidad y tasa de crecimiento) fue el adecuado como para permitir separarlos y discriminar aquellos menos exigentes a condiciones nutricionales y con actividad quitinolítica (Figura 11). La actividad quitinolítica se distinguía por los halos de hidrólisis que se formaban en los medios de cultivo, producto del crecimiento de aislamientos con habilidad para degradar dicho polímero.

5.2. II Etapa. Colecta de muestras en fincas y aislamientos de los potenciales ACB

En todas las fincas se pudo encontrar material vegetal depositado en el suelo con lesiones de Sigatoka negra y además, con algún tipo de crecimiento de micelio de hongos diferentes a *M. fijiensis* sobre las lesiones. De estas se lograron aislar hongos candidatos a ACB de *M. fijiensis*. La cantidad varió entre fincas; con una menor frecuencia (13 aislamientos) en La Victoria y 28 Millas y una mayor frecuencia (34 y 39 aislamientos) en San Carlos y Talamanca (Cuadro 2). En total se aislaron 196 hongos candidatos a ACB, de los cuales 78 (39,8 %) mostraron evidencias de actividad quitinolítica (Figura 12).

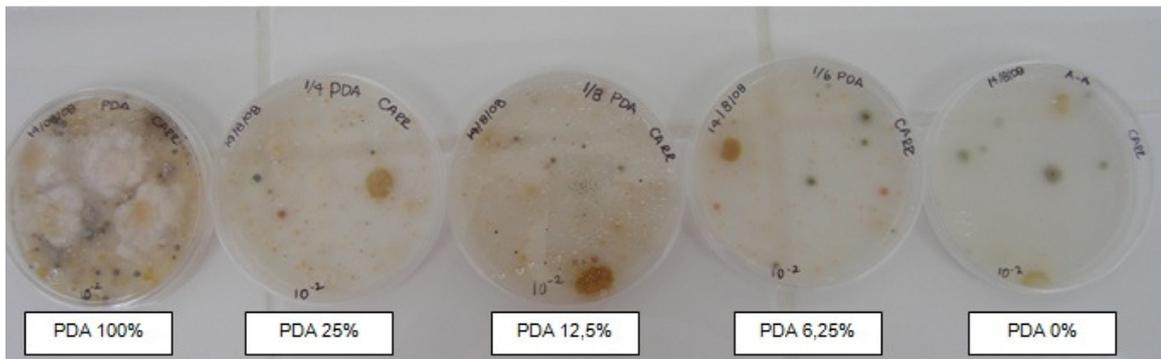


Figura 11. Crecimiento de hongos en medios PDA (100 – 25 - 12,5 - 6,25 y 0 %) + quitina coloidal 1 %. Nótese el abundante crecimiento de los hongos a 100, 25 y 12,5 % que dificulta la selección y purificación de candidatos por el abundante crecimiento de micelio. Por el contrario, cuando no se adiciona PDA el crecimiento es muy pobre, lo que también limita la elección de candidatos. El balance adecuado se estableció cuando se adicionó un 6,25 % de PDA (2,43 g/L).

Cuadro 2. Cantidad de hongos aislados de las fincas como candidatos a agentes de combate biológico de la Sigatoka negra.

Finca	Total de hongos aislados como candidatos a posibles ACB de <i>M. fijiensis</i>	Número de aislamientos con actividad quitinolítica
San Pablo	22	10 (5,1 %)
La Rita	34	18 (9,2 %)
La Victoria	13	7 (3,6 %)
28 Millas	13	3 (1,5 %)
Hacienda Río Palacios	24	0 (0 %)
San Carlos (Huertos mixtos)	39	13 (6,6 %)
Talamanca (Orgánicas)	34	16 (8,2 %)
Valle de la Estrella	17	11 (5,6 %)
Total	196	78 (39,8 %)

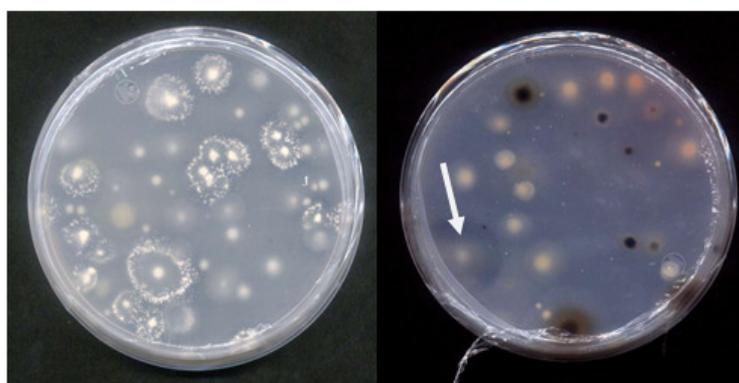


Figura 12. Algunos hongos candidatos a ACB de *M. fijiensis* en un medio PDA al 6,5 % + quitina coloidal 1 % + antibiótico. La flecha de color blanco indica un halo de degradación de la quitina, evidencia de la presencia de un hongo con actividad quitinolítica.

5.3. III Etapa. Purificación y conservación de los aislamientos de los potenciales ACB

El total de aislamientos fue purificado exitosamente. En la Figura 13A se muestra el crecimiento de algunos de los hongos después de la primera purificación. Además, con las diluciones seriales (segunda purificación) se logró obtener cultivos monospóricos o de porciones mínimas de micelio altamente puros. Con esta metodología crecieron en los platos entre 1-3 UFC (Figura 13B) que permitió corroborar la uniformidad fenotípica y asegurar de este modo que los cultivos derivaron de material biológico de alta pureza.

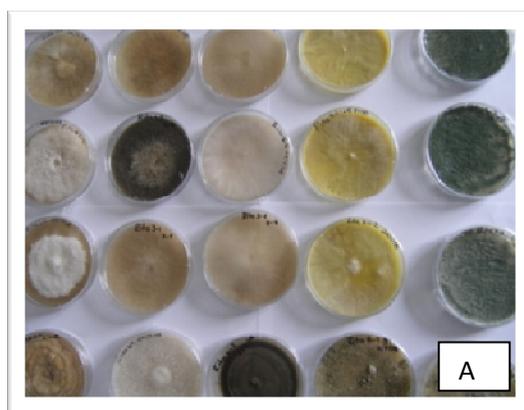


Figura 13. **A.** Crecimiento de algunos aislamientos sometidos a la primera purificación. **B.** Algunos cultivos monospóricos de los potenciales ACB. Nótese la reducida cantidad de UFC por plato y la uniformidad y pureza de las colonias.

Se logró la conservación de todos los aislamientos, tanto en aceite mineral como liofilizados (Figura 14). Esto sirvió como respaldo para las etapas que proseguían, ya que garantizó la uniformidad del material biológico utilizado en la investigación. Al reactivar las cepas de los ACB, el 100 % de las conservadas en aceite mineral y el 80 % de las liofilizadas lograron crecer en medio PDA y alcanzaron un desarrollo micelial adecuado



Figura 14. (A) Algunos aislamientos conservados en aceite mineral y listos para almacenar. (B) Algunos aislamientos liofilizados y listos para ser conservados. (C) Desecador cubierto con papel aluminio para mantener los cultivos liofilizados en la oscuridad.

5.4. IV Etapa. Producción de metabolitos secundarios de los potenciales ACB

El medio líquido de YEGK permitió un buen desarrollo de los aislamientos. La mayoría de los aislamientos produjo abundante micelio y en algunos casos liberaron pigmentos que variaron la tonalidad del medio, de un amarillo suave a un amarillo más fuerte y hasta tonos cafés. Estas variaciones en tonalidad del medio evidencian la posible producción de algún metabolito secundario por parte del aislamiento. También se observó que algunos de los aislamientos degradaron por completo la quitina coloidal adicionada al medio (Figura 15).

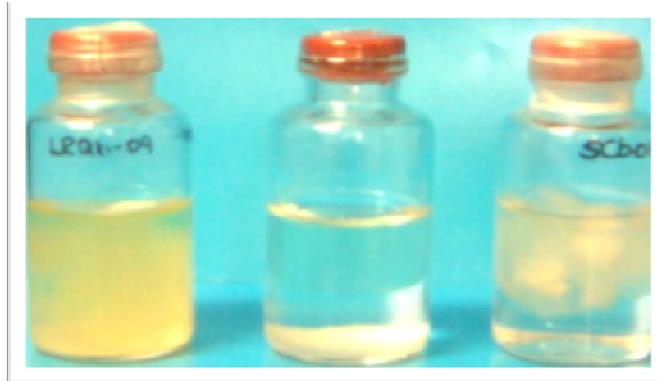


Figura 15. Crecimiento de los potenciales agentes de combate biológico en medio líquido de YEGK después de 14 días de cultivo. El vial del centro no fue inoculado. Nótese la producción de un pigmento amarillo en el vial de la izquierda y el crecimiento de abundante micelio y degradación de la quitina en el de la derecha.

5.5. V Etapa. Evaluación *in vitro* de la actividad fungicida de los metabolitos secundarios

El análisis de varianza para cada categoría de germinación de las esporas y para la suma de las esporas no germinadas y cortas o distorsionadas (esta última categoría se utilizó como base para comparar el efecto de los metabolitos secundarios sobre de *M. fijiensis*) evidenció un efecto del tratamiento ($P < 0,0001$), del método de extracción ($P \leq 0,0078$) y la interacción de estos dos ($P < 0,0001$) (Anexo 3).

En el Cuadro 3 se puede observar el total de aislamientos evaluados *in vitro* por finca y la cantidad de estos que mostraron un efecto inhibitorio destacado (esporas no germinadas + esporas con tubos cortos $\geq 50\%$) y la menor cantidad de esporas con germinación normal y con tubos ramificados. En el Cuadro 4 se muestra el ordenamiento de los 25 aislamientos que produjeron los metabolitos más activos contra *M. fijiensis*.

Cuadro 3. Tratamientos evaluados por finca y la cantidad de aislamientos que mostraron un efecto inhibitorio destacado.

Finca	Número de tratamientos ¹ probados <i>in vitro</i> según fincas donde se realizaron las colectas de material	Número de tratamientos que mostraron efecto inhibitorio destacado (esporas no germinadas + esporas con tubos cortos $\geq 50\%$) sobre la germinación de ascosporas de <i>M. fijiensis</i>
La Rita	59	15
San Pablo	40	1
Hacienda Rio Palacios	34	1
28 Millas	23	1
Valle de la estrella	32	3
Talamanca	51	1
San Carlos	63	5
La Victoria	24	6
Total	326	33

1/ El total de tratamientos fue el doble de los aislamientos debido a que los metabolitos se extrajeron por dos formas (calor-presión y filtrado al vacío).

Basados en la frecuencia, se destacaron metabolitos de aislamientos de fincas como La Victoria (finca comercial), San Carlos (huertos mixtos), La Rita (plantación no tratada con fungicidas) y Valle de la Estrella (plantación comercial). Sin embargo, el mayor efecto inhibitorio (mayor porcentaje de esporas no germinadas y cortas), se observó en los aislamientos obtenidos de los huertos mixtos de San Carlos. También se destacaron aislamientos del Valle de la Estrella, 28 Millas y La Rita (los dos últimos no tratadas con fungicidas) y de Talamanca (fincas orgánicas) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Ordenamiento de los aislamientos con metabolitos más activos según el método de extracción de los mismos. Como referencia se utilizó la sumatoria del porcentaje de ascosporas no germinadas y con tubos cortos y distorsionados (NG + CyD).

Ranking	Código del metabolito	Procedencia (Finca)	% de ascosporas según categoría de germinación				
			NG+CyD*	NG*	GN*	CyD*	R*
1	SCQ-07F	San Carlos	100,0 a	75,2	0,0	24,8	0,0
2	SC-03F	San Carlos	100,0 a	46,4	0,0	53,6	0,0
3	SC-19F	San Carlos	100,0 a	21,2	0,0	78,8	0,0
4	VE-05F	Valle de la Estrella	100,0 a	6,8	0,0	93,2	0,0
5	VMQ-02F	28 Millas	100,0 a	0,0	0,0	100,0	0,0
6	LR-12F	La Rita	100,0 a	0,0	0,0	100,0	0,0
7	T-06F	Talamanca	100,0 a	0,0	0,0	100,0	0,0
8	SCQ-03F	San Carlos	98,0 ab	78,4	2,0	19,6	0,0
9	LVQ-02F	La Victoria	98,0 ab	0,0	2,0	98,0	0,0
10	LVQ-01F	La Victoria	90,0 abc	19,2	10,0	70,8	0,0
11	LV-06F	La Victoria	88,4 abc	8,0	11,6	80,4	0,0
12	LRQ-04F	La Rita	88,4 abc	0,0	11,6	88,4	0,0
13	VEQ-04 A	Valle de la Estrella	82,8 abcd	0,0	4,4	82,8	12,8
14	LRQ-01 A	La Rita	82,8 abcd	0,0	17,2	82,8	0,0
15	LVQ-03 A	La Victoria	82,4 abcde	0,0	17,6	82,4	0,0
16	SPQ-07F	San Pablo	80,0 abcdef	0,0	20,0	80,0	0,0
17	LRQ-13 A	La Rita	79,2 abcdef	6,4	19,6	72,8	1,6
18	LRQ-15F	La Rita	79,2 abcdef	0,0	20,8	79,2	0,0
19	LRQ-02 A	La Rita	77,6 abcdef	0,0	22,4	77,6	0,0
20	LV-06A	La Victoria	76,8 abcdef	0,0	23,2	76,8	0,0
21	VE-02F	Valle de la Estrella	74,8 bcdef	0,8	23,2	74,0	2,0
22	HRP-01F	Hda. Río Palacios	74,0 bcdef	0,0	26,0	74,0	0,0
23	LVQ-01A	La Victoria	70,4 cdefgh	1,2	29,6	69,2	0,0
24	LRQ-17F	La Rita	68,8 cdefgh	0,0	31,2	68,8	0,0
25	LR-15F	La Rita	66,8 cdefgh	0,0	33,2	66,8	0,0

*NG+CyD: Sumatoria de esporas no germinadas y esporas con tubos cortos y distorsionados; NG: Esporas no germinadas; GN: Esporas con germinación normal; CyD: esporas con tubos cortos y/o distorsionados; R: esporas con tubos ramificados.

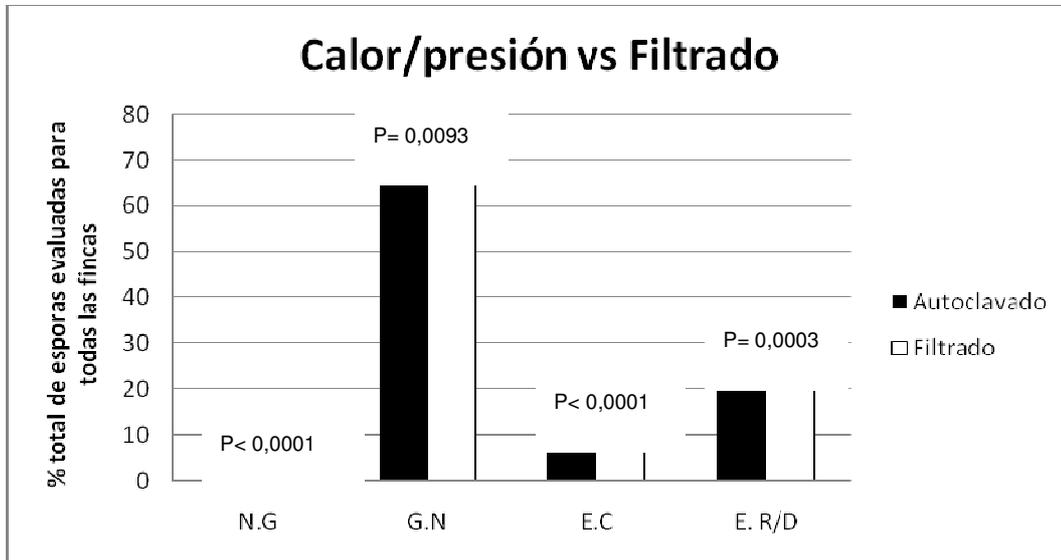
5.5.1. Comparación de la eficiencia de las dos técnicas de separación de metabolitos secundarios (calor/presión vs filtrado al vacío)

La extracción por autoclavado (calor y presión) redujo la eficacia *biológica in vitro* de los metabolitos, lo cual se reflejó en un menor ($P < 0,0001$) porcentaje de esporas no germinadas (NG) y un mayor ($P = 0,0093$) porcentaje de esporas con germinación normal (GN) (Cuadro 5 y Figura 16). Este mismo efecto es notorio en el ordenamiento de los metabolitos (Cuadro 4), en el mismo se puede apreciar que de los 25 metabolitos más activos, los 12 primeros fueron extraídos por filtración y del total, el 72 % (18 metabolitos) fueron extraídos por dicha técnica. Basados en los 10 metabolitos más activos *in vitro* por el método de filtrado, al autoclavarlos la efectividad de los mismos se redujo entre 21,8 - 100 % (promedio 87,9 %) (Cuadro 6).

Cuadro 5. Comparación de la eficiencia de las dos técnicas de separación de metabolitos secundarios (calor/presión vs filtrado al vacío)

Variable	Media		Probabilidad	Error estándar
	Autoclavado	Filtrado		
NG	0,12	1,96	<0,0001	0,2095
GN	69,51	67,23	0,0093	1,37
CyD	7,63	11,99	<0,0001	0,85
R	22,72	18,68	0,0003	1,23
NG+CyD	0,12	1,96	<0,0001	0,205

NG: Esporas no germinadas, GN: Esporas con germinación normal, CyD: esporas con tubos cortos y/o distorsionadas, R: esporas con tubos ramificados.



N.G: Esporas no germinadas, G.N: Esporas con germinación normal, E.C: Esporas con tubos cortos, E. R/D: Esporas con tubos múltiples, ramificadas o distorsionados.

Figura 16. Comparación de la eficiencia, en términos del efecto sobre la germinación de ascosporas, de las dos técnicas de separación de metabolitos secundarios utilizadas en el estudio.

Cuadro 6. Comparación del efecto del método de extracción sobre la eficacia *in vitro* de 10 metabolitos. Se utilizó como referencia la sumatoria del porcentaje de esporas no germinadas y esporas con tubos cortos y/o distorsionados.

Tratamiento	% de ascosporas NG+CyD ¹		Perdida de efectividad (%) por el autoclavado
	Filtrado	Autoclavado	
SC-03	100,0	0	100
LR-12	100,0	47,2	62,8
VE-05	100,0	0	100
SC-19	100,0	0	100
T-06	100,0	0	100
VMQ-02	100,0	0	100
SCQ-07	100,0	0	100
LVQ-02	98,0	0	100
LVQ-01	90,0	70,4	21,8
LVQ-04	88,4	0	100
Promedio	97,6	11,8 %	87,9

1/ NG + CyD= Sumatoria del porcentaje de ascosporas no germinadas y con tubos cortos y/o distorsionados.

5.6. VI Etapa. Evaluación en condiciones de invernadero de la eficacia biológica sobre la Sigatoka negra de los metabolitos secundarios que mostraron mayor actividad *in vitro*

En la evaluación realizada a los 50 días después de la inoculación del patógeno, se determinó un efecto sobre la severidad de la Sigatoka negra del tratamiento ($P= 0,0025$) y del tiempo después de la inoculación ($P < 0,0001$) en que estos fueron aplicados, sin interacción entre ambos ($P= 0,2058$). En el Cuadro 7 se muestran las medias de la severidad de la Sigatoka negra en los tratamientos evaluados, tanto en la aplicación realizada a las 24 como a las 96 horas después de la inoculación. Cuando los metabolitos se aplicaron 24 horas después de la inoculación ejercieron control de la enfermedad y fueron diferentes ($P \leq 0,0215$) al

testigo absoluto. Entre metabolitos no se observaron diferencias ($P \geq 0,5188$), sin embargo, tres de estos (SC-19, SCQ-07 y T-06) no mostraron diferencias con el clorotalonil ($P \geq 0,0700$) mientras los restantes 4 fueron ligeramente inferiores ($P \leq 0,0368$).

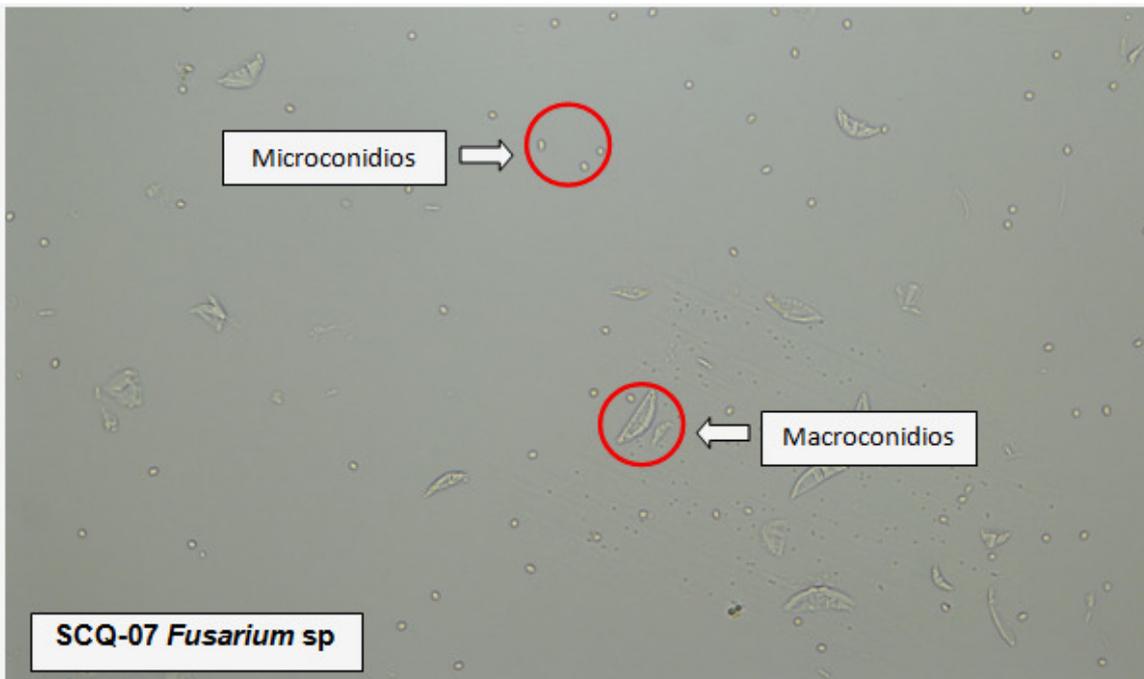
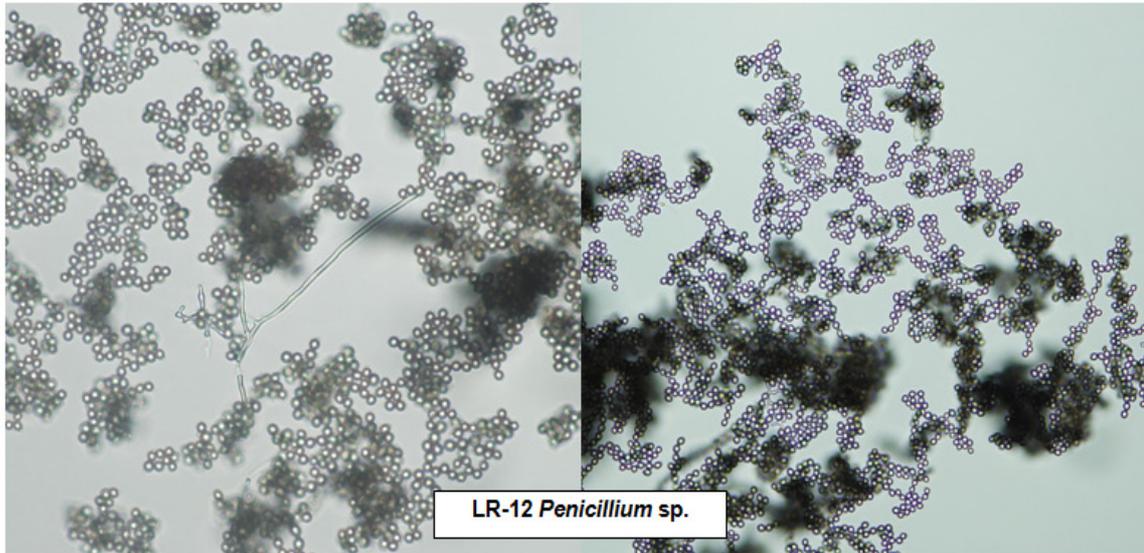
En la aplicación realizada 96 horas después de la inoculación solo en clorotalonil ejerció control de la enfermedad y fue diferente del testigo absoluto ($P = 0,0350$) y de los metabolitos ($P \leq 0,0275$). Entre los metabolitos y el testigo absoluto no se encontraron diferencias ($P \geq 0,2087$).

Los aislamientos de los hongos productores de los metabolitos SC-19 y VE-05 fueron identificados mediante técnicas moleculares como *Paecilomyces lilacinus* (100 % de homología) y *Penicillium* sp. (99 % de homología), respectivamente. Los restantes aislamientos se identificaron morfológicamente como: LR-12 (*Penicillium* sp.), SCQ-07 (*Fusarium* sp.), T-06 (probable *Chalara* sp.) y VMQ-02 (*Fusarium* sp.). El aislamiento SC-03 no fue identificado debido a que no produjo estructuras reproductivas en cultivo.

Cuadro 7. Medias de severidad (% de necrosis) de la Sigatoka negra en los tratamientos, aplicados 24 y 96 horas después de la inoculación del patógeno en condiciones de invernadero. Evaluación realizada 50 días después de la inoculación.

Tratamiento ¹	Severidad ² /Momento de aplicación ³	
	24 Horas	96 Horas
LR-12F	4,0	24,6
SC-03F	5,6	27,6
SC-19F	2,8	22,4
SCQ-07F	2,8	24,0
T-06F	3,4	15,6
VE-05F	5,0	23,6
VMQ-02F	4,4	31,4
TC (clorotalonil)	0,0	0,0
TA (Testigo absoluto)	19,4	17,4
Contrates		
Metabolitos vs TA	≤0,0215	≥0,2087
TC vs TA	< 0,0001	0,0350
TC vs Metabolitos (SC-19, SCQ-07, T-06)	≥0,0700	≤0,0275
TC vs Metabolitos (LR-12, SC-03, VE-05, VMQ-02)	≤0,0368	≤0,0052
Entre Metabolitos	≥0,5188	≥0,2489

1/ Los siete primeros tratamientos corresponden a metabolitos secundarios (obtenidos por filtración) de hongos aislados directamente de lesiones de Sigatoka negra de hojas de banano (*Musa AAA*). 2/ Para efectos de análisis estadísticos los valores de severidad fueron transformados por raíz cuadrada del valor + 1. 3/ Corresponde al tiempo después de la inoculación del patógeno.



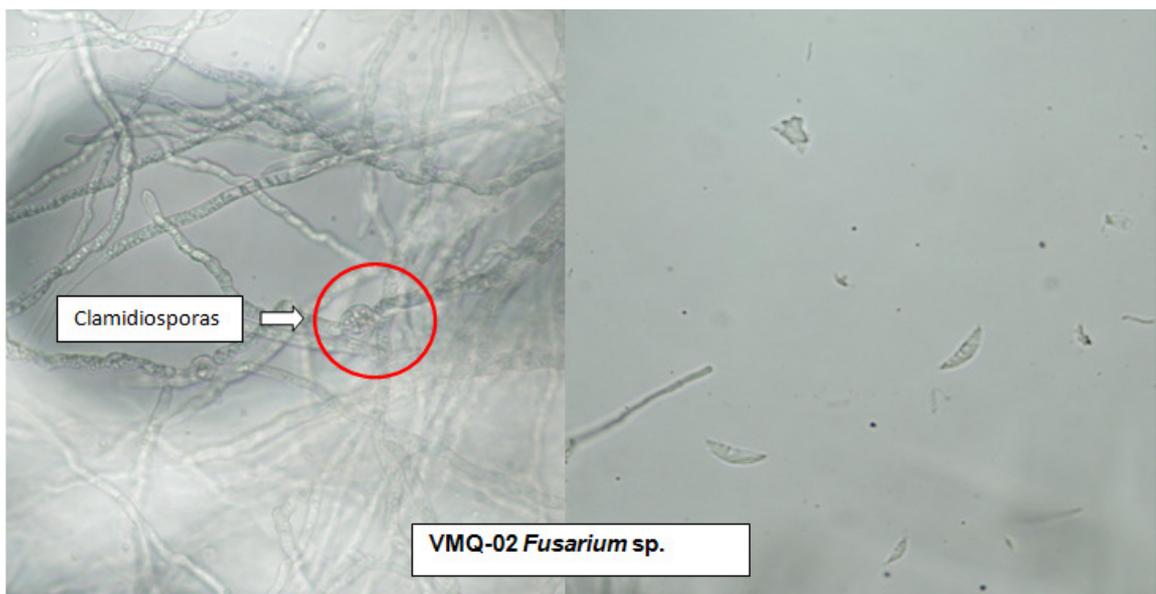


Figura 17. Identificación morfológica de los hongos más promisorios que fueron llevados a pruebas de invernadero.

6. DISCUSIÓN

Se logró establecer un medio semiselectivo (rico en quitina y pobre en nutrientes) y una metodología que permitió el aislamiento y la selección de potenciales ACB directamente de hojas de banano con lesiones de Sigatoka negra. Con el medio utilizado los hongos crecieron paulatinamente y tardaron más tiempo en coalescer entre sí, lo que facilitó discriminar, aquellos que mostraban alguna característica de interés, como la habilidad para degradar la quitina.

El medio desarrollado en esta investigación se podría modificar con la adición de otros componentes, como celulosa y glucano, en función del interés particular por el tipo de organismo que se desee seleccionar, contrario a lo que ocurre con medios más generales. En otros estudios se han utilizado medios generales, por ejemplo, Jiménez y Galindo (1987) utilizaron el medio triptona-destroxa-agar para aislar microorganismos de hojas de plantas de banano en abandono con síntomas incipientes de Sigatoka negra, Kanapathipillai *et al.* (2000) utilizaron el medio PDA para aislar hongos de hojas de banano en tres estados de crecimiento, en Tailandia Photita *et al.* (2001) aislaron hongos endofíticos de bananos silvestres (*Musa acuminata*) y utilizaron el medio extracto de malta agar con un 2 % de estreptomicina para inhibir las bacterias y en Colombia Galvis (2004) utilizó agar nutritivo para aislar microorganismos de la filosfera de musáceas.

La utilización de medios más específicos y selectivos no ha sido frecuente. González (1995) utilizó medio agar + quitina coloidal y agar nutriente + quitina coloidal (0,2 % p/v) para aislar microorganismos quitinolíticos de follaje de banano. Este registró una reacción positiva de metabolización de la quitina en aquellos microorganismos cuyo borde de la colonia fue transparente. Esta reacción coincide con la que se observó en la presente investigación.

Del total de hongos aislados, cerca del 40 % mostró propiedades quitinolíticas. Sastoque *et al.* (2007) comentan que las quitinasas producidas por los microorganismos rompen los enlaces glucosídicos del polímero, para obtener monómeros y así liberar el carbono y el nitrógeno de la molécula, los que utilizan

como fuente de energía. La presencia de este tipo de hongos sobre las lesiones de Sigatoka negra podría deberse a que estaban aprovechando la quitina presente en los pseuditecios del patógeno.

Se conoce que los primeros microorganismos en colonizar el filoplano son las bacterias, seguidas de las levaduras. Es en la madurez de la hoja cuando los hongos empiezan a colonizar el filoplano, el que llegan a dominar por completo cuando la hoja llega a la senescencia (Blakeman 1985). Jiménez *et al.* (1985) demostraron que la hoja de banano está colonizada por una variedad de microorganismos. En estudios realizados en Malasia por Kanapathipillai *et al.* (2000), se estimaron las poblaciones de hongos en hojas de banano en tres estados de crecimiento (hoja enrollada, hoja verde abierta y hoja senescente) y encontraron el mayor porcentaje de estos en hojas senescentes. Lo anterior confirma que la metodología seguida en esta investigación fue adecuada, ya que el objetivo de la misma fue seleccionar hongos antagonistas a *M. fijiensis*.

Hasta nuestro conocimiento esta investigación constituye el primer estudio en el que se aíslan, evalúan y seleccionan hongos antagonistas a *M. fijiensis* directamente de hojas de banano con lesiones de la enfermedad. Otros estudios se han orientado únicamente a la identificación de la diversidad de hongos existentes en el filoplano de las musáceas (Urdaneta *et al.* 2002, Kanapathipillai *et al.* 2000) y al aislamiento de bacterias antagonistas (Jiménez *et al.* 1985, González 1995, Galvis 2004).

En todas las fincas evaluadas (con uso y sin uso de fungicidas) fue posible aislar hongos con potencial como ACB de la Sigatoka negra, directamente de hojas de banano. No obstante, la tendencia fue a una mayor frecuencia de antagonistas en las fincas orgánicas y huertos mixtos donde no se realizan aplicaciones de fungicidas químicos. Lo anterior evidencia, de algún modo, que estas aplicaciones afectan las poblaciones de hongos antagonistas que compiten con el patógeno en condiciones naturales. Hislop (1976), considera que las aplicaciones de químicos en el filoplano podrían reducir las poblaciones de microorganismos en general.

González (1995), en investigaciones realizadas en plantaciones comerciales de banano, encontró que las poblaciones de microorganismos epífitos eran bajas.

En investigaciones con microorganismos, que se hayan aislado en un lugar y momento específico, la conservación segura es un factor clave, ya que se debe asegurar la viabilidad, pureza y estabilidad genética del material biológico. Las dos metodologías de conservación utilizadas en esta investigación brindaron resultados satisfactorios, ya que al reactivar los aislamientos estos lograron crecer y mantuvieron sus características fenotípicas originales. Ambas técnicas se pueden considerar confiables, sin embargo, la conservación en aceite mineral tiene la ventaja de que es de bajo costo, puede mantener la viabilidad de los cultivos de 2 hasta 40 años, requiere de poca inversión de energía y no requiere equipo especializado (Smith y Onions 1994).

Se logró aislar de hojas de banano con lesiones de Sigatoka negra hongos que producen metabolitos secundarios con actividad *in vitro* e *in vivo* contra *M. fijiensis*. La capacidad de los hongos antagonistas de producir metabolitos secundarios (antibióticos, enzimas hidrolíticas) con actividad biológica contra otros microorganismos es bien conocida (Reilly *et al.* 1945, Grossbard 1952, Demain 1986, Fravel 1988), no obstante, esta condición ha sido poco explotada como alternativa para el combate biológico de enfermedades de plantas. Fravel (1988) y Haggag y Mohamet (2007) comentan que la actividad antagonista de los hongos muy a menudo está asociada a la producción de metabolitos secundarios, principalmente antibióticos como enzimas líticas, compuestos volátiles, sideróforos, sustancias tóxicas, compuestos antifúngicos, entre otros.

La producción de metabolitos secundarios está muy relacionada con las características y composición del medio de cultivo. Según Demain (1986), en los medios de cultivo nutricionalmente ricos se producen una alta cantidad de metabolitos secundarios, pero esto se obtiene solamente cuando la mayoría del crecimiento celular se ha alcanzado. Además, el mismo autor considera que otros factores, como la composición del medio y el tiempo de cultivo, son aspectos relevantes a la hora de buscar producción metabolitos secundarios por los hongos.

En la presente investigación para la producción de metabolitos secundarios solo se estudió un medio específico, en un tiempo y condiciones de cultivo definidas y se observaron resultados promisorios. No obstante, existen amplias posibilidades de mejorar los resultados obtenidos mediante modificaciones en el medio o en las condiciones de cultivo o en ambos y esto podría ser abordado en investigaciones futuras con la misma colección de microorganismos.

El método de extracción afectó la actividad *in vitro* de los metabolitos. En términos generales los que fueron obtenidos por medio de autoclavado se mostraron menos activos que los obtenidos por filtración. Lo anterior evidencia la posible presencia de enzimas en los metabolitos, ya que estos son muy sensibles a la degradación a altas temperaturas. Resultados similares obtuvieron Lewis y Papavizas (1987) quienes al autoclavar extractos acuosos de *Trichoderma* spp. y *Gliocladium virens* observaron 75-80 % de reducción en la efectividad contra *R. solani*. Los autores atribuyeron el efecto a la presencia de enzimas con efecto antibiótico que se degradaron durante el proceso. Existen también ejemplos en los que el autoclavado no afectó la eficacia de los metabolitos; Fravel (1988) comenta que tanto metabolitos filtrados como autoclavados de *Bacillus subtilis* han sido efectivos en el combate de patógenos. El autor también menciona que algunos de los compuestos que contenían estos cultivos eran termoestables, probablemente por esto no se perdieron en el proceso de autoclavado.

En las pruebas *in vitro*, de los 10 aislamientos más promisorios, 7 proveían de fincas donde no se realizan aplicaciones de fungicidas químicos, esto puede atribuirse a que en estas plantaciones la presión de selección está orientada a microorganismos con mayor habilidad para competir por nutrientes y espacio, procesos en los cuales la antibiosis puede desempeñar un rol fundamental. Por el contrario, en las plantaciones donde frecuentemente se realizan aplicaciones de químicos esta selección está dirigida a microorganismos capaces de resistir los mismos.

La correlación entre la actividad biológica de metabolitos secundarios *in vitro* e *in vivo* ha sido controversial. Existen informes de resultados positivos de esta

correlación y por otro lado estudios que muestran carencia de correlación entre la actividad *in vitro* y la eficiencia *in vivo* o en campo. Fravel (1988), menciona varios estudios donde se ha encontrado una falta de correlación entre la antibiosis *in vitro* y la protección contra infecciones en campo. Sin embargo, también presenta una serie de estudios con una correlación alta, donde los antibióticos estudiados muestran una buena actividad *in vitro* y también *in vivo*. En el presente estudio se encontró una alta correlación entre la actividad biológica *in vitro* de los metabolitos secundarios de los hongos aislados contra las ascosporas de *M. fijiensis* y el efecto de estos sobre la severidad de la enfermedad en condiciones de invernadero. Lo anterior demuestra que el criterio utilizado para la selección *in vitro* de los metabolitos secundarios que se evaluaron en invernadero fue adecuado.

De los géneros de hongos identificados en esta investigación no han sido frecuentemente informados como agentes de combate biológico de enfermedades foliares en plantas. *Paecilomyces* sp. por ejemplo, es conocido ACB de nematodos en diversos cultivos (Westenfeld *et al.* 1996, Kiewnick y Sikora 2006, Khan *et al.* 2006, Mendoza *et al.* 2007), *Penicillium* sp. además, de ser reconocido por su capacidad de producir antibióticos, muchos para uso humano y animal, existen varios informes de este como agente de combate biológico (Jackson *et al.* 1996, Sabuquillo *et al.* 2006, Ma *et al.* 2007, Guijarro *et al.* 2007, De Cal *et al.* 2009). *Fusarium* sp. por su parte se ha encontrado como endofítico en raíces y cormos de banano y en otros cultivos y se le atribuyen propiedades de antagonista a nematodos (Pocasangre *et al.* 2000, Athman *et al.* 2007, Sikora *et al.* 2008, Felde *et al.* 2009) y *Chalara* sp. se informa como parásito y saprófito (Barnett y Hunter 1998) y hay pocos informes de su uso como agente de control biológico (Losgen *et al.* 2008).

Se demostró que en las plantaciones de banano existen hongos con potencial para ser utilizados como agentes de combate biológico de la Sigatoka negra. La búsqueda más continua y exhaustiva, así como la exploración de diferentes nichos ecológicos donde coexistan el cultivo y el patógeno podría deparar aún mejores

resultados. La metodología desarrollada en esta investigación permitirá el desarrollo de este tipo de estudios.

7. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en la investigación se derivan las siguientes conclusiones:

1. Se desarrolló una metodología adecuada para el aislamiento y selección de hongos antagonistas a *M. fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra, en plantaciones de banano.
2. Con la metodología desarrollada se demuestra que en las plantaciones de banano existen hongos antagonistas con potencial para el combate biológico de la Sigatoka negra.
3. Algunos de los hongos aislados mostraron capacidad para producir enzimas quitinolíticas, lo cual aumenta sus posibilidades de actuar como antagonista de *M. fijiensis*.
4. El manejo de las fincas o plantaciones influye en la presencia de antagonistas al patógeno y en la capacidad de los mismos de producir metabolitos secundarios con mayor actividad biológica contra *M. fijiensis*.
5. La mejor forma de separar los metabolitos secundarios producidos por hongos es por medio de filtración al vacío (en frío), ya que por medio de autoclavado se puede perder hasta el 100 % de la actividad de los metabolitos.
6. En las fincas orgánicas, huertos mixtos y áreas sin tratamiento de fungicidas existen mayores posibilidades de aislar hongos antagonistas a *M. fijiensis*.

7. Los metabolitos secundarios redujeron la severidad de la Sigatoka negra, similar al fungicida clorotalonil en condiciones de invernadero, cuando se aplicaron poco tiempo después de la inoculación del patógeno.
8. De acuerdo con lo observado en condiciones de invernadero los metabolitos actuaron con un efecto protectante, principalmente, ya que no ejercieron control de la enfermedad al aplicarse 96 horas después de la inoculación del patógeno. Sin embargo, tampoco debe descartarse una posible degradación rápida de los mismos por la luz u otros factores, aspecto que debe ser mejor estudiado.
9. Con la presente investigación se demuestra que en las plantaciones de banano existen hongos con alto potencial como agentes de combate biológico de la Sigatoka negra, pero se requieren más estudios en este campo.

8. RECOMENDACIONES

1. Realizar pruebas de medios con diferente composición, por ejemplo, adicionar glucano, celulosa y fuentes de energía o mezclas de estos con quitina, para inducir a los microorganismos a una producción de diferentes enzimas que podrían aumentar su actividad biológica contra *M. fijiensis*.
2. Evaluar en invernadero otros metabolitos promisorios que no se incluyeron en la presente investigación.
3. Llevar los metabolitos de los aislamientos promisorios a campo para evaluar su potencial bajo condiciones reales de cultivo.
4. Evaluar el efecto de los metabolitos en mezcla con sustancias que faciliten su penetración en la hoja (aceites minerales o vegetales) y que los protejan de la degradación por luz (protectores contra rayos UV).
5. Con la metodología desarrollada explorar más fincas y agroecosistemas, donde coexisten el cultivo y el patógeno, para aumentar las posibilidades de aislar y seleccionar antagonistas altamente eficaces.

9. BIBLIOGRAFIA

Aguirre, M, Castaño, J; Zuluaga, L. 2003. Método rápido de diagnóstico de *Mycosphaerella musicola* Leach y *M. fijiensis* Morelet, agentes causantes de las sigatokas amarilla y negra. Rev. Acad. Colomb. Cienc. 27 (105): 619-623.

Alcano, M; Salazar, E; Albarracin, N; Salazar, N; Altuna, G; Glenda, A; Guzmán, J. (s.f). Caracterización molecular de aislamientos de *Trichoderma* spp., usados en el control de *Macrophomina phaseolina*, en *Phaseolus vulgaris* mediante el uso de marcadores RAPD. P 19 en: X Reunión Internacional de Trichoderma 2008. Memorias.

Andrews, J.H. 1990. Biological control in the phyllosphere: Realistic goal of false hope? Canadian J. Plant Pathol. 12: 300-307.

Arango, ME. 2002. Alternativas de manejo para el control biológico de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Moleret) en el cultivo del banano (Musa AAA). p. 130-134. In Memorias XV Reunión Internacional ACORBAT, Cartagena de Indias, Colombia. Oct 27-Nov 02 de 2002.

Arauz, L.F. 1998. Fitopatología un enfoque agroecológico. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. pp 381-389.

Arzate, J; Michel, A; Domínguez, V; Santos, O. 2006. Antagonismo de *Trichoderma* spp. sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka Negra del plátano (*Musa sp.*) in vitro e invernadero. Revista Mexicana de fitopatología. 24(2): 98-104.

Athman, S; Dubois, T; Coyne, D; Gold, C; Labuschagne, N; Viljoen, A. 2007. Effect of endophytic *Fusarium oxysporum* on root penetration and reproduction of *Radopholus similis* in tissue culture-derived banana (*Musa* spp.) plants. Nematology. 9 (5): 599-607.

- Baker, R; Griffin, G.J. 1995. Novel approaches to integrated pest management. Molecular Strategies for Biological Control of Fungal Plant Pathogens. Reuveno, R. (ed). CRC Press. pp. 153-182.
- Barnett, H.L; Hunter, B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4^{ta} ed. APSPRESS. California.
- Benítez, T; Rincón, AM; Limón, MC; Coón, A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. Internatinal Microbiology 7: 249-260.
- Blakeman, J.P; Fokkema, N.J. 1982. Potencial for biological control of plant diseases on the phylloplane. Annual Review Phytopathology. 20: 167-192.
- Brizuela, M; García, L; Pérez, L; Mansur, M. 1998. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios. Rev Iberoam Micol 15: 69-74.
- Brodhagen, M; Henkels, M; Loper, J. 2003. Positive autoregulation and signalling properties of Pyoluteorin, an antibiotic produced by the biological control organism *Pseudomonas fluorescens* Pf-5. Applied and environmental microbiology. 70(3): 1758-1766.
- Calvo, A; Wilson, R.A; Woo, J; Keller, N. 2002. Relationship between Secondary metabolites and fungal development. Microbiology and Molecular Biology Reviews. Vol. (66):3. pp 447-459.
- Champion, J. 1968. El plátano. Trad. F Palomeque. 1 ed. Barcelona, España. Editorial BLUME. 15, 17-18p.
- Chernin, L., Ismailov, Z., Haran, S. and Chet, I. (1995) Chitinolytic Enterobacter agglomerans antagonistic to fungal plant pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1720-1726.
- Chérif, M; Benhamou, N. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f sp. *radiscis* - *lycopersici*. Phytopathology 80(12): 1406-1414.

Chillet, M; Abadie, C; Hubert, O; Chilin-Charles, Y; de Lapeyre de Bellaire, L. 2008. Sigatoka disease reduces the greenlife of bananas. Crop Protection. Doi:10.1016/j.cropro.2008.08.008

Consejo Institucional Bananero (CIB). 2008. Most frequent questions about the Costa Rican Banana industry. CORBANA. San Jose, Costa Rica.

Crous, P; Mourichon, X. 2002. *Mycosphaerella eumusae* and its anamorph *Pseudocercospora eumusae* spp. nov.: causal agent of eumusae leaf spot disease of banana. Sydowia 54(1): 35-43.

Cummings, R.D; Doering, T. s.f. Fungi. (en línea). Consultado el 23 de oct. 2009. Disponible en <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf>.

De Cal, A; Szejnberg, A; Sabuquillo, P; Melgarejo, P. 2009. Management Fusarium wilt on melón and watermelon by *Penicillium oxalicum*. Biological Control. 51, 480-486.

Demain, A. 1986. Regulation of secondary metabolites in fungi. Pure and Appl. Chem. Vol, 58, No. 2, pp 219-226.

Duffy B.K; Défago, G. 1999. Environmental factors modulating antibiotic and siderophore biosynthesis by *Pseudomonas fluorescens* biocontrol strains. Applied and Environmental Microbiology 65(6): 2429-2438.

Eguez, V. 2000. Control biológico de Sigatoka negra en banana, con microorganismos eficientes, en dos zonas del trópico de Cochabamba. Proyecto CONCADE. Development Alternatives INC. Bolivia.

Elad, Y., Chet, I., Boyle, P. and Henis, Y. 1983. Parasitism of *Trichoderma* spp. on *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii* scanning electron microscopy and fluorescence Microscopy. Phytopathology 73: 85-88.

Esquivel, R. 1992. Algunos deuteromicetos hiperparásitos de *M. fijiensis* Moleret, Panamá. Institutos de Investigaciones Agropecuarias de Panamá. (IDIAP). 12 p.

Fedel, A; Mendoza, A; Cabrera, J.A; Kurtz, A; Schouten, A; Pocasangre, L; Sikora, R.A. 2009. The Burrowing Nematode of Banana: Strategies for Controlling the Uncontrollable Proc. IS on Banana Crop Prot., Sust. Prod. & Impr. Livelihoods Eds.: D. Jones and I. Van den Bergh. Acta Hort. pp 101-108.

Flores, EM; Soto, M; Bolaños, R. 1985. Variación estacional del sistema foliar de cinco clones de banano. Turrialba. Vol. 35, No. 4, pp 339-346.

Fravel, D.R. 1988. Role of Antibiosis in the Biocontrol of Plant Diseases. Annual Review of Phytopathology. Vol. 26: 75-91.

Freeman, S., Minzm O., Kolesnik, I., Barbul, O., Zveibil, A., Maymon, M., Nitzani, Y., Kirshner, B., Rav-David, D., Bilu,A., Dag, A., Shafir, S. and Elad, Y. 2004. *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinerea* and survival in strawberry. Eur. J. Plant Pathol. 110, 361-370.

Fouré, E. 1985. Black leaf streak Disease of bananas and plantains (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet), Study of the symptoms and stages of the disease in Gabón. IRFE, París.

Galvis, J.A. 2004. Aislamiento de microorganismos de la filosfera de musáceas y evaluación de su potencial antagónico contra *Mycosphaerella fijiensis*, en laboratorio. Tesis Ing. Producción Biotecnológica. San José de Cúcuta, Colombia. Universidad Francisco de Paula Santander.

Gams, W; Bissett, J. 1998. Morphology and identification of *Trichoderma*. Volumen 1: *Trichoderma* and *Gliocladium*. pag 3-8.

González, R; Bustamante, E; Shannon, P; Okumoto, S; Leandro, G. 1996a. Selección de microorganismos quitinolíticos en el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Manejo integrado de Plagas 40:6-11.

_____. 1996b. Evaluación de microorganismos quitinolíticos antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis* en casa de mallas y en campo. Manejo Integrado Plagas 40:12-16.

González, R.Q. 1995. Evaluación de microorganismos quitinolíticos en el desarrollo de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Mag. Sci. Thesis, CATIE; Turrialba, Costa Rica.

Grossbarde, E. 1952 . Antibiotic Production by Fungi on Organic Manures and in Soil. *J. gen. Microbiol.* 6, 295-310.

Guijarro, B; Melgarejo, P; Torres, R; Lamarca, N; Usall, J, De Cal, A. 2007. Effects of different biological formulations of *Penicillium frequentans* on Brown root of peaches. *Biological Control.* 42, 86-96.

Gutiérrez, FA. 1996. Estudio de factores en la inducción de resistencia a *Mycosphaerella fijiensis* y promoción de crecimiento en plantas de banano. Tesis de M.Sc., CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Gutiérrez, S; Casqueiro, J; Martín, JF. 2000. Los hongos como factorías celulares: biodiversidad de metabolitos secundarios. *Rev Iberoam Micol* 2000; 17: S54-S60

Guzmán, M. 2003. Epidemiología de la Sigatoka negra y el sistema de preaviso biológico. p 26-27 en Taller INIBAP, Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos.

Guzmán M., A. Jiménez, R. Vargas & R. Romero. 2000. Caracterización de cepas de *M. fijiensis*, causante de la Sigatoka negra, con menor sensibilidad a fungicidas triazoles. P. 64 in Reunión ACORBAT 2000. Memorias.

Guzmán, M; Wang, A; Romero, RA. 2001. Estrategias de aplicación de fungicidas triazoles para el combate de la Sigatoka negra en banano (*Musa AAA*) y su efecto sobre el desarrollo de resistencia en *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *CORBANA* 27(54): 79-104.

Guzmán, M. 2006. Estado actual y perspectivas futuras del manejo de la Sigatoka negra en America Latina. In: XVII Reunión ACORBAT (2006, Joinville, Santa Catarina, BR). Memorias. Joinville, BR. V. 1, 83-91p.

Guzmán, M; Villalta, R. 2006. Aportes de la deshoja sanitaria y prácticas adicionales en el control de la Sigatoka negra en banano (*Musa AAA*). Congreso Internacional Manejo de la Sigatoka negra en banano y plátano en América Latina y el Caribe, San José, Costa Rica. pp 58

Haggag, W.M; Mohamed, H.A. 2007. Biotechnological aspects of microorganisms used in plant biological control. *World Journal of Agricultural Sciences* 3(6):771-776.

Harman, GE. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant disease* 84:377-393.

Harman, G.; Hayes, C.; Lorito, M.; Broadway R.; Di Pietro A.; Peterbauer, C. and Tronsmo, A. 1993. Chitinolytic enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of Chitobiosidae and Endochitinase. *Phytopathology* 83(3):313- 318.

Heslop-Harrison, J; Schwaracher, T. (2007). Domestication, Genomics and Future for Banana. *Annals of Botany* 100: 1073-1084.

Hjeljord y Tronsmo. 1998. *Trichoderma* y *Gliocladium* in biological control: an overview. Volumen 2: *Trichoderma* and *Gliocladium*. Pag131-145.

Huang, C; Wang,T.K; Chung, S.C; Chen, C.Y. 2005. Identification of an Antifungal Chitinase from a Potential Biocontrol. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, Vol. 38(1), pp. 82-88.

Izquierdo, J; Rodríguez, M. 2006. Buenas Prácticas Agrícolas (BPA): En busca de sostenibilidad, competitividad y seguridad alimentaria. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación Oficina Regional de la FAO

para América Latina y el Caribe. Consultado 21 de oct. 2009. Disponible en <http://www.rlc.fao.org/foro/bpa/pdf/infofinal.pdf>

Jackson, A; Walters, D; Marshall, G. 1996. Antagonistic Interactions between the Foliar Pathogen *Botrytis fabae* and isolates of *Penicillium brevicompactum* and *Cladosporium cladosporioides* on Faba beans. *Biological Control*. 8, pp 97-106.

Jiménez, C; Rivero, A; Pocasangre, L; Delgado,E; Rosales, F; González, O; Romero, D. (2008). Efecto de la aplicación de *Trichoderma atroviride* en el control de de Sigatoka negra y sobre el crecimiento de banano. P 23 en: X Reunión Internacional de Trichoderma 2008. Memorias.

Jiménez, J.M; Galindo, J:J; Ramirez, C. 1985. Estudios sobre combate biológico de *Mycosphaerella fijiensis* var. *Diformis* mediante bacterias epífitas. Páginas 105-109 in: Proc. ACORBAT meeting, 7th. J. J. Galindo and R. Jaramillo, eds. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.

Jiménez, M; Arcia, M; Hernández, A; Ramis, C; Méndez, N. (s.f). Caracterización molecular de 12 aislamientos de *Trichoderma* sp. con marcadores RAPD. P 27 en: X Reunion Internacional de Trichoderma 2008. Memorias.

Johnson, K B; DiLeone, J. A. 1999. Effect of Antibiosis on Antagonist Dose-Plant Disease Response Relationships for the Biological Control of Crown Gall of Tomato and Cherry. *Phytopathology* Vol. 89, No. 10, pp 974-980.

Jones, D.R. 2000. Sigatoka. *Diseases of Banana, Abacá and Enset*. CAB Internacional, Wallingford, UK.

Kanapathipillai, V.S; Abdullah, F; Thirumurthy, C.P. 2000. Enumeration of banana phylloplane fungi and distribution on leaves of 3 different ages. Consultado el 4 de febrero del 2009. Disponible en World Wide Web: <http://>

www.musalit.inibap.org/byindex_result.php?land=es&index=nocon&idselect=326&page=1

Khan, A; Williams, K; Nevalainen, E. 2006. Control of plant-parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum* in pot trials. *BioControl* 51:643–658.

Kiewnick, S; Sikora, R.A. 2006. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* by *Paecilomyces lilacinus* strain 251. *Biological Control* 38, pp 179–187.

Kitume, K. 2002. Estrategias para el manejo integrado de la producción platanera y control de la Sigatoka negra en la República Democrática de Congo. *INFOMUSA* 11(1): 3-7.

Laprade, S. 2002. Adopción de las buenas prácticas agrícolas (BPA: EUREP-GAP 2001) en el cultivo del banano: el papel de CORBANA, S.A. *Revista CORBANA* 28(55): 111-118.

Latha, J; Verma, A; Mukherjee, P. 2002. PCR-fingerprinting of some *Trichoderma* isolates from two Indian type cultures collections- a need for re-identification of these economically important fungi. *Current science* 83(4): 372-374.

Lorenzo, CD; Prendes, C; Rodríguez, MA; Blesa, AC. 1978. Contribución al estudio de la platánea canaria estomas y su distribución en la epidermis foliar. *Anat. Y Fisiol.* 37(11-12): 1131-1144.

Lorito, M.; Harman, G.; Hayes, C.; Broadway, R.; Tronsmo, A.; Woo, S. and Di Pietro, A. 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum*: Antifungal activity of purified Endochitinase and Chitobiosdase. *Phytopathology* 83(3):302-307.

Losgen, S; Magull, J; Schulz, B; Draeger, S; Zeeck, A. 2008. Isofusidienols: Novel Chromone-3-oxepines Produced by the endophytic fungus *Chalara* sp. *Eur. J. Org. Chem.* Pp 698-703.

Ma, Y; Chang, Z; Zhao, J; Zhou, M. 2008. Antifungal activity of *Penicillium striatisporum* Pst10 and its biocontrol effect on *Phytophthora* root rot of chilli pepper. *Biological Control*. 44, 24-31.

Malvárez, G; Rodríguez, A; Aguilar, C; Silvera, E; Mondino, P. 2001. Identificación de especies de *Monilinia spp.* en aislamientos obtenidos de *Prunus spp.* por PCR con *primers* específicos. *Agrociencia* 5(1): 48-53.

Manzo, G. (2001). Diversidad genética de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en plátano enano gigante (*Musa acuminata* AAA) cultivado con diferente manejo. *Mag. Sci. Tesis*, Universidad de Colima, México.

Marín, DH; Romero, R.A. 1992. El combate de la Sigatoka negra. Boletín No. 4, Departamento de Investigaciones, Corporación Bananera Nacional, Costa Rica.

Marín, DH; Romero, RA; Guzmán, M; Sutton, TB. 2003. Black Sigatoka an increasing treat to banana cultivation. *Plant Disease* 87(3): 208-222.

Martínez, I; Guzmán, M. 2005. Programa de servicios del laboratorio de Fitopatología. Pag. 75-85. In Informe Anual 2005. Dirección de investigaciones, Corporación Bananera Nacional (CORBANA S.A). San José, Costa Rica.

Mauch, F.,B; Mauch, M; Boller, T. 1988. Antifungal hidrolases in pea tissue. II Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and b-1,3 gluconase, *Plant Physiol*; 88 (3) 936-942.

Mendoza, A.R; Sikora, R.A; Kiewnick, S. 2007. Influence of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 on the biological control of the burrowing nematode *Radopholus similis* in banana. 2 *NEMATROPICA* Vol. 37 (2): 203-213.

Mercier, J; Jiménez, J. 2003. Control of fungal decay of apples and peaches by the biofumigant fungus *Muscodor albus*. *Postharvest Biology and Technology*. 31. 1-8.

Mercado, S; Mora, I. 1990. Aislamiento de fitoalexinas en banana (*Musa paradisiaca*) atacado por Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* var, *difformis*). Informe UPEB 15(93): 31-45.

Meredith, DS; Lawrence, JS. 1969. Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial states of causal fungus. Transaction British Mycological Society 52(3): 459-476.

Michel, A.C; Otero, M.A; Rebolledo, O; Lezama, R; Ochoa, M.E. 2005. Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp, en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium oxysporum in vitro*. Revista Chapingo Serie Horticultura 11 (2): 273-278

Mihuta-Grimm, L. and Rowe, C. 1986. *Trichoderma* spp. as biocontrol agents of *Rhizoctonia* damping-off of radish in organic soil and comparison of four delivery systems. Phytopathology 76(3):306-312.

Miranda, J.E. 1996. Evaluación de microorganismos antagonistas al hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, colocados en el interior y exterior de la planta de banano. Mag. Sci. Tesis, CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Molina, G; Zaldúa, S; González, G; Sanfuentes, E. 2006. Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. Bosque 27(2):126-134.

Montealegre, J., y Henríquez, J. 1990. Posibilidades de control integrado de *Sclerotium rolfsii* Sacc. Mediante hongos del género *Trichoderma* y fungicidas. Fitopatología 25(2):68-74.

Mourichon, X; Carlier, J; Fouré, E. 1997. Enfermedades de Sigatoka: Raya negra de la hoja (Sigatoka negra) Enfermedad de Sigatoka (Sigatoka amarilla). Hoja divulgativa N°8, PROMUSA.

Murillo, G; Guzmán, M. 2005. Programa de asistencia técnica en el manejo de la Sigatoka negra. Pag. 86-89. En Informe Anual 2005. Dirección de investigaciones, Corporación Bananera Nacional (CORBANA S.A). San José, Costa Rica.

Murillo, G; Guzmán, M. 2007. Programa de asistencia técnica en el manejo de la Sigatoka negra. Pag. 123-126. En Informe Anual 2005. Dirección de investigaciones, Corporación Bananera Nacional (CORBANA S.A). San José, Costa Rica.

Navarro, M; Manker, D; Edgecomb, D. 2004. Serenade® (*Bacillus subtilis* capa QST 713) fungicida biológico, una nueva alternativa en el manejo integrado de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*). Pag 192-200 en: Proc. ACORBAT meetin, XVI th. J.O Romero, M. O. Santos, R.Z. Altamirano y otros, eds. Oaxaca, Mexico.

Ochoa, M. 2002. Antibiosis y micoparasitismo de cepas nativas de *Trichoderma* spp. (Hyphomycetes: Hyphales) sobre *Mycosphaerella fijiensis* (Loculoascomyles: Dothideales). Mag. Sci. Tesis, Universidad de Colima, México.

Osorio, G.P. 2006. Evaluación de hongos endofíticos y extarctos botánicos para el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banano. Mag. Sci. Thesis, CATIE; Turrialba, Costa Rica.

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. 2002. Las buenas prácticas agrícolas. Consultado 21 de oct. 2009. Disponible en <http://www.fao.org/ag/esp/revista/faogapes>.

Orozco, S.M; Farias, Larias; G. Manzo, S; Guzmán, S. 2001. La Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en México. INIBAP. INFOMUSA. Vol. 10 (1):33-37.

Orozco-Santos, M; Orozco-Romero, J; Velazquez-Monreal, J; Robles-González, M. 2006. Prácticas culturales para el manejo de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano (*Musa AAA*). Congreso Internacional Manejo

de la Sigatoka negra en banano y plátano en América Latina y el Caribe, San José, Costa Rica. pp 56.

Ortiz, R; López, A; Ponchner, S; Segura, A. 2001. El cultivo del banano. EUNED. San José, Costa Rica.

Okumoto, S; Bustamante, E; Gamboa, A. 2001. Actividad de cepas de bacterias quitinolíticas antagonistas a *Alternaria solani* in vitro. Manejo Integrado de Plagas 59: 58 - 62p.

Papavizas, G.C. 1985. Trichoderma and Gliocladium: Biology, ecology, and potential for biocontrol. Annu. Rev. Phytopathol. 23, 23-54p.

Patiño, L; Salazar, L.M; Collazos, J.C; Piedrahita, R.A; Bustamante, E. 2006. Bacterias líticas y sustratos en la filosfera de banano y plátano para el control de Sigatoka negra. En Memorias XVII Reunión Internacional ACORBAT, Joinville-Catarina, Brasil. 15 al 20 Oct de 2006.

Pérez, L; Álvarez, JM; Pérez, M. 2003. Sigatoka negra causada por *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en Cuba: Impacto económico, resistencia de los clones y manejo de la enfermedad. Fitosanidad 7(1): 31-41.

Pontón, J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la Anidulafungina . Rev Iberoam. 25: 78-82.

Pocasangre, L; Sikora, R.A; Vilich, V; Schuster, R. 2000. Survey of banana endophytic fungi from central america and screening for biological control of *Radopholus similis*. Proc 2nd Conf. (Sub)trop. Fruits. Eds. M. Blanke y J. Pohlen. pp 283-289.

Pusey, P.L. 1989. Use of *Bacillus subtilis* and related organisms as Biofungicides. Pestic. Sci. 27: 133-140.

Quiroz, V.F; Ferrera, R; Alarcón, A; Lara, M.E. 2008. Antagonismo in vitro de cepas de *Aspergillus* y *Trichoderma* hacia hongos filamentosos que afectan al cultivo del ajo. Revista Mexicana de Micología. Volumen 26: 27-34.

Ramos, B.A. 2002. Uso de extractos de compost como una alternativa biológica para el control de *Mycosphaerella fijiensis* en la producción de banano orgánico. Zamorano. Tesis de Licenciatura. Honduras.

Reilly, H.C; Schats, A; Waksman, S.A. 1945. Antifungal properties of antibiotic substances. New Jersey Agricultural Experiment Station, Rutgers University, New Brunswick, N. J. 585-595p.

Rivas-Platero, G.G; Zapater, M; Abadie, C; Carlier, J. 2003. Genética de poblaciones de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra de las musáceas en los trópicos. Memorias Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos, INIBAP-MUSALAC. Ecuador.

Riveros, A.S; Arciniegas, A.M. 2003. Productos naturales como biofungicidas e inductores de Resistencia para el manejo de la Sigatoka negra. Actas del Taller “Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas”. Guayaquil, Ecuador.

Riveros, A.S; Giraldo, C.I; Gamboa, A. 2003. Microbiological control of black leaf streak disease. En: Jacome, L. (e.d) and al. *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and Outlook. Proceedings of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases. San Jose, Costa Rica, 2002/05/20-23. Montpellier (FRA): INIBAP, 317 p.

Riveros, AS; Larco, E; Polanco, D; Rosales, F; Pocasangre, LE. 2006. Evaluación preliminar de la aplicación de lixiviados de compost y vermicompost sobre el desarrollo de la Sigatoka negra en plátano (*Musa* AAB). En: CORBANA-INIBA-MUSALAC. Manejo de la Sigatoka negra en banano y plátano en América Latina y el Caribe. Resúmenes, Congreso Internacional, San, José, Costa Rica, 21-23 de Marzo. pp.30.

Robinson, J.C. 1996. Bananas and Plantains. Wallingford, South Africa. CAB International. 8 p.

Rodríguez, O.L. 1995. Antagonismo endofítico de microorganismos a *Mycosphaerella fijiensis* del plátano y *Alternaria solani* del tomate. Mag. Sci. Tesis, CATIE; Turrialba, Costa Rica.

Romero, R. 1997. Avances en epidemiología y manejo de la Sigatoka negra del banano. *Agronomía Costarricense* 21(1): 77-81.

Romero, RA; Guzmán, M. 2006. Efectos de la enfermedad de la Sigatoka negra en la producción y la Calidad. Congreso Internacional Manejo de la Sigatoka negra en banano y plátano en América Latina y el Caribe, San José, Costa Rica. pp 18.

Romero, R. 2006. Caracterización y manejo de la resistencia a fungicidas en *Mycosphaerella fijiensis* en bananos. In: XVII Reunión ACORBAT (2006, Joinville, Santa Catarina, BR). Memorias. Joinville, BR. V. 1, 92-99p.

Ruiz-Silvera, C; Bustamante, E; Jiménez, F; Saunders, J; Okumoto, S; González, R. 1997. Sustratos y bacterias antagonistas para el manejo de *Mycosphaerella fijiensis* en banano. *Manejo Integrado de Plagas* 40:9-17.

Ruiz-Silvera, C. 1995. Efecto de sustratos sobre bacterias antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis* en banano. Mag. Sci. Tesis, CATIE; Turrialba, Costa Rica.

Sabuquillo, P; De Cal, A; Melgarejo, P. 2006. Biocontrol of tomato wilt by *Penicillium oxalicum* formulations in different crop conditions. *Biological Control*. 37, 256-265.

Salas, E; Vargas, R. 2006. Descripción de la reproducción masiva de *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma spp*; *Metarhizium spp* y *Candelabrella spp*. Colectados de fincas bananeras localizadas en el caribe de Costa Rica. En: pag 47-49. Informe Anual 2006. Dirección de Investigaciones CORBANA. San Jose, Costa Rica.

Sánchez, R; Algora, J.A; Vallin, C; Pérez, M.C; Iznaga, F; Malpartida, F. 2002. Efecto del fungicida natural F20 contra la enfermedad Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plátano (AAB) y banano (AAA). INIBAP. INFOMUSA 11(1):14-16.

Sauma, J. 2008. El bananero: 2007 cosecha de un esfuerzo conjunto. CORBANA. San José, Costa Rica.

Sastoque, L; Mercado, M; Martínez, M.M; Quevedo, B. 2007. Producción de quitinasas extracelulares con una cepa alcalófila halotolerante de *Streptomyces* sp. aislada de residuos de camarón. Revista Mexicana de Ingeniería química 6 (002): 137-146.

Sikora, R; Pocasangre, L; Felde, A; Niere, B; Vu, T; Dababat, A.A. 2008. Mutualistic endophytic fungi and in-plant suppressiveness to plant parasitic nematodes. Biological Control. 47, 15-23.

Smith, D; Onions, A. 1994. The preservation and maintenance of living fungi. 2da edición. Internacional Mycological Institute. UK.

Stefanova, M; Leiva, A; Larrinaga, L; Coronado; M. F. 1999. Actividad metabólica de cepas de *Trichoderma spp* para el control de hongos fitopatógenos del suelo. Rev. Fac. Agron.16: 509-516.

Stefanova, M. s.f. Producción y aplicación de *Trichoderma spp.* como antagonista de hongos fitopatógenos. INISAV. Ciudad de la Habana, Cuba.

Soto, L. 2008. Evaluación de Bioles Inoculados con Microorganismos Naturalmente Antagónicos, para el Manejo Biológico de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Tesis de Licenciatura. Universidad EARTH. Guácimo, Limón, Costa Rica.

Soto, M. 1992. BANANOS: Cultivo y Comercialización. 2ed. San José, Costa Rica. Litografía e imprenta LIL, S.A. 21p.

- Stockwell, V.O, Johnson, K. B.; Sugar, D., Loper, J. E. 2002. Antibiosis Contributes to Biological Control of Fire Blight by *Pantoea agglomerans* Strain Eh252 in Orchards. *Phytopathology*, Vol. 92, No. 11.pp 1202-1209.
- Stover, RH. 1980. Sigatoka leaf spot of bananas and plantains. *Plant Dis.* 64: 750-756.
- Stover, RH; Dickson, JD. 1976. Banana leaf spot caused by *Mycosphaerella musicola* and *M. fijiensis* var. *difformis*: a comparison of the first Central American epidemics. *FAO Plant Protection. Bulletin* 24: 36-42.
- Stover, RH. 1980. Sigatoka leaf spot of banana and plantains. *Plant Diseases.* 64: 750-756.
- Stover, R.H. & Simmonds N.W. 1987. *Bananas*. Willey & Sons, New York.
- Sutton, J; Li, D; Peng, G; Yu, H; Zhang, P. 1997. *Gliocladium roseum* a versatile adversary of *Botrytis cinerea* in crops. *Plant Disease / Vol.* 81 No. 4, pp 319-329.
- Tarabily, K. A; Soliman M. H; Nassar, A. H; Al-Hassani, H. A; Sivasithamparam, K.; McKenna, F; Hardy, G. E. 2000. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes *Plant Pathology* 49, pp. 573-583.
- Trigos, A; Mendoza, G; Luna, M, Heredia, G; Arias, RM. 2005. Evaluación antibacteriana de hongos microscópicos del suelo y restos vegetales. *Revista Mexicana de Micología* 20: 89-92
- Urdaneta, G; Delgado, A; Sosa, L; Piñeiro, A. 2002. Microbiota del floplano en platano Harton (*Musa AAB*), en el municipio Francisco Javier Pulgar del estado de Zulia, Venezuela. *Rev. Fac. Agron.* 19 (2): 95-108.
- Vargas, V; Wang, A. 1999. *Gliocladium roseum*: una opción de antagonismo contra hongos fitopatógenos. Resumen 53. XI congreso Nacional Agronómico / IV congreso Nacional de Fitopatología. San José, Costa Rica.

Vega, J.M. 1996. Control biológico de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*), mediante la utilización de *Serratia marcescens*. Tesis de Licenciatura. Ing. Agr. Escuela de Agricultura de la Región Tropical Húmeda, Guácimo, Limón.

Villalta, R; Guzmán, M. 2006. Evaluación de una formulación de *Bacillus subtilis* para el control biológico de la Sigatoka negra en banano (Musa AAA, CV. Grande Naine). En: CORBANA-INIBA-MUSALAC. Manejo de la Sigatoka negra en banano y plátano en América Latina y el Caribe. Resúmenes, Congreso Internacional, San, José, Costa Rica, 21-23 de Marzo. pp.30.

Villalta, R; Guzmán, M. 2008. Evaluación de Microorganismos Eficientes y *Trichoderma* como agentes de control biológico de la Sigatoka negra en banana (Musa AAA). Pag. 207-211. En Informe Anual 2008. Dirección de investigaciones, Corporación Bananera Nacional (CORBANA S.A). San José, Costa Rica.

Wilkins, W. H.; y Harris, G. 1944 Investigation into the production of bacteriostatic substances by fungi. Preliminary examination of a fourth 100 species, all penicillia. Brit. J. Exptl. Path., 25, 135-137.

Windham, M; Elad, Y; Baker, R. 1986. A mechanism for increased plant grow induced by *Trichoderma* spp. Phytopathology 76:518-521.

Zhang, Z; Yuen, G. 2000. The Role of Chitinase Production by *Stenotrophomonas maltophilia* Strain C3 in Biological Control of *Bipolaris sorokiniana*. Phytopathology. Vol. 90, No. 4, pp. 384-389.

Zuluaga, C; Patiño, L.F; Collazos, J.C. 2007. Integración de inducción de resistencia con bacterias quitinolíticas en el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banano. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín.Vol.60(2): 3891-3905.

10. ANEXOS

Anexo 1. Metodología para obtener quitina coloidal a partir de caparazones de camarones (Salazar y Okumoto)

1. Sumergir los caparazones en una solución de NaOH al 10% durante un periodo de 12 a 24 horas.
2. Secar a un horno a 70 °C.
3. Colocar 800 g en un recipiente con 5 litros de NaOH y HCl a una concentración normal por periodos de cuatro horas en forma alterna.
4. Reducir el volumen a 4 litros y continuar la limpieza de material por 24 horas.
5. Lavar tres veces con alcohol al 95% a intervalos de 15 minutos, agitando y restregando bien antes de cada cambio.
6. Después de decantado el último volumen de alcohol, trasladar al horno para el secado.
7. Pesar 200 g de material seco, añadir 2.66 litros de HCl a una concentración de 36 y 38%, agitar bien cuidadosamente hasta que el material este bien mojado y tenga un aspecto gelatinoso de color oscuro.
8. Agregar agua destilada hasta completar 8 litros aproximadamente, agitar fuertemente varias veces, y dejar en reposo durante doce horas.
9. Si hay separación de fases, decantar el sobrenadante cuidadosamente de no perder el precipitado. En el caso de que esto se dificulte, se puede usar una cámara de vacío accionada por agua acoplada a una manguera provista de un tubo de vidrio o plástico con el extremo en forma de U de tal forma que permita la succión de líquido de arriba hacia abajo para evitar el arrastre del precipitado.
10. En caso que no haya separación de fases, proceder en forma similar al procedimiento usado para la eliminación de sobrenadante.
11. Colocar 200 ml de suspensión en tubos de centrifugas y pesarlos para evitar el riesgo de pérdida del material y deterioro del equipo.
12. Centrifugar a 2600 RPM durante 10 minutos.

13. Decantar el sobrenadante y agregar aproximadamente 100-150 ml de agua destilada según el volumen del precipitado y agitar fuertemente.
14. Pesar otra vez y centrifugar. Esto se repite tres veces a intervalos de 5 minutos.
15. Recoger el material decantado en botellas para recuperar parte de la suspensión.
16. Después del tercer lavado, medir el pH para corregirlo y dejarlo en valores mayores de 2.
17. Suspende el precipitado de los tubos usando una mínima cantidad de agua destilada y licuarlo bien durante 30 segundos.
18. Colocar la suspensión en frascos y guardarlos bajo refrigeración a 4 °C.

Anexo 2. Protocolo de extracción de ADN utilizado en el Laboratorio de Biología Molecular de CORBANA S.A.

1. Colocar 500 μ l en un tubo para microcentrífuga de 1,5 ml y agregar 500 μ l de buffer de extracción.
2. Macerar por 3 minutos a una frecuencia de 25 l/s, con 2 balines, luego agitar en vortex.
3. Adicionar 2 μ l de mercaptoetanol mas 200 μ l SDS 20%, agitar en vortex.
4. Digerir en baño maría a 65°C, por 2 horas, sacar a la hora y macerar nuevamente por 3 minutos.
5. Agregar 500 μ l de FCI (Fenol/Cloroformo/Isoamil-Alcohol), (25:24:1), agitar en vortex.
6. Centrifugar a 6000 rpm por 5 minutos, recuperar el sobrenadante en un tubo limpio.
7. Agregar una pizca de carbón activado, agitar en vortex.
8. Centrifugar a 6000 rpm por 5 minutos, recuperar el sobrenadante en un tubo limpio. Agregar un volumen igual de Isopropanol, dejar precipitar a 4°C toda la noche.
9. Centrifugar a 13500 rpm por 10 minutos, eliminar el isopropanol invirtiendo el tubo, dejar secar por un minuto en una toalla. Agregar alcohol 70%.
10. Repetir paso 10.
11. Resuspender ADN en 100 μ l de T.E 10%, guardar a -20°C.

Anexo 3. Análisis de varianza para la evaluación de la actividad *in vitro* de los diferentes metabolitos de los aislamientos seleccionados.

Fuente de variación	GL	CM	Valor de F	P > F
Esporas No germinadas (NG)				
Tratamiento	146	3,32	18,56	<0,0001
Bloque	4	0,25	1,44	0,2193
Extracción	1	22,10	123,31	<0,0001
Trat x Extrac	146	3,19	17,80	<0,0001
Esporas con germinación normal (GN)				
Tratamiento	146	49,29	11,27	<0,0001
Bloque	4	8,49	1,94	0,1012
Extracción	1	31,04	7,10	0,0078
Trat x Extrac	146	47,58	10,88	<0,0001
Esporas con tubos cortos o distorsionados (C y D)				
Tratamiento	146	49,11	38,69	<0,0001
Bloque	4	1,80	1,48	0,2055
Extracción	1	128,10	100,91	<0,0001
Trat x Extrac	146	23,12	18,22	<0,0001
Esporas con tubos ramificados (R)				
Tratamiento	146	64,51	14,57	<0,0001
Bloque	4	5,13	1,16	0,3270
Extracción	1	50,78	11,47	0,0007
Trat x Extrac	146	46,35	10,47	<0,0001
Esporas NG + C y D				
Tratamiento	146	52,31	41,62	<0,0001
Bloque	4	2,23	1,78	0,2055
Extracción	1	184,07	146,47	<0,0001
Trat x Extrac	146	26,16	20,82	<0,0001

Anexo 4. Ordenamiento de los 25 aislamientos que produjeron los metabolitos más activos *in vitro* (esporas no germinadas + esporas con tubos cortos ≥ 50 %) sobre la germinación de ascosporas de *M. fijiensis*.

Tratamiento	Filtrado	Tratamiento	Autoclavado
SC-03	100,0 a	VEQ-04	82,8 a
LR-12	100,0 a	LRQ-01	82,8 a
VE-05	100,0 a	LVQ-03	82,4 a
SC-19	100,0 a	LRQ-13	79,2 a
T-06	100,0a	LRQ-02	77,6 ab
VMQ-02	100,0 a	LV-06	76,8 ab
SCQ-07	100,0 a	LVQ-01	70,4 abc
LVQ-02	98,0 a	LR-11	66,4 bc
SCQ-03	98,0 a	LR-10	62,0 cd
LVQ-01	90,0 ab	LRQ-03	60,4 cd
LRQ-04	88,4 ab	LRQ-07	60,0 cd
LV-06	88,4 ab	LR-03	53,0 de
SPQ-07	80,0 bc	LR-12	47,6 ef
LRQ-15	79,2 bc	VEQ-11	43,2 efg
VE-02	74,0 bcd	LR-01	38,0 fgh
HRP-01	74,0 bcd	LRQ-04	36,0 fgh
LRQ-17	68,8 cd	LR-16	31,6 ghi
LR-15	66,8 cd	LRQ-17	30,4 hi
LRQ-08	62,4 de	VEQ-01	20,8 ij
SCQ-11	61,2 de	LRQ-12	19,6 ijk
LR-01	51,2 ef	LRQ-08	19,2 ijk
LRQ-02	48,0 ef	LRQ-05	19,2 ijk
LRQ-06	42,0 fg	VMQ-03	16,8 jkl
SCQ-02	38,0 gh	SPQ-06	16,0 jkl
SPQ-06	30,0 ghi	LR-15	15,2 jklm
Testigo	0,0	Testigo	0,0

Para efectos de análisis estadístico los valores fueron transformados por raíz cuadrada del valor + 1.

Anexo 5. Análisis de varianza para la evaluación de la actividad *in vivo* de los metabolitos secundarios evaluados en invernadero.

Fuente de variación	GL	CM	Valor de F	P> F
Tratamiento	8	12,03	3,38	0,0025
Bloque	4	6,62	1,86	0,1278
Aplicación¹	1	88,94	24,97	<0,0001
Trat x Aplicación	8	5,04	1,42	0,2058

1/ Momento de la aplicación de los tratamientos después de inoculado el patógeno (24 horas o 96 horas).