INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

Icafe
Instituto del Café de Costa Rica

CICAFE- ICAFE

"AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ENDÓFITOS Y EPÍFITOS EN HOJAS DE CAFÉ COLECTADAS EN DOS ZONAS DE COSTA RICA Y SU POSIBLE EMPLEO COMO BIOCONTROLADORES DE *Mycena citricolor*"

Tesis para optar por el título de
Ingeniero en Biotecnología con el grado
académico de Bachiller

Adrián Salas Bastos

CARTAGO, 2010

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE ENDÓFITOS Y EPÍFITOS EN HOJAS DE CAFÉ COLECTADAS EN DOS ZONAS DE COSTA RICA Y SU POSIBLE EMPLEO COMO BIOCONTROLADORES DE *Mycena citricolor*

Adrián Salas Bastos[đ]

RESUMEN

Se aisló microorganismos epífitos y endófitos a partir de muestras de hojas de plantas de café sintomáticas y asintomáticas de "Ojo de gallo" de la finca La Rosalia ubicada en San Juan Norte de Poás de Alajuela de Costa Rica, y de plantas de café sintomáticas y asintomáticas de "Crespera" de la finca Málaga ubicada en San Gabriel de Aserrí de San José de Costa Rica. Los epífitos se obtuvieron mediante lavado de las muestras en Buffer de Fosfato con agitación manual por tres minutos y plaqueo de diluciones (concentrada, 10^{-1} y 10^{-2}) sobre medio PDA. Para los endófitos las muestras se desinfectaron superficialmente (alcohol al 70% 2 minutos, hipoclorito de sodio al 3,5% i.a 2 minutos y dos lavados con agua destilada autoclavada 1 minuto cada uno), se maceraron en solución de buffer PBS 1X y se plaqueó diluciones (concentrada, 10^{-1} y 10^{-2}) sobre medio PDA. Las placas se incubaron a 21º C bajo condiciones de luz ambiental por 4 semanas durante las cuales se aisló y purificó los microorganismos. La identificación bacteriana se llevó a cabo mediante los sistemas BIOLOG® y VITEK®. Los aislamientos fúngicos se identificaron mediante la presencia de estructuras reproductivas. Las colecciones de microorganismos obtenidas se ensayaron para probar su potencial antagónico contra la cepa My1 de *Mycena citricolor* sobre medio PDA mediante cultivo dual en placa, incubando las placas a 21º C, bajo condiciones de luz ambiental por 15 días.

En la finca con sintomatología de "Ojo de gallo" las bacterias epífitas más abundantes fueron *Chryseobacterium sp.* para muestras de plantas sintomáticas, y *Bacillus amyloliquefaciens* y *Chryseobacterium sp* para plantas asintomáticas, mientras que *Bacillus amyloliquefaciens* junto a *Ralstonia sp*., y *Raoutella terrigena* junto a *Ralstonia sp.* fueron las bacterias endófitas más representativas en plantas asintomáticas y sintomáticas respectivamente. Para la finca con sintomatología de "Crespera" las bacterias epífitas más frecuentes correspondieron a *Enterobacter cloacae* para plantas asintomáticas y a *Ralstonia sp.* y *Enterobacter cloacae* para muestras sintomáticas, mientras que solo se obtuvo bacterias endófitas a partir de plantas sintomáticas correspondiendo los aislados a *Tsukamurella inchonensis* y *Staphylococcus sp*. En ambas localidades los aislados fúngicos estuvieron representados por el género *Cladosporium* y una gran cantidad de hongos no esporulados. Las diferencias en la cantidad y diversidad de los aislados tanto epífitos como endófitos entre las dos zonas de muestreo evidencian la influencia de factores ambientales locales sobre las microfloras presentes en las hojas. De los 59 aislados (hongos, levaduras y bacterias) ensayados *in vitro* contra *M.citricolor* cepa My1 solo el de ID B10, correspondiente a una bacteria, presentó un efecto inhibitorio significativo del crecimiento de dicho hongo. El método de cultivo dual en placa y el período de incubación por 15 días resultaron efectivos para la observación de potencial antagónico de los aislados así como para el descarte de aislados con un efecto inhibitorio temporal.

Palabras clave: epífitos, endófitos, Ojo de gallo, Crespera, *Mycena*, biocontrol, antagonismo.

[đ] INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2010.

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF ENDOPHYTES AND EPIPHYTES IN COFFEE LEAVES COLLECTED IN TWO ZONES FROM COSTA RICA AND ITS POSSIBLE USE AS BIOCONTROL AGENTS AGAINST *Mycena citricolor*

Adrián Salas Bastos[đ]

ABSTRACT

Epiphytes and endophytes were isolated from leaves of symptomatic and asymptomatic "Coffee Leaf Spot" coffee plants from "La Rosalia" cultivated ground area located in San Juan Norte, Poás, Alajuela, Costa Rica, and from leaves of symptomatic and asymptomatic "Coffee Leaf Scorch" coffee plants from "Málaga" cultivated ground area located in San Gabriel, Aserrí, San José, Costa Rica. Epiphytes were isolated by washing the samples in Phosphate Buffer with manual shaking for 3 minutes and platting dilutions (concentrated, 10^{-1} and 10^{-2}) on PDA medium. Endophytes isolation was carried out by superficial disinfection of the samples (alcohol 70% 2 minutes, Sodium hypochlorite 3, 5% i.a 2 minutes and two washes with autoclaved distilled water 1 minute each one), followed of maceration of the samples in PBS 1X Buffer and platting dilutions (concentrated, 10^{-1} and 10^{-2}) on PDA medium. All the plates were incubated at 21º C under environmental light conditions by 4 weeks and the emerging microorganisms were isolated and purified. The BIOLOG® system and the VITEK® system were performed to bacteria's identification. Fungi identity was determinate with reproduction structure guides. The microorganism's collections obtained were assayed for their antagonistic potential against *Mycena citricolor* strain My1 on PDA medium by dual culture incubating the plates at 21º C, under environmental light conditions for 15 days.

For the cultivated ground area affected by "Coffee Leaf Spot" the most frequent epiphytic bacteria for symptomatic plants was *Chryseobacterium sp.* and for asymptomatic plants were *Bacillus amyloliquefaciens* and *Chryseobacterium sp.*, whereas *Bacillus amyloliquefaciens* and *Ralstonia sp*., and *Raoutella terrigena* and *Ralstonia sp*. were the most representative endophytic bacteria for asymptomatic and symptomatic plants respectively. In the case of the cultivated ground area affected by "Coffee Leaf Scorch" the most frequent epiphytic bacteria for asymptomatic plants was *Enterobacter cloacae* and for symptomatic plants were *Ralstonia sp.* and *Enterobacter cloacae*, whereas endophytic bacteria only could be isolated from symptomatic plants being represented by *Tsukamurella inchonensis* and *Staphylococcus sp .*isolates. For the two sampled locations the isolated fungi were represented by the genus *Cladosporium* and several no sporulating fungi. The differences in quantity and diversity of both epiphytic and endophytic isolates among the two sampled sites demonstrates the local environmental factor's influence over the leaf microfloras. From the 59 isolates (fungi, yeast and bacteria) assayed under *in vitro* conditions against *M.citricolor* strain My1 only the isolate ID B10, corresponding to bacteria, showed a significant inhibitory effect over the fungi's growth. The dual culture method and the 15 days incubation period showed effectiveness for observing antagonistic potential and for discarding isolates with temporal inhibitory effect.

Keywords: epiphytes, endophytes, Coffee Leaf Spot, Coffee Leaf Scorch, *Mycena*, biocontrol, antagonism.

[đ] INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2010.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE ENDÓFITOS Y EPÍFITOS EN HOJAS DE CAFÉ COLECTADAS EN DOS ZONAS DE COSTA RICA Y SU POSIBLE EMPLEO COMO BIOCONTROLADORES DE *Mycena citricolor*

Informe presentado a la Escuela de Biología del

Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial

para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.

Miembros del Tribunal

M.Sc. Vladimir Villalba Velásquez
Profesor Asesor-ITCR

M.Sc. Miguel Barquero Miranda
Asesor- Empresa

Bach. Randall Chacón Cerdas
Lector

DEDICATORIA

A DIOS, a la VIRGEN, a mis
padres y hermanas que
son mi vida y mí
estímulo para
seguir adelante.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea dejar constancia de su agradecimiento a los siguientes organismos y personas, por su colaboración en el presente trabajo:

A la empresa CICAFE por abrirme las puertas y facilitarme el espacio y financiamiento que hicieron posible la realización de este trabajo.

Al M. Sc. Miguel Barquero por su apoyo, ayuda, comprensión y guía durante el desarrollo de este trabajo de investigación.

A los Ingenieros Sebastian Fournier, Javier Morales, Alejandra Robles y Noel Arrieta por su valiosa ayuda en aspectos técnicos y de otras índoles durante la realización del trabajo de laboratorio.

Al personal de los laboratorios de Producción de Entomopatógenos y Química del CICAFE, así como al personal administrativo que me brindó su colaboración de una u otra manera en el tiempo que estuve en la empresa desarrollando este trabajo.

A la Dra. Lidieth Uribe directora del Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica y al M. Sc. Norman Rojas Calvo Coordinador de la Sección de Bacteriología de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica por su ayuda en la identificación bacteriana y en aspectos técnicos del trabajo.

Al profesor M. Sc. Vladimir Villalba por su ayuda y consejo en mi formación académica, y muy especialmente por su amistad y su confianza en mi capacidad, las cuales marcaron indudablemente mi formación personal y profesional.

Al Ing. Randall Chacón lector de este proyecto quién aparte de ser un buen amigo resultó un muy buen guía y consejero durante la ejecución de este trabajo.

Al personal de la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica que me brindaron su apoyo, ayuda y amistad durante la carrera.

Y de todo corazón a DIOS todopoderoso y a la VIRGEN a quienes debo todo lo que soy; a mis padres Rodrigo Salas G y Elizabeth Bastos V y a mis hermanas Karen, Natalia y Jessica Salas B por su amor, apoyo, consejos y confianza, y a mis familiares y amigos por darme su cariño y ayuda incondicional. A todos muchas gracias porque de una u otra forma dejaron su huella en mi formación personal y profesional.

INDICE GENERAL

RESUMEN 1
ABSTRACT 2
ACREDITACIÓN 3
DEDICATORIA 4
AGRADECIMIENTOS 5
INDICE GENERAL 6
ÍNDICE DE CUADROS 9
ÍNDICE DE FIGURAS 10
ÍNDICE DE APÉNDICES 12
ÍNDICE DE ANEXOS 12
INTRODUCCIÓN 13
REVISIÓN DE LITERATURA 15
Breve panorámica del cultivo del café 15
Enfermedades del cultivo del café 15
Enfermedad de "Ojo de Gallo del café" 17
Enfermedad de "Crespera del café" 18
Métodos de identificación Bacteriana 19
A- Identificación de desconocidos bacterianos mediante sistema BIOLOG® 19
B- Identificación de desconocidos bacterianos mediante sistema VITEK® 21
Microorganismos epífitos y endófitos 22
Biocontrol de enfermedades 23
OBJETIVOS 25
Objetivo General 25
Objetivos Específicos 25
METODOLOGÍA 26
1. Identificación de microorganismos epífitos y endófitos en plantas sintomáticas y asintomáticas de "Ojo de Gallo" y de "Crespera" 26

1.1. Locación y Época de estudio 26
1.2. Muestreo del material de campo para el aislamiento de microorganismos epífitos y endófitos. 26
1.3. Obtención de microorganismos epífitos a partir del material colectado en campo 27
1.4. Obtención de microorganismos endófitos a partir del material colectado en campo. 28
1.5. Identificación de los microorganismos aislados. 30
A. Aislamientos bacterianos. 30
i. Identificación bioquímica de bacterias gram negativas y gram positivas no esporuladas con ayuda del sistema BIOLOG® 30
ii. Identificación de bacterias gram positivas esporuladas con la ayuda del sistema VITEK® 32
B. Aislamientos fúngicos. 33
2. Pruebas *in vitro* del Potencial Biocontrolador de los microorganismos epífitos y endófitos aislados contra *Mycena citricolor* (Ojo de gallo). 35
2.1. Selección de microorganismos con Potencial Biocontrolador 35
A. Pruebas de antagonismo de los aislamientos bacterianos y levaduriformes 35
B. Pruebas de antagonismo de los aislamientos fúngicos 36
RESULTADOS 37
1. Identificación de microorganismos epífitos y endófitos en plantas sintomáticas y asintomáticas de "Ojo de Gallo" y de "Crespera". 37
1.1 Obtención de microorganismos epífitos a partir del material colectado en campo 37
1.2 Obtención de microorganismos endófitos a partir del material colectado en campo. 42
1.3 Identificación de los microorganismos aislados. 45
A. Aislamientos bacterianos. 45
i. Identificación bioquímica de bacterias gram negativas y gram positivas no esporuladas con ayuda del sistema BIOLOG® 47

ii. Identificación de bacterias gram positivas esporuladas con la ayuda del sistema VITEK® 48
B. Aislamientos fúngicos. 49
2. Pruebas *in vitro* del Potencial Biocontrolador de los microorganismos aislados contra *Mycena citricolor* (Ojo de gallo). 59
2.1 Selección de microorganismos con Potencial Biocontrolador 59
A. Pruebas de antagonismos de los aislamientos bacterianos y levaduriformes 59
B. Pruebas de antagonismos de los aislamientos fúngicos 61
DISCUSIÓN 62
1. Identificación de microorganismos epífitos y endófitos en plantas sintomáticas y asintomáticas de "Ojo de Gallo" y de "Crespera". 62
1.1 Obtención de microorganismos epífitos a partir del material colectado en campo 62
1.2 Obtención de microorganismos endófitos a partir del material colectado en campo 65
1.3 Identificación de los microorganismos aislados 67
A. Aislamientos bacterianos 68
B. Aislamientos fúngicos 72
2. Pruebas in vitro del Potencial Biocontrolador de los microorganismos endófitos y epífitos aislados contra Mycena citricolor (Ojo de gallo). 74
2.1 Selección de microorganismos con Potencial Biocontrolador 74
A. Pruebas de antagonismo de los aislamientos bacterianos y levaduriformes 74
B. Pruebas de antagonismo de los aislamientos fúngicos 76
CONCLUSIONES 77
RECOMENDACIONES 78
BIBLIOGRAFÍA 80
APÉNDICES 92
ANEXOS 113

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Características morfológicas de los aislados bacterianos obtenidos a partir de muestras de Poás y Aserrí. 46
Cuadro 2. Identificación de bacterias aisladas a partir de muestras de la finca con sintomatología de “Ojo de gallo” mediante el sistema BIOLOG y origen de los aislados..... 47
Cuadro 3. Identificación de bacterias aisladas a partir de muestras de la finca con sintomatología de “Crespera” mediante el sistema BIOLOG y origen de los aislados..... 48
Cuadro 4. Identificación de bacterias aisladas a partir de muestras de la finca con sintomatología de “Ojo de gallo” mediante el sistema VITEK® y origen de los aislados..... 48
Cuadro 5. Identificación de los aislados fúngicos obtenidos a partir de muestras de la finca con sintomatología de “Ojo de gallo” y su origen. 50
Cuadro 6. Caracterización morfológica de los aislamientos levaduriformes obtenidos a partir de muestras de la finca de Poás. 53
Cuadro 7. Resumen del origen de los aislamientos levaduriformes obtenidos a partir de muestras de la finca con sintomatología de “Ojo de gallo”. 54
Cuadro 8. Identificación de los aislados fúngicos obtenidos a partir de muestras de la finca con sintomatología de “Crespera” y su origen. 55
Cuadro 9. Caracterización morfológica de los aislamientos levaduriformes obtenidos a partir de muestras de la finca de Aserrí. 58
Cuadro 10. Resumen del origen de los aislamientos levaduriformes obtenidos a partir de de muestras de la finca con sintomatología de “Crespera”..... 59
Cuadro 11. Resumen de algunas características importantes de los aislados bacterianos obtenidos e identificados en este trabajo. 70

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Comportamiento porcentual de la población de microorganismos epífitos: A) totales aislados (global); B) aislados a partir de muestras de plantas asintomáticas; C) aislados a partir de muestras de plantas sintomáticas. Poás, Alajuela, 2009. 38

Figura 2. Distribución porcentual de los aislados bacterianos epífitos en muestras asintomáticas y sintomáticas de Poás. 39

Figura 3. Distribución porcentual de los aislados levaduriformes epífitos en muestras asintomáticas y sintomáticas de Poás..... 39

Figura 4. Comportamiento porcentual de la población de microorganismos epífitos: A) totales aislados (global); B) aislados a partir de muestras de plantas asintomáticas; C) aislados a partir de muestras de plantas sintomáticas. Aserrí, San José, 2009. 40

Figura 5. Distribución porcentual de los aislados bacterianos epífitos en muestras asintomáticas y sintomáticas de Aserrí. 41

Figura 6. Distribución porcentual de los aislados levaduriformes epífitos en muestras asintomáticas y sintomáticas de Aserrí. 41

Figura 7. Comportamiento porcentual de la población de microorganismos endófitos: A) totales aislados (global); B) aislados a partir de muestras de plantas asintomáticas; C) aislados a partir de muestras de plantas sintomáticas. Poás, Alajuela, 2009. 42

Figura 8. Distribución porcentual de los aislados bacterianos endófitos en muestras asintomáticas y sintomáticas de Poás..... 43

Figura 9. Distribución porcentual de los aislados levaduriformes endófitos en muestras asintomáticas y sintomáticas de Poás..... 43

Figura 10. Comportamiento porcentual de la población de microorganismos endófitos: A) totales aislados (global); B) aislados a partir de muestras de plantas asintomáticas; C) aislados a partir de muestras de plantas sintomáticas. Aserrí, San José, 2009. 44

Figura 11. Distribución porcentual de los aislados bacterianos endófitos en muestras asintomáticas y sintomáticas de Aserrí. 45
Figura 12. Distribución porcentual global de los aislados fúngicos obtenidos a partir de muestras de la finca de Poás con sintomatología de “Ojo de gallo”. 51
Figura 13. Distribución porcentual de los aislamientos fúngicos epífitos obtenidos a partir de muestras asintomáticas y sintomáticas de “Ojo de gallo”. 51
Figura 14. Distribución porcentual de los aislamientos fúngicos endófitos obtenidos a partir de muestras asintomáticas y sintomáticas de “Ojo de gallo”. ... 52
Figura 15. Distribución porcentual global de los aislados fúngicos obtenidos a partir de la finca de Aserrí con sintomatología de “Crespera”. 56
Figura 16. Distribución porcentual de los aislamientos fúngicos epífitos obtenidos a partir de muestras asintomáticas y sintomáticas de “Crespera”..... 56
Figura 17. Distribución porcentual de los aislamientos fúngicos endófitos obtenidos a partir de muestras asintomáticas y sintomáticas de “Crespera”..... 57
Figura 18. Ensayos *in vitro* sobre medio PDA de aislados bacterianos contra la cepa My1 de *M.citricolor*. Observación a los 15 días de incubación..... 60
Figura 19. Observación de un aparente halo de inhibición del crecimiento de la cepa My1 de *M.citricolor* en presencia de los aislamientos fúngicos H32 y H5..... 61

ÍNDICE DE APÉNDICES

Apéndice 1. Detalle de inoculación para aislamiento de microorganismos. 92
Apéndice 2. Registro fotográfico de las bacterias epífitas y endófitas aisladas en dos diferentes zonas de Costa Rica. 92
Apéndice 3. Registro fotográfico de los hongos epífitos y endófitos aislados en dos diferentes zonas de Costa Rica. 97
Apéndice 4. Registro fotográfico de las levaduras epífitas y endófitas aisladas en dos diferentes zonas de Costa Rica. 109

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Preparación de un Litro de solución de Buffer de Fosfato 113
Anexo 2. Preparación de un Litro de solución de Buffer PBS 1X 113

INTRODUCCIÓN

El café (*Coffea arabica*)- el cual tiene su punto de origen en Etiopía, exactamente en el territorio denominado «Kaffa» (Peysson, 2001)- , es uno de los mayores productos básicos mundiales. Se produce en más de 60 países y proporciona un medio de vida a unos 25.000.000 de familias caficultoras de todo el mundo. Muchos de los países en que se cultiva el café dependen en gran medida de ese cultivo, y de él puede proceder más del 75% de sus ingresos totales por exportación. Entre los consumidores, el café es una bebida que goza de popularidad universal y supone más de 70.000 millones de dólares EE UU en ventas al por menor al año (Parra, 2008). Para el caso de Centroamérica, el cultivo del café se ha constituido en una de las mayores fuentes de divisas, ubicando a la región en el tercer puesto a nivel mundial en la producción de café (Bertrand y Rapidel, 1999).

Dicho cultivo como cualquier otro se ve afectado por gran variedad de enfermedades tanto de origen fúngico como bacteriano. Dentro de las enfermedades fúngicas que causan mayores daños en la producción se encuentran la roya del café, la “Chasparria” y el “Ojo de Gallo” (Brenes y Flores, 2006), sin embargo, existen otras como por ejemplo la antracnosis que- aunque tiempo atrás no se veía como un peligro- van adquiriendo relevancia por los daños provocados a plantaciones en diferentes países (Silva *et al.* 2006). Por otro lado, dentro de las enfermedades de origen bacteriano conocidas en café, las cuales están ganando interés debido a que presentan un efecto negativo importante sobre el cultivo, se encuentran el encrespamiento de la hoja o “Crespera” del café atribuida a la bacteria polífaga *Xyllela fastidiosa* (Wells *et al.*, 1987; Mariño, 2007) y “la mancha aureolada de la hoja” o “mancha mantecosa” la cual es inducida por *Pseudomonas syringae* pv. garcae (Amaral *et al.*, 1956)

Teniendo en cuenta que el sistema foliar de las plantas se constituye como una puerta de acceso para muchas de las enfermedades, donde las esporas de hongos, las levaduras y las bacterias pueden llegar y colonizar, es fácil de explicar

la gran importancia que supone la investigación de las microfloras que viven tanto en la superficie de las hojas (epífitos) como en su interior (endófitos) y su posible acción como agentes de biocontrol sobre los patógenos de las plantas.

No obstante, aún cuando el café se encuentra ubicado dentro de los cultivos de mayor importancia a nivel mundial, en el presente existen muy pocos estudios sobre las floras de epifitos y endófitos que habitan en hojas de café (Bayman & Santamaría, 2005)

En el presente trabajo se llevó a cabo el estudio de las poblaciones de microorganismos tanto endófitos como epífitos aislados de plantas de café sintomáticas y asintomáticas de la enfermedad de “Ojo de gallo” en la zona de Poás y de plantas sintomáticas y asintomáticas de la enfermedad “Crespera del café” en la zona de Aserrí con el objetivo de determinar que microorganismos se encuentran en las dos zonas y el comportamiento de los mismos ya sea como endófitos o epífitos, así como determinar la presencia de algún o algunos aislados ya sea fúngicos, bacterianos o levaduriformes con potencial biocontrolador *in vitro* contra la enfermedad del “Ojo de gallo” causada por el agente fúngico *Mycena citricolor*.

REVISIÓN DE LITERATURA

Breve panorámica del cultivo del café

La crisis financiera mundial que se ha venido atravesando en estos últimos años no ha causado un verdadero retroceso sobre el consumo a nivel mundial del café, contrario a lo observado en muchos otros sectores de la economía (ICAFE, 2009). Centroamérica se ubica en la tercera posición a nivel mundial en el cultivo del café, siendo este grano uno de los principales productos de exportación de la región. Dicho argumento explica la importancia del cultivo en lo que respecta al desarrollo socioeconómico del Istmo (Bertrand y Rapidel, 1999).

Para el caso de Costa Rica, la producción del café se encuentra concentrada en su mayoría en miles de pequeños productores, los cuales para la cosecha 2008-2009 representaron un aporte del 42,5 % de la producción nacional. En dicha cosecha la cantidad total de café con destino al mercado exterior decayó en un 16,2 % con respecto al período anterior. Además, los ingresos generados para nuestro país producto de la venta a mercados externos del café producido durante la cosecha 2008-2009 correspondieron a un monto aproximado de US$ 250.16 millones siendo un 17,25 % menores a los reportados para la cosecha 2007-2008 (ICAFE, 2009). No obstante la disminución en los ingresos generados y en el volumen de café colocado en los países extranjero, el café sigue representando una parte muy importante de la economía costarricense.

Enfermedades del cultivo del café

El cultivo del café es afectado en su mayoría por enfermedades de origen fúngico, ocasionando las mismas en parte las mayores pérdidas para el caso del cultivo, no obstante, también se han reportado enfermedades de origen bacteriano que presentan efectos negativos importantes sobre las plantaciones.

Dentro de las enfermedades de origen fúngico más importantes en el cultivo se encuentran “la roya del café” causada por el patógeno *Hemileia vastatrix*, la cual se caracteriza por la aparición de manchas de coloración anaranjada y de apariencia polvosa en el envés de las hojas que luego originan la caída prematura de las hojas (Silva *et al.*, 2006); la enfermedad comúnmente conocida como “la mancha de hierro” causada por el hongo fitopatógeno *Cercospora coffeícola*, que ataca a las plantas de café en cualquier etapa del desarrollo caracterizándose por la aparición de pequeñas manchas circulares de color marrón rojizo; y “el Ojo de Gallo del café” causado por *Mycena citricolor* que produce en las hojas manchas mas o menos circulares de un color café oscuro y que en ataques fuertes causa la pérdida de gran parte de la superficie foliar de las plantas (Fischersworring y Robkamp, 2001).

Otras enfermedades fúngicas que causan problemas en café son la “llaga macana” (*Ceratocystis fimbriata)* que ataca árboles viejos o con daños mecánicos, pudriendo el tejido leñoso del café y provocando la caída de las hojas (Fischersworring y Robkamp, 2001); la marchitez del café o traqueomicosis (*Fusarium xylarioides*) que se caracteriza principalmente por la formación de escamas en la corteza de las plantas dando origen a cánceres del tallo y muerte descendente progresiva del árbol completo (Geisar *et al.*, 2005); la pudrición del cuello (*Rhizoctonia solani*) que se presenta en germinadores y a veces en almácigos como una mancha negra en el tallo a nivel del suelo que luego se extiende y ocasiona el volcamiento y muerte de las plántulas (Fischersworring y Robkamp, 2001); y “la antracnosis” provocada por *Colletotrichum kahawae* (originalmente designado como *C. coffeanum*) que infecta desde flores hasta las frutas maduras y ocasionalmente las hojas, causando mayores pérdidas al infectar los granos verdes con la formación de lesiones oscuras hundidas que producen la caída prematura y la momificación de las frutas (Silva *et al.*, 2006).

Como enfermedades bacterianas en café, a la fecha solo se conocen dos que son la marchitez en halo inducida por *Pseudomonas syringae* pv. garcae (Amaral *et al.*, 1956) y el encrespamiento de la hoja (Crespera) del café causada por la

bacteria polífaga *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*, 1987). En la primera, la bacteria infecta las hojas de café, los extremos de las ramas y los frutos jóvenes, produciendo lesiones necróticas oscuras irregulares a veces confundidas con el ataque del hongo *Phoma sp*, lo cual puede ser descartado por la presencia de exudados bacterianos en las lesiones jóvenes (Silva *et al.*, 2006). Por otro lado, "la Crespera del café" se caracteriza de manera general por la deformación de las láminas foliares y el resalte de las venas secundarias en las hojas, acompañadas de bifurcaciones ocasionales de la lámina foliar (Barquero, 2007).

Enfermedad de "Ojo de Gallo del café"

Mycena citricolor comúnmente conocida como "Ojo de gallo", es una de las enfermedades de mayor importancia en el cultivo del café en Costa Rica. Un cálculo conservador elaborado por el Departamento de Protección de los cultivos del Ministerio de Agricultura y Ganadería, estimó pérdidas anuales por 10 millones de dólares producto de esta enfermedad en la caficultora nacional (Vargas, 2000). Dicho hongo se ha reportado como patógeno dentro de un amplio rango de hospederos, existiendo más de 550 especies de plantas que son susceptibles a ser atacados por éste (Wang y Avelino, 1999).

El ojo de Gallo es una enfermedad del café conocida en Costa Rica desde el año 1880 cuando causó graves daños al cultivo (Carvajal, 1939). Dicha enfermedad se ha constituido en una de las más importantes en la historia del café para el caso de nuestro país (Bonilla, 1980). Los síntomas característicos de la enfermedad son la aparición de manchas circulares u ovaladas sobre las hojas, con una medida de 0,5 a 1 cm de diámetro. Las lesiones inician como puntos café oscuro de borde indefinido, al alcanzar su tamaño final presentan un borde bien marcado con poca o ninguna clorosis alrededor, con el centro de color café claro grisáceo o café rojizo (Vargas et al, 1990). El hongo desarrolla sobre las hojas infectadas unas estructuras llamadas gemas las cuales corresponden a sus estructuras asexuales que se constituyen en la principal fuente de diseminación

de la enfermedad en los cafetos, siendo éstas fácilmente dispersadas por el agua de lluvia, el viento, los pájaros y los insectos entre otros vectores (Carvajal, 1939).

La importancia de la enfermedad de “Ojo de gallo” se debe a que su incidencia en los cafetales ocasiona una disminución significativa del área fotosintética de las plantas ya que produce defoliación, desviando las reservas alimenticias hacia la producción de nuevo follaje en lugar de destinarlas a la formación de los frutos; afectándose de manera negativa la producción de los cafetos. Además, causa daños a los frutos formados los cuales una vez que son atacados por la enfermedad se tornan susceptibles a la caída (Bonilla, 1980).

Enfermedad de “Crespera del café”

La Crespera del café es otra de las enfermedades que actualmente representa gran importancia en el cultivo del café, siendo atribuidos sus síntomas a una infección bacteriana de las plantas por el agente patógeno *Xylella fastidiosa* (Wells *et al.*, 1987). La bacteria *X. fastidiosa*, se ha reportado como patógeno en gran variedad de cultivos a nivel de América (vid, melocotón, el árbol de roble y mayormente en plantas de cítricos) (Blansky *et al.*, 1991, citados por Mariño, 2007).

Está enfermedad bacteriana fue reportada por primera vez afectando plantas de café en 1995 en el estado de S. Paulo en Brasil (Leite Jr. *et al.*, 1999). Y para el caso específico de América Central ésta ha sido reportada afectando plantaciones de café en Costa Rica (Blansky *et al.*, 1991, citados por Mariño 2007). Los síntomas característicos causados por la infección de plantas de café con la bacteria son un acortamiento de los entrenudos, pérdida prematura de las hojas más viejas, aparición de agrupaciones terminales de pequeñas hojas deformadas y decoloradas, muerte descendente de los brotes laterales e impedimento del desarrollo total de la planta (Li *et al.*, 2001). No obstante, según Barquero (2007) los síntomas de esta enfermedad en café presentan variaciones

de acuerdo a la región donde se encuentra el cultivo, caracterizándose para el caso de Costa Rica mayormente por la deformación de las láminas foliares y el resalte de las venas secundarias en las hojas, acompañadas de bifurcaciones ocasionales de la lámina foliar.

La diseminación de la enfermedad de “Crespera del café” se atribuye a la acción de insectos cicadélidos que transmiten la bacteria entre plantas, sin embargo el rango de vectores en café es desconocido. Por ejemplo, tanto en Brasil como en nuestro país, donde se han reportado ataques severos de la bacteria, se han realizado varios estudios encontrándose una gran diversidad de cicadélidos como vectores potenciales, no obstante, aún se desconoce su eficiencia en la adquisición y transmisión de la bacteria (Rojas *et al.*, 2001).

Métodos de identificación Bacteriana

Los métodos empleados para la identificación de aislados bacterianos actualmente se basan en pruebas tan sencillas como el crecimiento de las colonias en medios selectivos así como en procedimientos aún más complejos como el análisis del contenido de los ácidos grasos de los microorganismos, el montaje de gran cantidad de reacciones bioquímicas y hasta el análisis del ADN ribosomal 16S.

A- Identificación de desconocidos bacterianos mediante sistema BIOLOG®

El sistema de identificación microbiológica BIOLOG® permite identificar de una forma ágil aislados bacterianos y levaduriformes a partir del análisis computarizado de reacciones bioquímicas y su comparación con una base de datos de aproximadamente unas 1400 especies de bacterias aerobias, anaerobias y levaduras. Su fundamento se basa en el análisis de un perfil

metabólico que se genera a partir de la utilización y oxidación por parte de los microorganismos de ciertas fuentes de carbono (Garland, 1999)

Para llevar a cabo el análisis de los microorganismos este sistema hace uso de microplacas de titulación que constan de 96 pozos. Cada una de las microplacas comprende una variedad de medios, conteniendo carbohidratos específicos dentro de cada pozo así como un indicador redox que funciona como reportero de la reacción (Sutton y Cundell, 2004). Inicialmente se preparan suspensiones fluidas de las bacterias purificadas en la fase de crecimiento activo (15-18 horas), las cuales deben de ser homogenizadas mediante la determinación de un porciento de transmitancia a 590nm. Cada uno de los pozos de las microplacas de reacción se inocula con 150µl de la suspensión bacteriana (Mariño, 2007) del aislado a identificar. Si se da el crecimiento del microorganismo en alguno de los pozos en particular, las condiciones de reducción dentro de dicho pozo resultan en una coloración oscura del colorante redox de tetrazolium lo que determina catabolismo del sustrato (Sutton y Cundell, 2004). Las microplacas inoculadas se incuban por un tiempo de 24 horas, período luego del cual se revisa la presencia de cambios en la coloración de los micropozos, ya sea de manera manual o por medio de un lector fotométrico de placas, comparando lo obtenido con los resultados presentes en la base de datos computarizados. La identificación final queda determinada por una probabilidad e índice de similitud entre el perfil metabólico del microorganismo incógnito y las diferentes especies presentando un patrón similar dentro de la base de datos computarizada (Garland, 1999).

Como paso previo al montaje de los desconocidos para su identificación, es necesario purificar los cultivos y someter los mismos a pruebas como la tinción de Gram, pruebas de de Catalasa, Oxidasa, cultivo en agar TSI, así como reunir información a partir de la descripción morfológica ya que de los datos obtenidos de éstas depende en cierto grado el tipo de microplacas adecuadas para el procesamiento de cada muestra. Además, la clasificación preliminar de los aislados ya sea con base en todas o algunas de esas pruebas ayuda a minimizar

los gastos innecesarios de reactivos y permite llevar a cabo la identificación de una manera más acertada y ágil (Uribe, 2010[1]).

B- Identificación de desconocidos bacterianos mediante sistema VITEK®

El sistema VITEK® es un método de identificación automatizada de aislados bacterianos y levaduriformes que se basa en el empleo de tarjetas de reacción bioquímica especificas según el tipo de microorganismo que se desea analizar (anaerobio, gram positivo, gram negativo, bacilos gram positivo…).

Para llevar a cabo el análisis por este sistema, primero es necesario realizar una tinción de gram a partir de un cultivo puro del desconocido, y dependiendo del grupo al que pertenezca éste (gram positivo o negativo), se montan pruebas de catalasa, oxida o coagulasa, según sea el caso. Luego, una suspensión ajustada a una turbidez adecuada de colonias puras en una solución salina es inoculada en el interior de las tarjetas de identificación, las cuales contienen 29 diferentes caldos bioquímicos en celdas de reacción y una celda de control negativo para evaluar el crecimiento y la viabilidad de la suspensión. Las tarjetas inoculadas son incubadas dentro del equipo, variando los tiempos de incubación desde 2 a 15 horas dependiendo de la taza de crecimiento del microorganismo. La computadora programada para el VITEK® determina si cada pozo es positivo o negativo mediante la medida de la atenuación de la luz con un escáner óptico. Cuando el período de incubación ha finalizado, las reacciones son analizadas automáticamente y la identificación es impresa (Shetty *et al.*, 1998).

[1] Dra. Lidieth Uribe. 2010. Comunicación Personal. Directora del Laboratorio de Microbiología Agrícola. Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. Consulta 16/06/2009.

Microorganismos epífitos y endófitos

En estudios previos, tanto para el caso de plantas de café como en otros tipos de plantas, que se han dirigido al aislamiento de los microorganismos epifitos, se han utilizado metodologías como la impresión de las superficies de los órganos a muestrear sobre la superficie del medio de cultivo (Morris *et al.*, 1997; Krimm *et al.*, 2005), y el lavado de las muestras en soluciones de buffer para la obtención de diluciones de los microorganismos a partir de las mismas, las cuales luego son plateadas en el medio seleccionado (Morris *et al.*, 1997; Borges *et al.*, 2004; Slavov, 2006).

Por otro lado, para la obtención de los microorganismos que se encuentran habitando los tejidos de las plantas de manera endófita la mayoría de las metodologías empleadas incluyen de manera general un paso inicial que involucra la desinfección de la superficie de los tejidos con agentes como el hipoclorito de sodio y el etanol, seguido de la extracción de los fluidos conteniendo los microorganismos ya sea por maceración del tejido en un buffer apropiado o por centrifugación, y como paso final el plaqueo de alícuotas de los extractos obtenidos sobre algún medio de cultivo ya sea general o especifico (Ashbolt & Inkerman, 1990; Fuentes *et al.*, 1993; Dong *et al.*; 1994; Araujo et. al., 2007; Chacón, 2008). No obstante, otros autores como Bayman y Santamaría (2005) y Ramírez y col. (2006) han empleado metodologías distintas para la obtención de los endófitos, las cuales involucran la esterilización superficial de pequeños fragmentos de hoja que luego son colocados sobre el medio de cultivo, recuperando los microorganismos que emergen del tejido.

A pesar de que existen muy pocos estudios sobre las microfloras habitando plantas de café, a la fecha a partir de muestras de las mismas se han reportado aislamientos fúngicos de los géneros *Pestalotia, Botryosphaeria, Xylaria, Guignardia, Coprinus*, (Bayman y Santamaría, 2005), *Fusarium, Penicillium, Trichoderma*, *Mucor* (Carcache, 2002; Bayman y Santamaría, 2005; Waller y Masaba, 2006), *Cladosporium, Aspergillus* (Bayman y Santamaría, 2005; Waller y

Masaba, 2006; Chacón, 2008), *Rhizopus* (Carcache, 2002; Bayman y Santamaría, 2005), *Paecilomyces*, (Carcache, 2002; Chacón, 2008), *Beauberia, Pythium* (Chacón, 2008), *Colletotrichum* Bayman y Santamaría, 2005; Waller y Masaba, 2006), *Phoma, Phomopsis, Alternaria, Bipolaris* (Waller y Masaba, 2006), *Geotrichum, Oidiodendron, Curvularia, Verticillium, Bispora, Sepedonium, Thielaviopsis* y *Nigrospora* (Carcache, 2002) y aislamientos bacterianos de los géneros *Bacillus* (Carcache, 2002; Vega *et al.*, 2005; Shiomi *et al.*2006; Mariño, 2007; Chacón, 2008), *Enterobacter* (Vega *et al.*, 2005; Mariño, 2007; Chacón, 2008), *Staphylococcus, Xylella* (Mariño, 2007; Chacón, 2008)*Serratia* (Vega *et al.*, 2005; Chacón, 2008) *Raoultella* (Chacón, 2008), *Paenibacillus* (Sakiyama *et al.*, 2001), *Acetobacter* (Jimémez-Salgado *et al.*,1997), *Micrococcus* (Vega *et al.*, 2005; Mariño, 2007), *Arthrobacter, Chryseobacterium, Clavibacter, Rhizobium, Sphingobacterium* (Mariño, 2007), *Pseudomonas, Xanthomonas* (Carcache, 2002; Vega *et al.*, 2005), *Burkholderia, Cedecea, Chromobacterium, Clavibacter, Curtobacterium, Escherichia, Gordona, Klebsiella, Kocuria, Methylobacterium, Pantoea, Rhodococcus, Salmonella, Stenotrophomonas, Variovorax, Yersinia* (Vega *et al.*, 2005), *Erwinia y Corynebacterium* (Carcache, 2002), así como diversidad de aislados levaduriformes no identificados. Los microorganismos enlistados se han hecho presentes algunos de manera endofítica, otros de forma epifítica y unos cuantos como habitantes en ambos nichos.

Biocontrol de enfermedades

Hoy en día se sabe que las hojas constituyen todo un ecosistema, dando nicho al crecimiento y desarrollo de microorganismos que habitan en sus superficies externas (epifitos) y de microorganismos habitando en el interior de sus tejidos (endófitos), ambas floras coexistiendo entre si separadas por distancias de tan solo unos cuantos milímetros. Además, se ha llegado a reconocer que el desarrollo de las enfermedades que atacan las hojas de las plantas, están influenciadas tanto por las relaciones que los patógenos establezcan con la planta

misma y con el ambiente, así como con los demás microorganismos que habitan en las hojas (Andrews & Harris, 2000).

Según Demain y Davies (1999) de los 100.000 productos naturales producidos por microorganismos y plantas y alrededor de 50.000 son producidos por microorganismos. De los 12.000 antibióticos conocidos el 55% son producidos por bacterias filamentosas del género Streptomyces, 11% por otras bacterias filamentosas, 12% por bacterias no filamentosas y un 22% por hongos filamentosos.

Actualmente se sabe que existen bacterias no simbióticas que resultan benéficas para las plantas, las cuales se clasifican como rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR, del inglés Plant Growth Promoting Rhizobacteria) y agentes de control biológico (BCA, del inglés Biological Control Agents). Los llamados BCA pueden ser aislados tanto de tejidos de las partes aéreas de la planta como a partir del sistema radicular. Estos agentes presentan la capacidad de colonizar o competir por nutrientes y sitios de interacción de los patógenos con las plantas, así como de desarrollar relaciones hiperparasíticas con los fitopatógenos, o ejercer varios tipos de antagonismo, mediante síntesis de compuestos antimicrobianos, bacteriocinas y nuevos compuestos antibióticos (Gutterson, 1990).

Es un punto de concordancia entre los diversos autores que los microorganismos tanto epifitos como endófitos podrían tener una implicación importante en la salud de las plantas y en la protección de las mismas (Andrews & Harris, 2000), así como en la producción de metabolitos secundarios y descubrimiento de nuevas drogas (Strobel & Long, 1996)

OBJETIVOS

Objetivo General

Aislar e identificar los microorganismos endófitos y epifitos que se encuentran presentes en muestras de hoja de plantas de café sintomáticas y asintomáticas de *Mycena citricolor* (Ojo de gallo) y de *Xylella fastidiosa* (Crespera), en dos regiones del país y determinar el antagonismo de los mismos contra *Mycena citricolor.*

Objetivos Específicos

1. Aislar microorganismos epífitos y endófitos de plantas de café sintomáticas y asintomáticas de “Ojo de gallo”.

2. Identificar los microorganismos aislados y llevar a cabo la comparación de la población epífita con la endófita.

3. Aislar microorganismos epífitos y endófitos de plantas de café sintomáticas y asintomáticas de “Crespera”.

4. Identificar los microorganismos aislados y llevar a cabo la comparación de la población epífita con la endófita.

5. Realizar pruebas sencillas a nivel *in vitro* del potencial biocontrolador de los microorganismos epífitos y endófitos aislados contra *Mycena citricolor* (Ojo de gallo).

METODOLOGÍA

1. Identificación de microorganismos epífitos y endófitos en plantas sintomáticas y asintomáticas de “Ojo de Gallo” y de “Crespera”

1.1. Locación y Época de estudio

La toma de las muestras para efectos del trabajo se realizó en dos locaciones independientes, ambas dedicadas al cultivo del café (*Coffea arabica*) variedad Caturra. Uno de los sitios correspondió a la finca la Rosalia, ubicada en el distrito de San Juan Norte del cantón de Poás y la provincia de Alajuela, dentro de la cual se presentaban plantas con la sintomatología de la enfermedad “Ojo de Gallo” causada por el hongo *Mycena citricolor*. La otra localidad fue la finca de nombre Málaga, ubicada en el distrito de San Gabriel del cantón de Aserrí de la provincia de San José, dentro de la cual se hacían presentes síntomas de la enfermedad de “Crespera” del café, atribuida a la bacteria *Xylella fastidiosa*. La colecta de las muestras se llevó a cabo en el mes de marzo del año 2009 para el caso de la primera finca y en el mes de abril del año 2009 para el caso de la segunda.

1.2. Muestreo del material de campo para el aislamiento de microorganismos epífitos y endófitos.

Para la toma de muestras tanto de la finca afectada por “Ojo de gallo” como para la afectada por “Crespera”, el área de muestreo estuvo constituida por una parcela de 10 x 10 plantas, las cuales presentaban una edad entre los cuatro y cinco años y se encontraban expuestas a condiciones ambientales similares en cuanto a la disponibilidad de nutrientes, precipitación, exposición a radiación UV, etc. Estas plantas no fueron expuestas a aplicaciones de agroquímicos

(fungicidas, bactericidas, etc.) por al menos un período de tres meses previo al inicio de los muestreos.

El tipo de muestreo que se llevó a cabo fue un muestreo estratificado, comprendiendo dos estratos uno representado por plantas sintomáticas y el otro correspondiendo a plantas asintomáticas de las enfermedades de “Ojo de Gallo” y de “Crespera” según fuese el caso. Primero dentro de la parcela de 100 plantas se hizo un análisis de cada individuo determinándose la presencia o ausencia de los síntomas. Una vez obtenida la proporción correspondiente, se convirtió la cantidad de individuos según los estratos a una muestra final de 30 plantas. Para la finca de Poás la muestra final consistió de 24 hojas correspondientes a plantas sintomáticas de “Ojo de gallo” y 6 hojas de plantas asintomáticas, mientras que para el caso de la finca de Aserrí consistió de 14 hojas de plantas sintomáticas de “Crespera” y 16 hojas de plantas asintomáticas.

A partir de cada una de las plantas seleccionadas como parte de la muestra en cada locación, se tomó 2 hojas del tercer nudo de bandolas ubicadas a una altura intermedia. Una de las hojas se procesó para la obtención de epífitos y la otra para la obtención de los endófitos.

1.3. Obtención de microorganismos epífitos a partir del material colectado en campo

Para el aislamiento de los microorganismos epífitos, las muestras de hoja provenientes de cada finca se procesaron por separado. Éstas se llevaron a la cámara de flujo laminar y se lavaron cada una de las mismas de forma individual en erlenmeyers conteniendo 150 ml de Buffer de Fosfato (Ver Anexo 1 para elaboración), con agitación manual por un período de tiempo de 3 minutos.
Concluido el tiempo de lavado se llevó a cabo dos diluciones seriadas, colocando 100 µl de la solución de lavado en un tubo eppendorf conteniendo 900 µl de agua destilada autoclavada (dilución 10^{-1}) del cual, luego de ser agitado con ayuda de

un vortex, se tomaba otro volumen de 100µl para suspenderlo en otro tubo eppendorf conteniendo 900 µl de agua (dilución 10^{-2}). Ya realizadas las diluciones, se plaqueó con ayuda de una micropipeta de 100µl un volumen de 20µl de las soluciones concentrada (tomada directamente del erlenmeyer de lavado), 10^{-1} y 10^{-2} sobre placas petri conteniendo medio PDA y dejando cada una de las gotas formadas resbalar sobre la superficie del medio de manera que dejaran una estela, teniendo el cuidado de que las gotas no tocaran los bordes de las placas ni se mezclaran entre sí (Ver Apéndice 1).

Una vez absorbido el volumen plaqueado por la superficie del medio, se selló las placas con parafilm y se llevaron a un cuarto de crecimiento donde se incubaron a 21º C bajo condiciones de luz ambientales por un período aproximado de cuatro semanas durante el cual se estuvieron revisando periódicamente para llevar a cabo el aislamiento de los microorganismos que iban apareciendo.

1.4. Obtención de microorganismos endófitos a partir del material colectado en campo.

Para el caso de los microorganismos endófitos, las hojas se llevaron a la cámara de flujo laminar donde se les tapó con plástico parafilm los extremos de los pecíolos antes de ser sometidas a desinfección; seguidamente se colocaron en erlenmeyers dividiéndolas en sintomáticas y asintomáticas respectivamente, inicialmente se aplicó un lavado superficial con agua destilada autoclavada para eliminar partículas de polvo, tierra y cualquier otro contaminante que pudiese interferir en el procedimiento de desinfección como tal. Después de realizado el lavado, se colocó las hojas en otro erlenmeyer que contenía alcohol al 70% y se agitaron manualmente por un período de 2 minutos. Luego las hojas se trasladaron a otro erlenmeyer, que contenía una solución de hipoclorito de sodio al 1% preparada a partir de una solución concentrada de ingrediente activo al 3,5% donde se mantuvieron con agitación manual por un período de 2 minutos. Finalmente, se descartó la solución de hipoclorito de sodio y se llevaron a cabo

dos lavados con agua destilada autoclavada con agitación manual y por un período de aproximadamente de 1 minuto cada uno para eliminar el resto del desinfectante. Posteriormente se plaqueó una alícuota de 20µl sobre PDA con el objetivo de que ésta sirviese de control del proceso de desinfección.

Para el procesamiento de las muestras de la finca de Poás, las muestras de plantas sintomáticas se dividieron en tres bloques de 8 hojas cada uno y en tres bloques constituidos de dos hojas cada uno para el caso de las muestras de plantas asintomáticas. Por otro lado, para el caso de las muestras de la finca de Aserrí, las hojas se dividieron en tres bloques, uno de 4 hojas y dos de 5 hojas para las muestras de plantas sintomáticas y en tres bloques, uno de 6 hojas y dos de 5 hojas, para las muestras de plantas asintomáticas.

Una vez concluido el proceso de desinfección, las hojas se colocaron sobre papel toalla estéril y se les eliminó el segmento de pecíolo sellado con parafilm, así como el tejido oxidado con la ayuda de un bisturí de hoja número 20. Las hojas de cada bloque se cortaron en pequeños fragmentos y se maceraron en un mortero estéril con un pistilo estéril adicionando un volumen de 2 ml de Buffer PBS 1X (Ver Anexo 2 para elaboración) por cada muestra de hoja que constituía el bloque. El extracto obtenido producto del macerado se pasó a un frasco estéril y luego de esto se llevaron a cabo dos diluciones seriadas colocando 100µl del extracto concentrado en un tubo eppendorf conteniendo 900µl de agua destilada autoclavada (dilución 10^{-1}) y tomando otros 100µl de éste último y colocándolos en otro tubo eppendorf conteniendo 900µl de agua destilada autoclavada (dilución 10^{-2}).

Finalmente se plaqueó con ayuda de una micropipeta de 100µl un volumen de 20µl de las soluciones concentrada, 10^{-1} y10^{-2} sobre placas petri conteniendo medio PDA y dejando cada una de las gotas formadas resbalar sobre la superficie del medio de manera que dejaran una estela, teniendo el cuidado de que las gotas no tocaran los bordes de las placas ni se mezclaran entre sí (Ver Apéndice 1).

Una vez absorbido el volumen plaqueado por la superficie del medio, se selló las placas con parafilm y se llevaron a un cuarto de crecimiento donde se incubaron a 21º C por un período aproximado de cuatro semanas durante el cual se estuvieron revisando periódicamente para llevar a cabo el aislamiento de los microorganismos que iban apareciendo.

1.5. Identificación de los microorganismos aislados.

A. Aislamientos bacterianos.

Las colonias bacterianas obtenidas tanto epífitos como endófitos se mantuvieron en cultivo sobre medio PDA y se les llevó a cabo una caracterización morfológica basándose en los criterios de forma colonial, el tipo de superficie, elevación del crecimiento, tipo de borde y estructura interna de las colonias, consistencia y posible cromogénesis.

i. Identificación bioquímica de bacterias gram negativas y gram positivas no esporuladas con ayuda del sistema BIOLOG®

La identificación de los aislados bacterianos obtenidos mediante BIOLOG®, se llevó a cabo en el laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica.

Inicialmente se prepararon cultivos puros de los aislamientos bacterianos a identificar de los cuales se tomó colonias aisladas para llevar a cabo la prueba de tinción de gram. Para las bacterias que resultaron gram positivas se determinó la presencia o ausencia de esporas y la producción de enzima catalasa mediante la reacción bioquímica rápida. En el caso de las bacterias gram negativas se cultivó las mismas en Agar TSI por un período de incubación que varió de entre 2 y 15

días según la taza de crecimiento del microorganismo con el objetivo de determinar si se trataba de una bacteria entérica o no entérica. Estas pruebas se realizaron puesto que el sistema BIOLOG® trabaja a partir de microplacas especificas para cada tipo de microorganismo, correspondiendo las mismas a GN en el caso de que el microorganismo fuese gram negativo, GP si se trataba de un gram positivo y AN si correspondía a un anaerobio. Una vez realizadas las pruebas anteriores, las bacterias se rayaron en medio Agar Nutritivo a temperatura ambiente o la temperatura de crecimiento de la bacteria. Tomando crecimiento a partir de los rayados con ayuda de un aplicador estéril se realizó suspensiones de cada uno de los aislados igualándolas a un estándar de turbiedad (los cuales corresponden a patrones de BIOLOG® de acuerdo a los resultados del cultivo en agar TSI y de la tinción de gram). Una vez ajustada cada una de las suspensiones, las mismas se inocularon en las microplacas BIOLOG® correspondientes con ayuda de una micropipeta multicanal y se incubaron a 28º C por períodos de tiempo que variaron entre las seis horas y los 15 días dependiendo del crecimiento de cada aislado. Las lecturas se llevaron a cabo 2 veces al día utilizando el programa BIOLOG® MicroLog1™ (Versión 4.20.05), donde se insertaron los datos característicos de cada microorganismo (si era gram positivo, negativo o anaerobio, entérico o no entérico, coco o bacilo…y el tiempo de incubación). Las placas se leyeron de izquierda a derecha anotando como positivos los pozos con viraje a morado, como negativos los que no presentaron viraje y como borde los que presentaron un color claro. Se reportó el género y la especie de los microorganismos que presentaron un valor de probabilidad de identificación de 95% o superior según la base de datos digital; siendo los microorganismos con valores por debajo de dicho porcentaje reportados únicamente a nivel de género.

ii. Identificación de bacterias gram positivas esporuladas con la ayuda del sistema VITEK®

El análisis de los aislamientos bacterianos gram positivos esporulados por medio del sistema VITEK® fue llevado a cabo en el Laboratorio de Bacteriología de la Facultad de Microbiología de la Universidad de Costa Rica.

Para el procesamiento de los desconocidos, a partir de un cultivo puro y fresco (de aproximadamente 24 horas) de cada uno de los microorganismos se realizó la tinción de gram para poder clasificarlos como gram positivos o negativos y de acuerdo al grupo que pertenecía cada uno se le realizó las pruebas de oxidasa o catalasa y coagulasa en caso de ser necesario.

Para iniciar la identificación se calibró el colorímetro al 0% y 100% de transmitancia y se preparó el inóculo en tubos plásticos con 1,8 ml de solución salina, ajustando de acuerdo al color correspondiente para cada tipo de microorganismo y de tarjeta. Una vez lista la suspensión se extrajo las tarjetas de su empaque y se rotularon con marcador, indicando el número de muestra y si alguna de las pruebas adicionales (oxidasa, catalasa, etc.) fueron positivas. A continuación se insertó firmemente el tubo de transferencia en el orificio de entrada de la tarjeta, teniendo el cuidado de que la parte mas larga del tubo quedase paralela a la misma. La tarjeta se colocó en el soporte de llenado del VITEK®, de tal manera que el extremo largo del tubo de transferencia quedase introducido en el tubo con la muestra. El soporte de llenado se colocó en la gradilla y esta se introdujo en el módulo preparador, que se encarga de llevar a cabo la inoculación de la tarjeta por medio de vacío. Al terminar el ciclo del modulo preparador se inspeccionó bien la tarjeta para verificar que la inoculación se diera de manera correcta y se selló introduciendo el conjunto tarjeta/tubo de transferencia sobre el soporte de llenado en el módulo sellador. Cada una de las tarjetas selladas se colocó en la bandeja del lector/incubador e inmediatamente se introdujeron en el sistema VITEK®. Una vez las tarjetas dentro del equipo, se

procedió a introducir la información de la muestra, en el menú inicial de la pantalla principal, ya que el equipo relaciona los datos de la muestra con la tarjeta.

Los patrones bioquímicos obtenidos para cada aislado fueron automáticamente analizados y almacenados por el sistema automático VITEK®, resultando la identificación como una probabilidad obtenida a partir de la comparación entre los patrones característicos de los desconocidos frente a los patrones de un grupo conocido de microorganismos.

B. Aislamientos fúngicos.

Los hongos aislados a partir de las muestras inicialmente se cultivaron en tubos de ensayo conteniendo medio Agar Papa Dextrosa (PDA), y se incubaron en un cuarto oscuro a una temperatura de 21º C durante el tiempo que duró el estudio. Cada uno de los aislamientos fúngicos fue subcultivado una vez al mes para renovar los cultivos de la colección.

Para la identificación de los aislamientos obtenidos se llevó a cabo montajes de fijación en gota con agua destilada y azul de metileno para la observación directa al microscopio de luz bajo el objetivo de 40X. Las observaciones para cada hongo se llevaron a cabo durante distintos tiempos de incubación con el objetivo de observar la presencia de estructuras reproductivas características. La identificación final se basó en la comparación de las observaciones realizadas con los parámetros de los manuales de reconocimiento de Finch y Finch (1990) de Von Arx (1981) y de Barnett y Hunter (1972).

Aquellos hongos que no presentaron desarrollo de estructuras reproductivas al ser cultivados sobre medio PDA, fueron sometidos a diferentes condiciones con el objetivo de promover el desarrollo de esporas. Las variables consistieron en el cultivo de los hongos en Agar Extracto de Malta, cultivo sobre Agar Agua,

incubación de los hongos en oscuridad y exposición a temperaturas de incubación bajas.

En el caso del empleo de medios pobres como el Agar Extracto de Malta y el Agar Agua, se colocó inóculo de cada uno de los hongos sobre placas petri dispensadas con los respectivos medios de cultivo y se mantuvieron en los mismos por un período aproximado de dos semanas en un cuarto de crecimiento a una temperatura de 21º C, siendo revisados en al menos dos ocasiones durante dicho tiempo para observar el desarrollo de alguna estructura que ayudase a su identificación.

La incubación en oscuridad se llevó a cabo en cultivo inclinado en tubos de ensayo dispensados con medio PDA colocando una manta negra sobre los tubos para evitar la incidencia de luz y manteniendo los mismos en un cuarto de crecimiento a una temperatura de 21º C por un periodo aproximado de dos semanas tiempo durante el cual se observaban en busca de estructuras reproductivas.

Por último, para la inducción de esporulación por exposición a bajas temperaturas se montó en cultivo inclinado en tubos de ensayo dispensados con medio PDA cada uno de los hongos los cuales se mantuvieron en un cuarto de crecimiento a una temperatura de 21º C por un período de una semana, luego de lo cual eran colocados en refrigeración a una temperatura aproximada de 6,9º C donde se incubaban por otra semana para su posterior observación al microscopio.

2. Pruebas *in vitro* del Potencial Biocontrolador de los microorganismos epífitos y endófitos aislados contra *Mycena citricolor* (Ojo de gallo).

2.1. Selección de microorganismos con Potencial Biocontrolador

Para llevar a cabo las pruebas de biocontrol por parte de cada uno de los microorganismos aislados contra el hongo *Mycena citricolor* se dividieron en dos grupos, esto con el fin de facilitar la manipulación y el análisis del comportamiento de cada uno frente al patógeno.

El primer grupo estuvo conformado por las bacterias y los asilamientos levaduriformes obtenidos ya que estos presentaban una taza de crecimiento más rápida y por lo tanto los resultados podrían ser observados en un menor tiempo. El segundo grupo lo constituyeron los aislamientos fúngicos, con un crecimiento más lento (en comparación con las bacterias y levaduras) los cuales requerían de un mayor tiempo de incubación para observar resultados.

A. Pruebas de antagonismo de los aislamientos bacterianos y levaduriformes

Para el caso de las bacterias y las levaduras totales aisladas, se montó pruebas preliminares mediante el empleo de cultivo inclinado en tubos de ensayo conteniendo medio Agar Papa Dextrosa (PDA).

Los tubos con medio eran inoculados en su parte inferior con micelio del hongo *Mycena citricolor* cepa My1 proveniente de una colección del CICAFE y en la parte superior se colocaba una asada de cada una de las bacterias o levaduras a probar según fuese el caso. En esta primera prueba preliminar se pretendía observar el avance del crecimiento de ambos microorganismos por la superficie del medio uno con respecto del otro de manera diaria con el objetivo de determinar si se presentaba o no una acción antagónica significativa.

Las bacterias que mostraron cierta inhibición del crecimiento de *Mycena citricolor* fueron luego montadas en placas petri para corroborar su efecto sobre el hongo. En este caso el ensayo consistió en colocar sobre placas petri dispensadas con medio PDA un disco de aproximadamente 7mm de diámetro tomado a partir de una placa con crecimiento previo de la cepa My1 del hongo *M.citricolor* separado por una distancia de 2 cm de una asada de cada una de las bacterias o levaduras de interés. Las placas se incubaron en un cuarto de cultivo a una temperatura aproximada de 21º C y bajo condiciones de luz ambiental por aproximadamente 15 días para observar la presencia del efecto antagónico.

B. Pruebas de antagonismo de los aislamientos fúngicos

Para determinar el antagonismo por parte de los aislamientos fúngicos, cada hongo se cultivo en placas petri conteniendo medio PDA en las cuales se colocó un disco de aproximadamente 7mm de diámetro con crecimiento previo de la cepa My1 de *M.citricolor.* Las placas se incubaron en un cuarto de cultivo a una temperatura aproximada de 21º C y bajo condiciones de luz ambientales. El avance de los hongos uno con respecto al otro se observó de manera diaria por un período de aproximadamente 15 días, que permitiera determinar la presencia o ausencia del halo de inhibición.

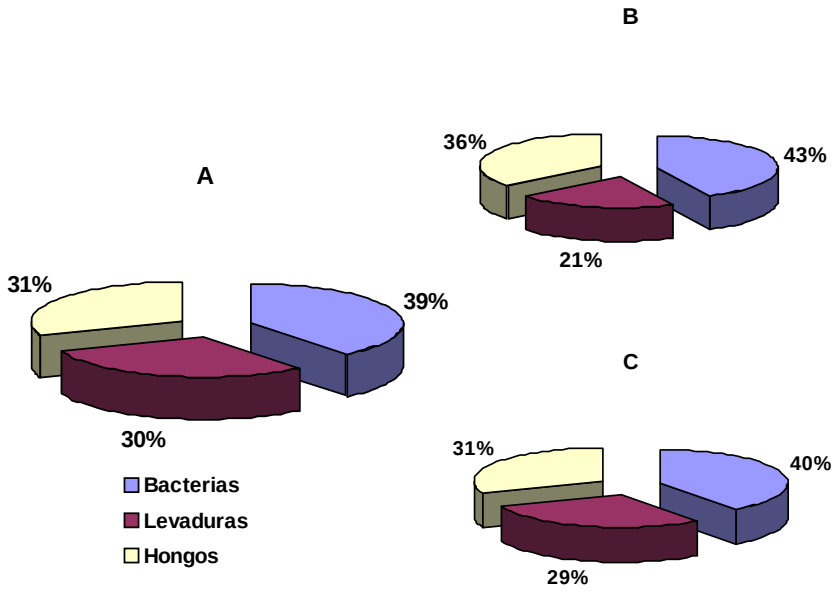
RESULTADOS

1. Identificación de microorganismos epífitos y endófitos en plantas sintomáticas y asintomáticas de “Ojo de Gallo” y de “Crespera”.

1.1 Obtención de microorganismos epífitos a partir del material colectado en campo

En el caso de la finca de Poás a partir de las muestras, de plantas asintomáticas y sintomáticas de “Ojo de Gallo”, procesadas para los microorganismos epífitos se logró obtener un total de 84 aislados entre bacterias, levaduras y hongos. En la figura 1.A se observa la distribución porcentual de cada tipo de microorganismo aislado.

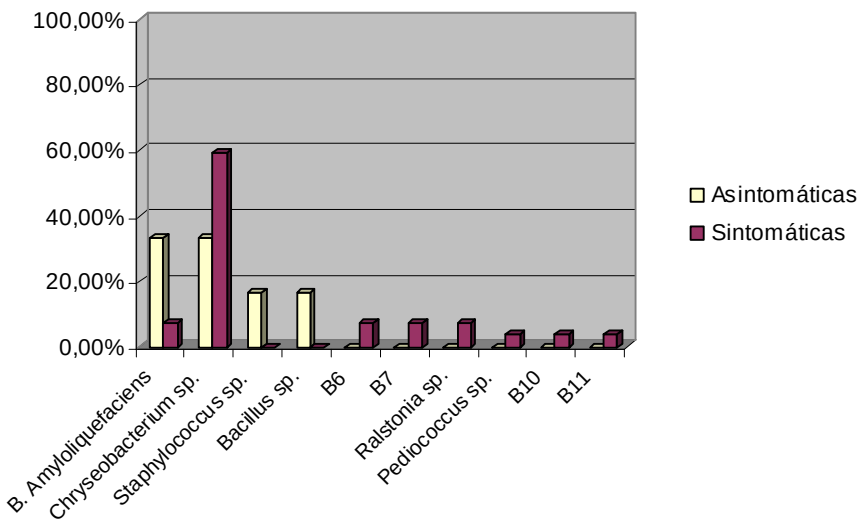
En el caso de los microorganismos epífitos aislados a partir de plantas asintomáticas, se obtuvieron 43% aislamientos bacterianos, 36% fúngicos y 21% levaduriformes, siendo los porcentajes representados en la figura 1.B. Para los microorganismos epífitos aislados a partir de plantas sintomáticas se recuperó un 40% de bacterias, 29% levaduras y 31% de hongos agrupados por género y especie según sus características (Figura 1.C)



Microsoft Excel

Figura 1. Comportamiento porcentual de la población de microorganismos epífitos: A) totales aislados (global); B) aislados a partir de muestras de plantas asintomáticas; C) aislados a partir de muestras de plantas sintomáticas. Poás, Alajuela, 2009.

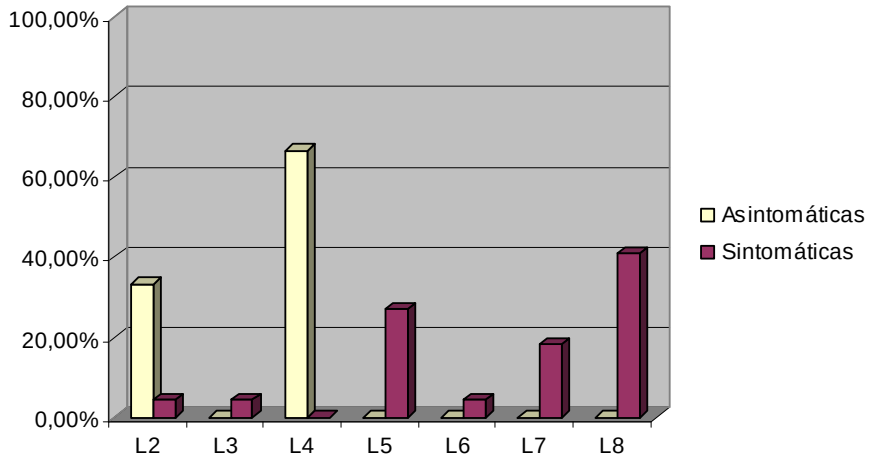
Dentro de los géneros bacterianos aislados a partir de plantas sintomáticas se encontró una mayor cantidad de organismos del género *Chryseobacterium*. En el caso de las plantas asintomáticas la diversidad bacteriana fue mucho menor y el porcentaje más representativo lo compartieron los microorganismos identificados como *Bacillus amyloliquefaciens* y *Chryseobacterium sp. (*Figura 2)



Microsoft Excel

Figura 2. Distribución porcentual de los aislados bacterianos epífitos en muestras asintomáticas y sintomáticas de Poás.

En los aislamientos levaduriformes obtenidos también se presentó una mayor diversidad para el caso de las plantas sintomáticas, al contrario que para las asintomáticas en las cuales los aislamientos pertenecieron solo a dos tipos distintos de levaduras (Figura 3)

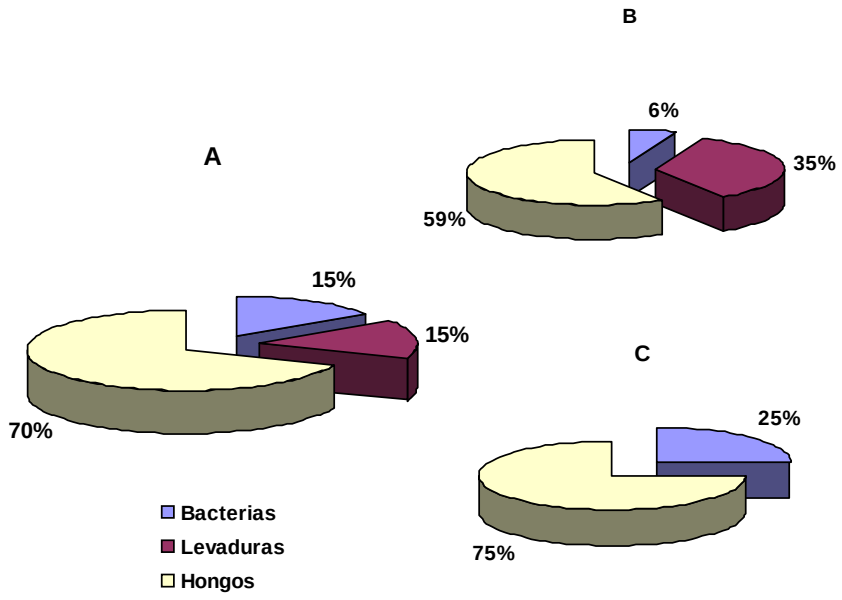


Microsoft Excel

Figura 3. Distribución porcentual de los aislados levaduriformes epífitos en muestras asintomáticas y sintomáticas de Poás.

Para el caso del aislamiento de epifitos en plantas asintomáticas y sintomáticas de “Crespera” de la finca de Aserrí, se obtuvo un total de 39 aislamientos (bacterias, levaduras y hongos en conjunto). En la figura 4.A se observa el valor porcentual de cada grupo de microorganismo dentro de la población total recuperada en la zona.

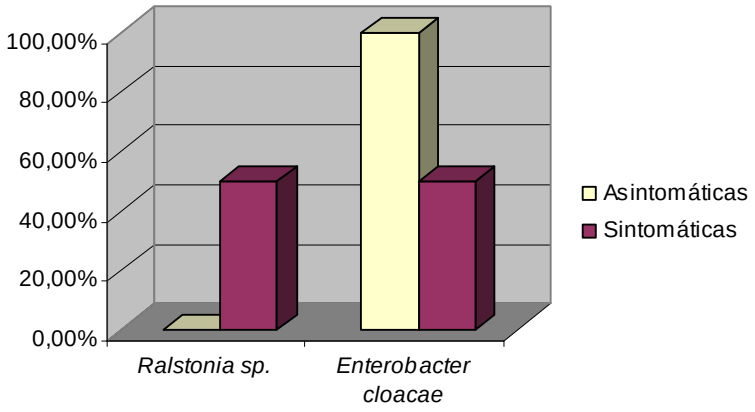
En el caso de los microorganismos aislados a partir de plantas asintomáticas de “Crespera”, se da una predominancia de los aislamientos fúngicos seguidos de las levaduras y por último las bacterias (Figura 4.B), por otro lado, a partir de las muestras de plantas sintomáticas no se logró recuperar ningún aislamiento levaduriforme, siendo obtenidas solamente bacterias y hongos como epífitos como se muestra en la figura 4.C.



Microsoft Excel

Figura 4. Comportamiento porcentual de la población de microorganismos epífitos: A) totales aislados (global); B) aislados a partir de muestras de plantas asintomáticas; C) aislados a partir de muestras de plantas sintomáticas. Aserrí, San José, 2009.

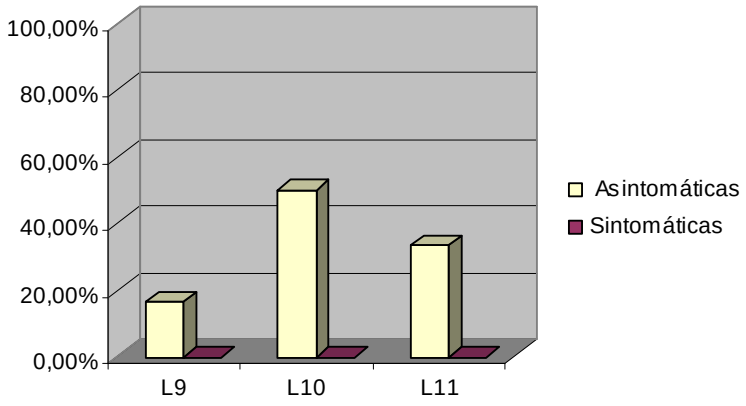
En la figura 5 se observa como los aislamientos bacterianos epífitos para muestras asintomáticas quedaron representados en este caso en un 100% por el microorganismo *Enterobacter cloacae* y para el caso de muestras sintomáticas se repartieron en partes iguales el porcentaje los microorganismos *Ralstonia sp.* y *Enterobacter cloacae*.



Microsoft Excel

Figura 5. Distribución porcentual de los aislados bacterianos epífitos en muestras asintomáticas y sintomáticas de Aserrí.

En el caso de las levaduras estas se presentaron como epífitos solo en muestras de plantas asintomáticas, siendo divididos los porcentajes en 3 ID diferentes como lo muestra la figura 6.



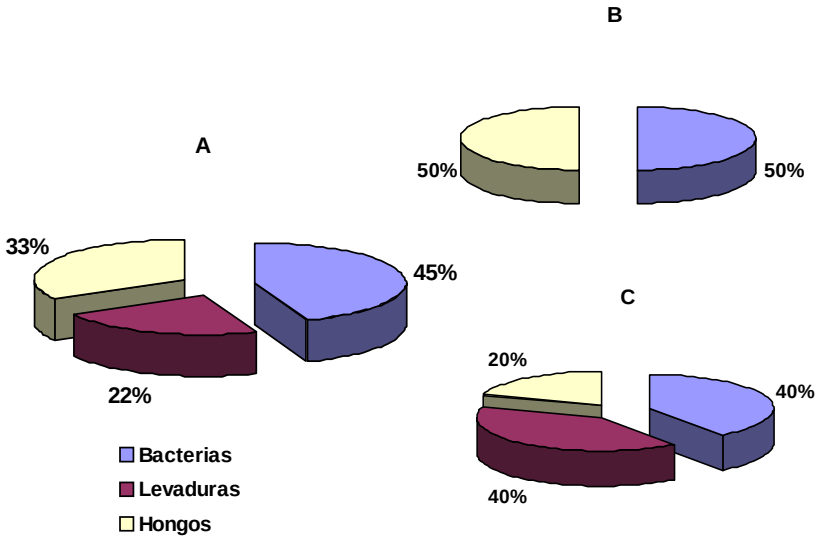
Microsoft Excel

Figura 6. Distribución porcentual de los aislados levaduriformes epífitos en muestras asintomáticas y sintomáticas de Aserrí.

1.2 Obtención de microorganismos endófitos a partir del material colectado en campo.

Para la enfermedad de “Ojo de gallo” en el aislamiento de endófitos mediante el protocolo empleado se obtuvo que la cantidad de microorganismos recuperados fue mucho menor que para el caso de los epífitos, se logró obtener un total de 9 aislamientos- entre bacterias, levaduras y hongos- a partir de muestras asintomáticas y sintomáticas (Figura 7.A).

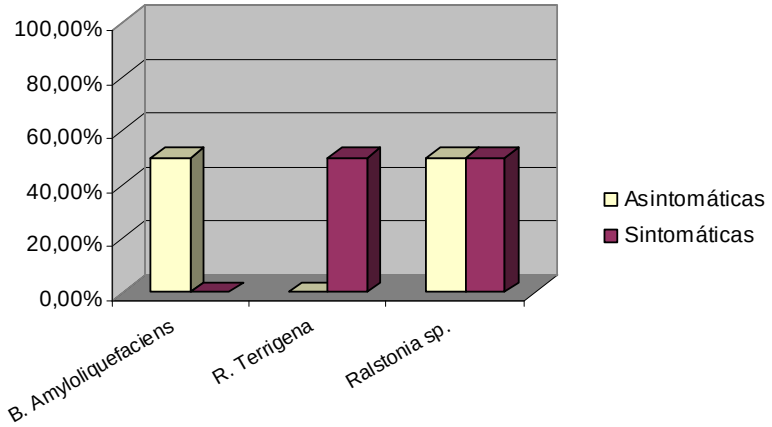
En las muestras asintomáticas se obtuvo en igual porcentaje aislamientos bacterianos y fúngicos, haciéndose ausentes las levaduras como microorganismos endófitos en este caso. (Figura 7.B). Para el caso de las plantas sintomáticas el 80% de la población estuvo compuesta en partes iguales por los aislamientos levaduriformes y los bacterianos, correspondiendo en este caso un 20% a los aislamientos fúngicos. (Figura 7.C).



Microsoft Excel

Figura 7. Comportamiento porcentual de la población de microorganismos endófitos: A) totales aislados (global); B) aislados a partir de muestras de plantas asintomáticas; C) aislados a partir de muestras de plantas sintomáticas. Poás, Alajuela, 2009.

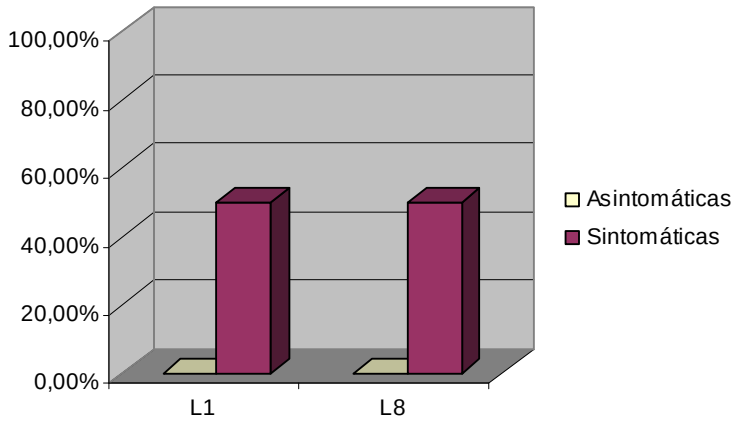
Los aislamientos bacterianos estuvieron representados en plantas asintomáticas de “Ojo de gallo” por *Bacillus amyloliquefaciens* y *Ralstonia sp*. Por otro lado, los aislamientos en plantas sintomáticas correspondieron a *Raoutella terrigena* y *Ralstonia sp*. (Figura 8)



Microsoft Excel

Figura 8. Distribución porcentual de los aislados bacterianos endófitos en muestras asintomáticas y sintomáticas de Poás.

La presencia de aislamientos levaduriformes solo se observó en las muestras obtenidas a partir de plantas con sintomatología de “Ojo de gallo”, siendo los mismos ausentes como microorganismos endófitos en plantas asintomáticas. (Figura 9)

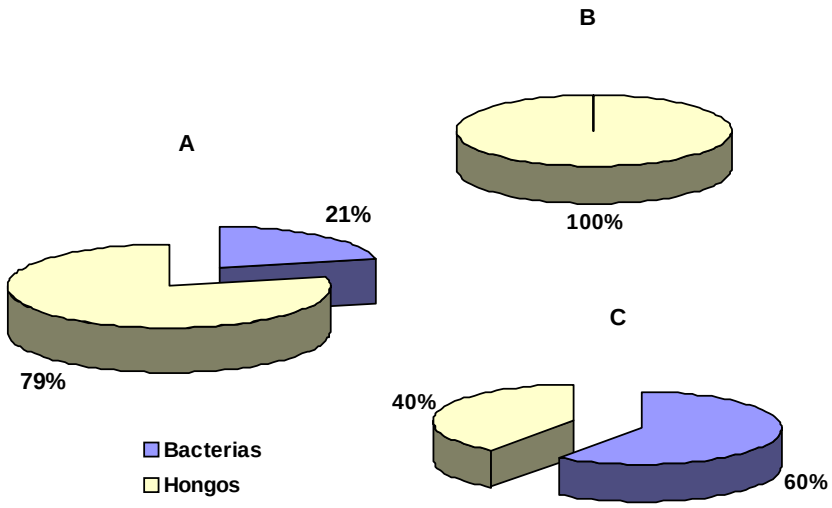


Microsoft Excel

Figura 9. Distribución porcentual de los aislados levaduriformes endófitos en muestras asintomáticas y sintomáticas de Poás.

Para la finca con presencia de síntomas de “Crespera”, la población total obtenida de microorganismos endófitos correspondió a un total de 14 aislados (bacterias y hongos en conjunto) entre las muestras de plantas asintomáticas y sintomáticas (Figura 10.A)

Como se observa en la figura 10.B, para las muestras de plantas asintomáticas solo se logró aislar hongos como endófitos, en contraste con lo observado para las muestras de plantas sintomáticas donde se obtuvo un 60% de aislamientos bacterianos y en un 40% de aislamientos fúngicos, quedando ausentes las levaduras (Figura 10.C)

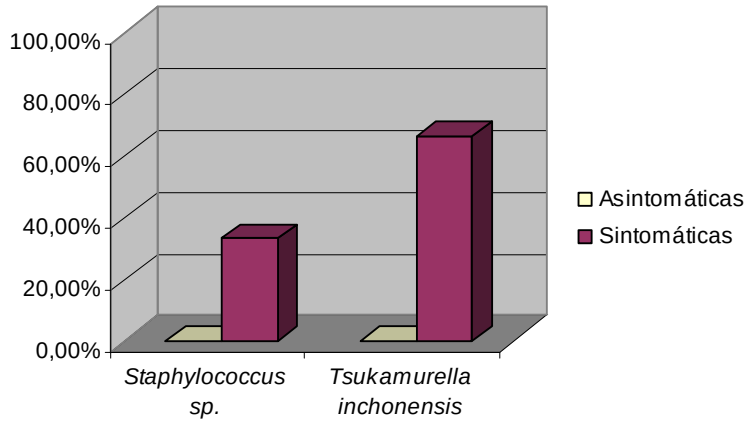


Microsoft Excel

Figura 10. Comportamiento porcentual de la población de microorganismos endófitos: A) totales aislados (global); B) aislados a partir de muestras de plantas asintomáticas; C) aislados a partir de muestras de plantas sintomáticas. Aserrí, San José, 2009.

En las muestras de la zona de Aserrí, solo se aisló bacterias endófitas a partir de plantas sintomáticas de Crespera correspondiendo a *Staphylococcus sp*. un

33,33% de los aislados y a *Tsukamurella inchonensis* un 66,67 % de los mismos, como lo muestra la figura 11.



Microsoft Excel

Figura 11. Distribución porcentual de los aislados bacterianos endófitos en muestras asintomáticas y sintomáticas de Aserrí.

1.3 Identificación de los microorganismos aislados.

A. Aislamientos bacterianos.

Los aislamientos bacterianos obtenidos a partir tanto de muestras de la zona de Poás como de Aserrí, fueron comparados entre sí y posteriormente clasificados en ID B1 a B13 según sus características morfológicas como se representa en cuadro 1, para su posterior identificación a nivel de género y en el caso de ser posible a nivel de especie.

Cuadro 1. Características morfológicas de los aislados bacterianos obtenidos a partir de muestras de Poás y Aserrí.

ID	Forma	Superficie	Elevación	Margen	Estructura interna	Consistencia	Cromogénesis en PDA
B1	Irregular	Rugosa	Elevada en el centro	Lobulado	transparente	Membranosa	Incolora
B2	Circular	Rugosa	Difusa	Entero	Opaca	Mantecosa	Blanca turbia
B3	Circular	Lisa	Difusa	Entero	transparente	Mantecosa	Amarillenta
B4	Circular	Lisa	Difusa	Entero	Opaca	Mantecosa	Color amarillo crema
B5	Irregular	Rugosa	Elevada en el centro	Lobulado	transparente	Membranosa	Amarillo casi imperceptible
B6	Circular	Lisa	Difusa	Entero	transparente	Membranosa	Amarillo intenso
B7	Circular	Lisa	Difusa	Entero	Opaca	Viscosa	Blanco
B8	Circular	Rugosa	Ligeramente convexa	Entero	transparente	Membranosa	Rosado intenso
B9	Circular	Lisa	Difusa	Entero	Opaca	Viscosa	Amarillo claro
B10	Irregular	Lisa	Ligeramente convexa	Ondulado	Opaca	Viscosa	Blanca amarillenta
B11	Circular	Lisa	Difusa	Entero	transparente	Mantecosa	Amarillenta
B12	Circular	Lisa	Ligeramente convexa	Entero	transparente	Mantecosa	Amarillenta
B13	Circular	Lisa	Convexa	Entero	Opaca	Viscosa	Amarilla fosforescente

El registro fotográfico de los aislamientos bacterianos obtenidos entre las dos zonas de muestreo, tanto la que presentaba síntomas de "Ojo de gallo" como la que presentaba síntomas de "Crespera", se presenta en el Apéndice 2 donde se

Microsoft Word

indica el código e identificación de cada microorganismo así como el objetivo de observación de los mismos.

i. Identificación bioquímica de bacterias gram negativas y gram positivas no esporuladas con ayuda del sistema BIOLOG®

Para el caso de Poás, se sometió a identificación 6 aislamientos bajo este sistema, pudiéndose identificar casi la totalidad de los mismos a excepción del correspondiente al ID B11. En el cuadro 2 se presenta la identificación de los aislados bacterianos gram negativos y gram positivos no esporulados mediante el sistema BIOLOG, así como la condición en que se aislaron ya fuese como epífitos o endófitos en plantas asintomáticas o sintomáticas de “Ojo de Gallo”.

Cuadro 2. Identificación de bacterias aisladas a partir de muestras de la finca con sintomatología de “Ojo de gallo” mediante el sistema BIOLOG y origen de los aislados.

		Presencia en muestras			
		Asintomáticas		Sintomáticas	
Código	Identificación	Endófitos	Epífitos	Endófitos	Epífitos
B2	*Raoultella terrigena*			x	
B3	*Chryseobacterium sp.*		x		x
B4	*Staphylococcus sp.*		x		
B8	*Ralstonia sp.*	x		x	x
B9	*Pediococcus sp.*				x
B11	Bacilos gram positivos				x

Microsoft Excel

Para las plantas asintomáticas y sintomáticas de “Crespera” se encontró correspondencia de dos aislamientos obtenidos con respecto a los de ID B4 y B8 que ya habían sido identificados previamente cuando se procesaron las bacterias obtenidas a partir de las muestras de Poás. Por otra parte, los microorganismos con ID B12 y B13 aislados únicamente en muestras de Aserrí fueron identificados sin ningún problema por medio de BIOLOG. En el cuadro **3** se muestra la identificación final de cada bacteria así como su procedencia.

Cuadro 3. Identificación de bacterias aisladas a partir de muestras de la finca con sintomatología de “Crespera” mediante el sistema BIOLOG y origen de los aislados.

		Presencia en muestras			
		Asintomáticas		Sintomáticas	
Código	Identificación	Endófitos	Epífitos	Endófitos	Epífitos
B4	*Staphylococcus sp.*			x	
B8	*Ralstonia sp.*				x
B12	*Enterobacter cloacae*		x		x
B13	*Tsukamurella inchonensis*			x	

Microsoft Excel

ii. Identificación de bacterias gram positivas esporuladas con la ayuda del sistema VITEK®

De las bacterias gram positivas esporuladas obtenidas a partir de la finca con sintomatología de “Ojo de gallo” ubicada en Poás, se logró identificar las correspondientes a los ID B1 y B5. Por otro lado, los microorganismos de ID B6, B7 y B10 no pudieron ser identificados. En el cuadro 4 se resume la identificación de los microorganismos sometidos al sistema VITEK® así como la condición en que se aislaron ya fuese como epífitos o endófitos en plantas asintomáticas o sintomáticas.

Cuadro 4. Identificación de bacterias aisladas a partir de muestras de la finca con sintomatología de “Ojo de gallo” mediante el sistema VITEK® y origen de los aislados.

		Presencia en muestras			
		Asintomáticas		Sintomáticas	
Código	Identificación	Endófitos	Epífitos	Endófitos	Epífitos
B1	*Bacillus Amyloliquefaciens*	x	x		x
B5	*Bacillus sp.*		x		
B6	Gram positivos esporulados, esporas terminales				x
B7	Bacilos gram positivos esporulados				x
B10	Bacilos gram positivos esporulados				x

Microsoft Excel

A partir de las muestras de la finca con sintomatología de “Crespera” no se logró aislar ninguna bacteria perteneciente al grupo de los gram positivos esporulados por lo cual no fue necesario llevar a cabo identificación por medio del sistema VITEK®.

B. Aislamientos fúngicos.

Se obtuvo una gran cantidad de aislamientos fúngicos a partir de las muestras de Poás, los cuales se clasificaron en ID H1 a H21 según características morfológicas como color y forma de crecimiento en placa así como por la observación y comparación de sus estructuras al microscopio óptico. En este caso, se logró identificar varios aislamientos correspondientes al género *Cladosporium*, los mismos agrupados como diferentes debido a la comparación de características morfológicas observadas y sus estructuras reproductivas. Los demás aislamientos obtenidos no presentaron ninguna estructura que permitiera su identificación aún cuando se sometieron a diferentes condiciones para estimular la esporulación. El cuadro 5 presenta la identificación de los hongos aislados así como la condición en que se obtuvieron (epífitos o endófitos, en plantas asintomáticas o sintomáticas).

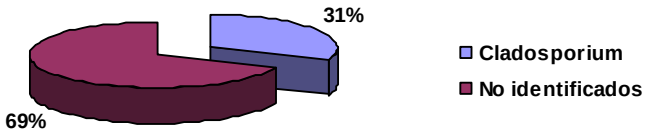
Cuadro 5. Identificación de los aislados fúngicos obtenidos a partir de muestras de la finca con sintomatología de “Ojo de gallo” y su origen.

		Presencia en muestras			
		Asintomáticas		Sintomáticas	
Código	Identificación	Endófitos	Epífitos	Endófitos	Epífitos
H1	No identificado				x
H2	No identificado				x
H3	No identificado				x
H4	*Cladosporium sp*				x
H5	No identificado				x
H6	No identificado				x
H7	*Cladosporium sp*				x
H8	No identificado				x
H9	No identificado				x
H10	No identificado				x
H11	No identificado				x
H12	*Cladosporium sp*				x
H13	No identificado				x
H14	*Cladosporium sp*				x
H15	*Cladosporium sp*		x		
H16	*Cladosporium sp*		x		
H17	No identificado		x		
H18	No identificado	x			
H19	No identificado	x			
H20	No identificado			x	
H21	No identificado				x

Microsoft Excel

En el Apéndice 3 aparece el registro fotográfico de los aislamientos fúngicos obtenidos ordenados por ID, donde se muestra el crecimiento en placa de los mismos así como las estructuras observadas bajo el microscopio óptico.

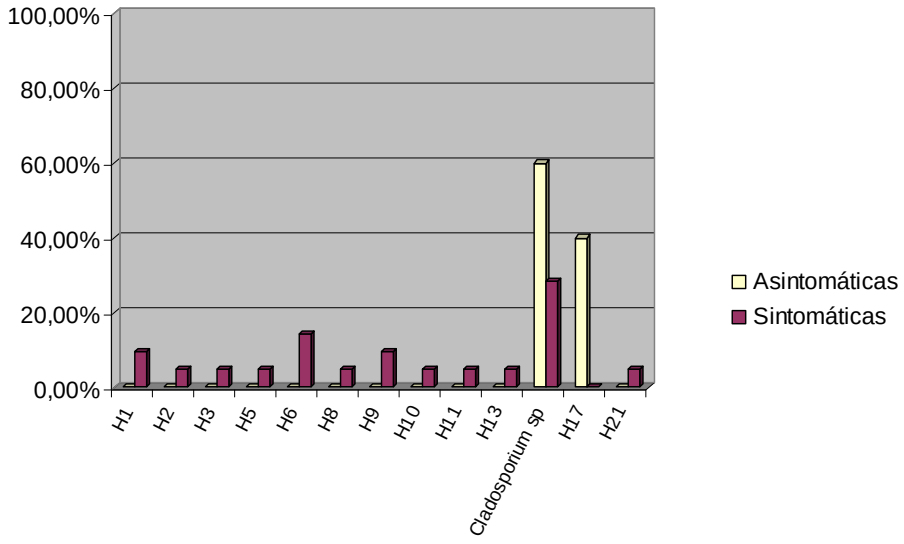
A nivel global, los aislamientos obtenidos a partir de muestras de la finca de Poás presentaron una predominancia de los hongos no esporulados como se observa en la figura 12.



Microsoft Excel

Figura 12. Distribución porcentual global de los aislados fúngicos obtenidos a partir de muestras de la finca de Poás con sintomatología de “Ojo de gallo”.

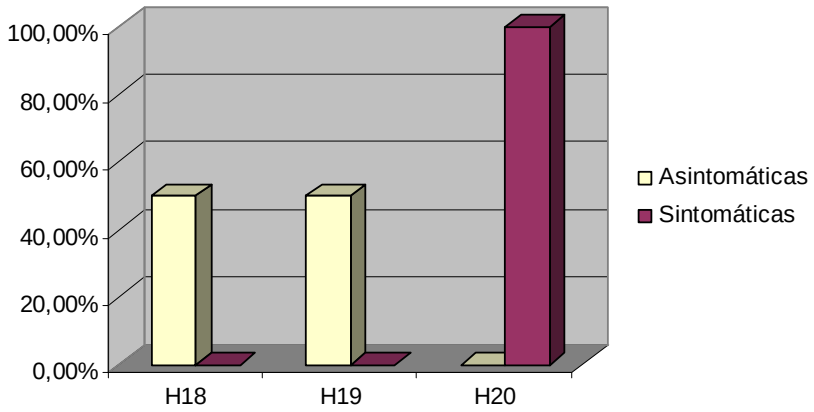
Para el caso de los hongos epífitos aislados a partir de muestras asintomáticas de “Ojo de gallo”, estos se vieron representados únicamente por dos grupos siendo el mayor porcentaje correspondiente al género *Cladosporium.* En el caso de las muestras sintomáticas, se ve que hay una mayor diversidad de aislamientos, siendo más representativos los pertenecientes a *Cladosporium sp* (Figura 13)



Microsoft Excel

Figura 13. Distribución porcentual de los aislamientos fúngicos epífitos obtenidos a partir de muestras asintomáticas y sintomáticas de “Ojo de gallo”.

Los hongos endófitos aislados en la finca con sintomatología de “Ojo de gallo” quedaron representados por dos grupos en el caso de muestras asintomáticas y un único grupo en el caso de las sintomáticas, como se observa en la figura 14.



Microsoft Excel

Figura 14. Distribución porcentual de los aislamientos fúngicos endófitos obtenidos a partir de muestras asintomáticas y sintomáticas de “Ojo de gallo”.

Además, a partir de las muestras de la finca de Poás se logró aislar varios microorganismos correspondientes a levaduras. Siendo clasificados como tales luego de la comprobación de las estructuras características observadas al microscopio óptico. En el caso de este tipo de aislados no se llevó a cabo la identificación sin embargo, se realizó una caracterización morfológica de los mismos como se muestra en el cuadro 6.

Cuadro 6. Caracterización morfológica de los aislamientos levaduriformes obtenidos a partir de muestras de la finca de Poás.

ID	Forma	Superficie	Elevación	Margen	Estructura interna	Consistencia	Cromogénesis en PDA
L1	Circular	Rugosa	Difusa	Entero	Opaca	Mantecosa/ Quebradiza	Verde
L2	Circular	Lisa	Difusa	Entero	Opaca	Mantecosa	Rosado
L3	Circular	Lisa	Ligeramente convexa	Entero	Concéntrica/ Opaca	Mantecosa	Rosado muy claro
L4	Irregular	Rugosa	Difusa	Filamentoso	Filamentosa/ Opaca	Membranosa/ quebradizo	Crema con borde verde
L5	Irregular	Rugosa	Difusa	Filamentoso	Opaca	Mantecosa	Crema con borde verde
L6	Irregular	Rugosa	Difusa	Filamentoso	Opaca	Mantecosa	Amarillo crema con borde verde
L7	Irregular	Rugosa	Difusa	Filamentoso	Filamentosa/ Opaca	Mantecosa	Rosado claro, con borde verde
L8	Circular	Lisa	Convexa	Entero	Filamentosa/ Opaca	Viscosa	Blanca

El registro fotográfico de los aislamientos levaduriformes obtenidos se presenta en el Apéndice 4 indicando el código así como el objetivo de observación de cada microorganismo.

Microsoft Word

En el cuadro 7 se resume las condiciones en que se obtuvo cada aislamiento levaduriforme ya fuese como epífito o endófito y en plantas asintomáticas o sintomáticas.

Cuadro 7. Resumen del origen de los aislamientos levaduriformes obtenidos a partir de muestras de la finca con sintomatología de “Ojo de gallo”.

		Presencia en muestras			
		Asintomáticas		Sintomáticas	
Código	Identificación	Endófitos	Epífitos	Endófitos	Epífitos
L1	Levadura			x	
L2	Levadura		x		x
L3	Levadura				x
L4	Levadura.		x		
L5	Levadura.				x
L6	Levadura.				x
L7	Levadura.				x
L8	Levadura			x	x

Microsoft Excel

Por otra parte, a partir de las muestras de la finca con sintomatología de “Crespera” ubicada en Aserrí se logró aislar gran diversidad de hongos distintos a los aislados en las colectas realizadas en Poás, clasificados en ID H22 a H35. Además, se obtuvieron aislamientos fúngicos que correspondieron en sus características (color, forma crecimiento en placa y estructuras observadas al microscopio óptico) a los de ID H7, H14 y H21 aislados previamente en la zona de Poás. Para este caso se identificó también varios aislamientos correspondientes al género *Cladosporium* distintos entre sí por la comparación morfológica y estructuras observadas al microscopio óptico. Los aislamientos restantes obtenidos no desarrollaron ninguna estructura característica que pudiese ayudar a su identificación aún cuando fueron sometidos a diferentes condiciones para estimular la formación de las mismas. En el cuadro 8 se resumen tanto la identificación de cada microorganismo así como su origen dentro de las muestras.

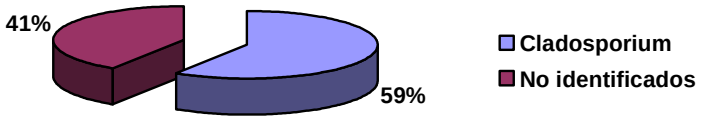
Cuadro 8. Identificación de los aislados fúngicos obtenidos a partir de muestras de la finca con sintomatología de “Crespera” y su origen.

		Presencia en muestras			
		Asintomáticas		Sintomáticas	
Código	Identificación	Endófitos	Epífitos	Endófitos	Epífitos
H7	*Cladosporium sp*	x			
H14	*Cladosporium sp*	x	x	x	x
H21	No identificado	x	x		
H22	*Cladosporium sp*		x		
H23	*Cladosporium sp*		x		
H24	No identificado		x		
H25	*Cladosporium sp*		x		
H26	No identificado (esporas filiformes)		x		
H27	No identificado				x
H28	*Cladosporium sp*				x
H29	No identificado				x
H30	*Cladosporium sp*				x
H31	No identificado (estructuras globosas)	x			
H32	*Cladosporium sp*	x			
H33	No identificado	x			
H34	No identificado (estructuras globosas)	x			
H35	*Cladosporium sp*	x	x	x	

Microsoft Excel

En el Apéndice 3 aparece el registro fotográfico de los aislamientos fúngicos obtenidos ordenados por ID, donde se muestra el crecimiento en placa de los mismos así como las estructuras observadas bajo el microscopio óptico.

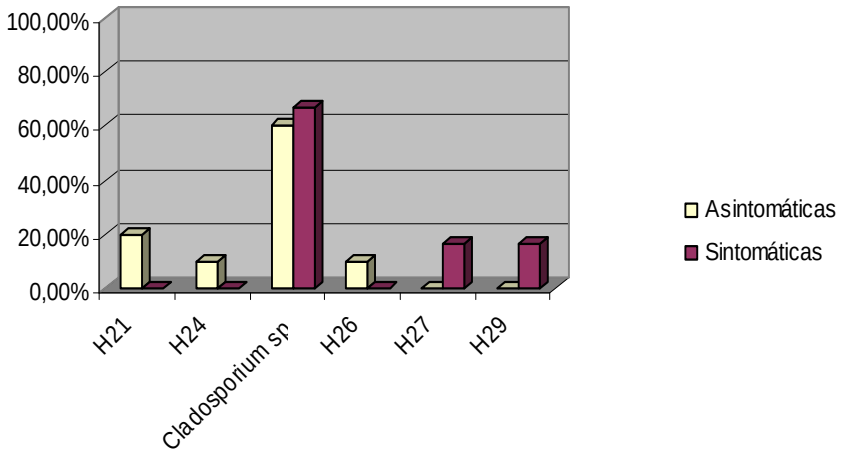
En el comportamiento de la población global de los hongos aislados en la zona de Aserrí se dio una predominancia de los individuos del género *Cladosporium* en comparación con los hongos no esporulados obtenidos, tal y como se observa en la figura 15.



Microsoft Excel

Figura 15. Distribución porcentual global de los aislados fúngicos obtenidos a partir de la finca de Aserrí con sintomatología de “Crespera”.

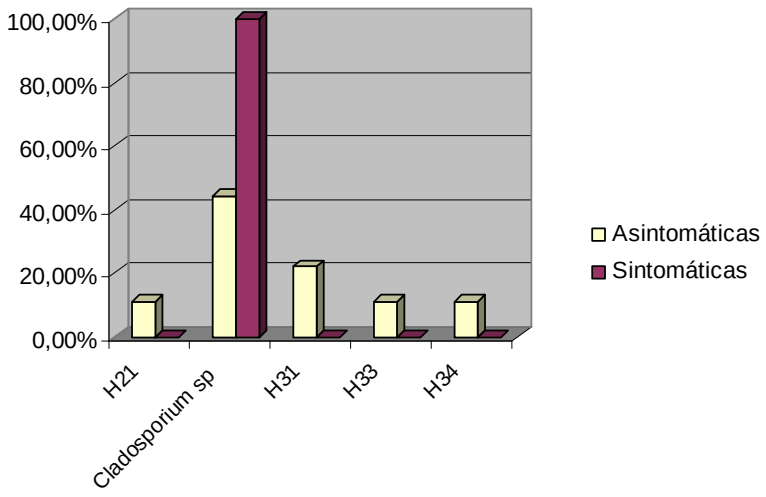
Como se muestra en la figura 16 la diversidad de aislamientos fúngicos epífitos entre muestras asintomáticas y sintomáticas de “Crespera” es muy similar, y en ambas el mayor porcentaje lo poseen los aislamientos pertenecientes al género *Cladosporium.*



Microsoft Excel

Figura 16. Distribución porcentual de los aislamientos fúngicos epífitos obtenidos a partir de muestras asintomáticas y sintomáticas de “Crespera”.

En la figura 17 se observa que la diversidad de hongos como endófitos es mucho mayor en las muestras asintomáticas de “Crespera” con respecto a las asintomáticas, predominando *Cladosporium sp.* en las primeras y representando la totalidad de los aislamientos en las segundas.



Microsoft Excel

Figura 17. Distribución porcentual de los aislamientos fúngicos endófitos obtenidos a partir de muestras asintomáticas y sintomáticas de “Crespera”.

A parte de los aislamientos fúngicos también se obtuvo varios aislados levaduriformes a partir de las muestras tomadas en la finca de Aserrí cuyas características morfológicas se describen dentro del siguiente cuadro.

El registro fotográfico de los aislamientos levaduriformes obtenidos se presenta en el Apéndice 4 indicando el código así como el objetivo de observación de cada microorganismo.

Cuadro 9. Caracterización morfológica de los aislamientos levaduriformes obtenidos a partir de muestras de la finca de Aserrí.

ID	Forma	Superficie	Elevación	Margen	Estructura interna	Consistencia	Cromogénesis en PDA
L9	Circular	Rugosa	Difusa	Entero	Opaca	Membranosa/ quebradizo	Anaranjada
L10	Irregular	Lisa	Ligeramente convexa	Entero	Opaca	Mantecosa	Rosado muy claro
L11	Irregular	Rugosa	Difusa	Filamentoso	Opaca	Membranosa	Crema con borde verde

Microsoft Word

En el cuadro 10 se resume las condiciones en que se obtuvo cada aislamiento levaduriforme ya fuese como epífito o endófito y en planas asintomáticas o sintomáticas de “Crespera”.

Cuadro 10. Resumen del origen de los aislamientos levaduriformes obtenidos a partir de de muestras de la finca con sintomatología de “Crespera”.

.

		Presencia en muestras			
		Asintomáticas		Sintomáticas	
Código	Identificación	Endófitos	Epífitos	Endófitos	Epífitos
L9	Levadura		x		
L10	Levaduras		x		
L11	Levadura.		x		

Microsoft Excel

2. Pruebas *in vitro* del Potencial Biocontrolador de los microorganismos aislados contra *Mycena citricolor* (Ojo de gallo).

2.1 Selección de microorganismos con Potencial Biocontrolador

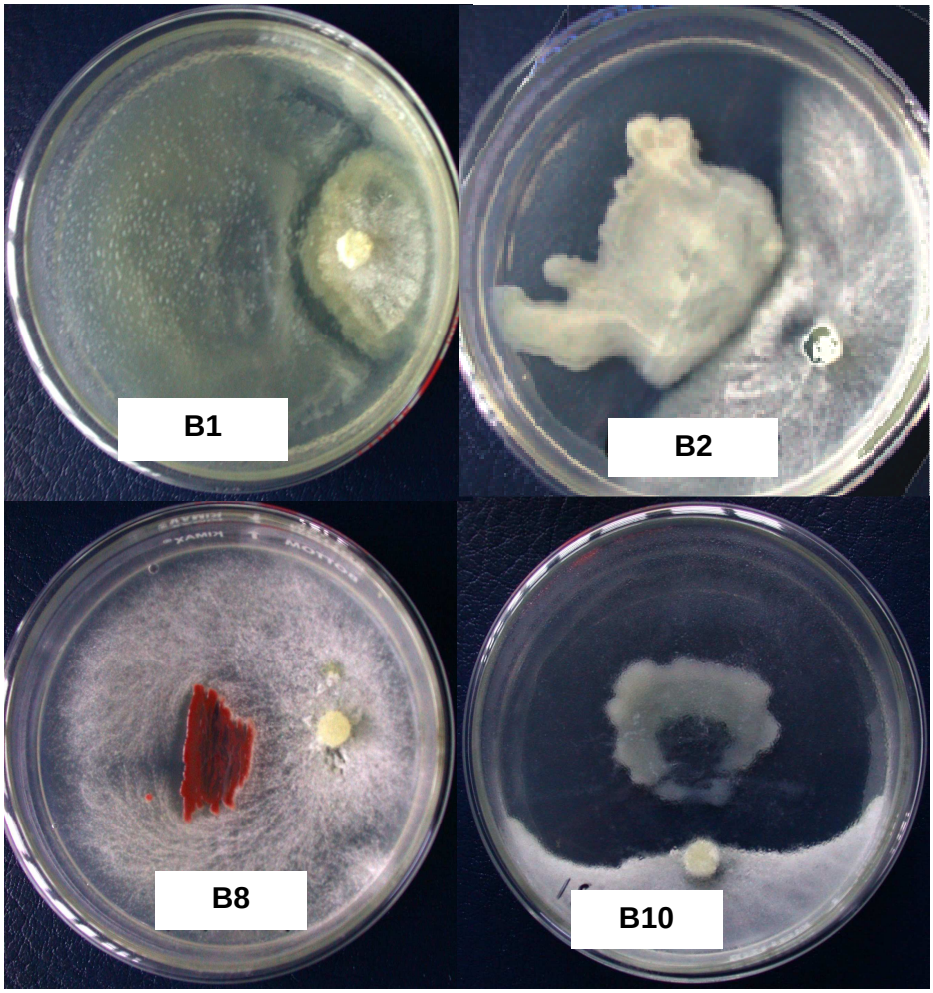
Para las pruebas de biocontrol *in vitro*, el primer grupo de microorganismos analizado estuvo compuesto por un total de 13 aislamientos bacterianos y 11 aislamientos levaduriformes. El segundo grupo en ser ensayado constó de un total de 35 aislamientos fúngicos.

A. Pruebas de antagonismos de los aislamientos bacterianos y levaduriformes

Del total de aislamientos ensayados contra *M.citricolor* solo mostraron un aparente efecto inhibitorio del crecimiento del hongo cuatro de ellos. Los aislamientos correspondieron a cuatro microorganismos bacterianos de ID B1, B2, B8 y B10 todos obtenidos únicamente a partir de muestras de plantas de la

zona de Poás, a excepción del aislamiento B8 presente también en muestras de plantas de la zona de Aserrí.

Una vez realizadas pruebas confirmatorias en placas con medio PDA se descartó los aislamientos B8 y B1 identificados como *Ralstonia sp*. y *Bacillus Amyloliquefaciens*. Los aislamientos B2 correspondiente a *Raoultella terrigena* y el B10 clasificado como bacilo gram positivo esporulado, fueron los que presentaron cierta inhibición del crecimiento de *M. citricolor* cepa My1, siendo el que tuvo una acción más significativa el de ID B10. Los resultados observados se muestran en la figura 18.

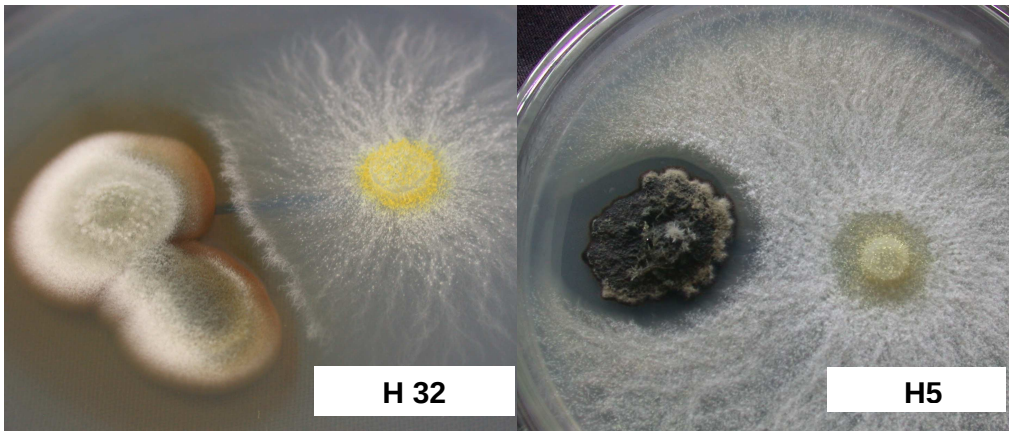


Microsoft Word

Figura 18. Ensayos *in vitro* sobre medio PDA de aislados bacterianos contra la cepa My1 de *M.citricolor*. Observación a los 15 días de incubación.

B. Pruebas de antagonismos de los aislamientos fúngicos

Para el caso de los aislamientos fúngicos, las pruebas en placas con medio PDA demostraron que no había una verdadera actividad antagónica contra *M.citricolor* por parte de los aislados. Sin embargo, el aislamientos de ID H5 - no identificado- obtenido de muestras de Poás y el aislamiento H32- identificado como *Cladosporium sp.*- obtenido de muestras de Aserrí, presentaron un aparente halo de inhibición del crecimiento del hongo, no permitiendo así el crecimiento del mismo sobre ellos contrastando con lo observado para el caso de los demás aislamientos fúngicos ensayados (Figura 19).



Microsoft Word

Figura 19. Observación de un aparente halo de inhibición del crecimiento de la cepa My1 de *M.citricolor* en presencia de los aislamientos fúngicos H32 y H5.

DISCUSIÓN

1. Identificación de microorganismos epífitos y endófitos en plantas sintomáticas y asintomáticas de “Ojo de Gallo” y de “Crespera”.

1.1 Obtención de microorganismos epífitos a partir del material colectado en campo

La metodología que fue empleada para el aislamiento de los microorganismos epífitos en este trabajo, permitió llevar a cabo el aislamiento de una población global de 84 microorganismos –bacterias, hongos y levaduras en conjunto- entre muestras asintomáticas y sintomáticas de “Ojo de gallo” en la zona de Poás, contra un total de 39 aislamientos obtenidos como epífitos a partir de plantas asintomáticas y sintomáticas de “Crespera” en la zona de Aserrí.

En otros estudios se ha encontrado diferencias en la cantidad de aislamientos obtenidos entre sitios de muestreo distintos, por ejemplo, Bayman y Santamaría (2005) encontraron diferencias entre las poblaciones de hongos epífitos en hojas de plantas de café sanas entre locaciones y Carcache (2002) logró aislar diferentes cantidades promedio (entre muestras de estratos superior, medio y bajo) de hongos y bacterias epífitos a partir de muestras de dos fincas de café, una orgánica y una convencional, siendo más abundantes las colonias bacterianas en la primera y las fúngicas en la segunda.

Las diferencias obtenidas entre las dos zonas de muestreo para este caso podrían ser producto de las condiciones ambientales distintas en cada una o a la presencia de inóculo (Andrews y Harris, 2000). Según Montesinos y col. (2002) parámetros ambientales como temperatura y humedad superficial afectan fuertemente la vida microbiana epifítica, determinando características como la

taza de crecimiento, la germinación, la taxis y otros procesos esenciales para la colonización de la filósfera.

En la zona de Poás donde estaba presente el “Ojo de Gallo” se obtuvo de manera global una relativa predominancia de los aislamientos bacterianos en la superficie de las hojas (Figura 1). Por otro lado, en la zona de Aserrí con infestaciones de “Crespera” predominaron muy notablemente los aislamientos fúngicos (Figura 4)

El comportamiento de mayor abundancia de las bacterias como epífitos observado en la zona de Poás, podría ser explicado teniendo en cuenta lo expuesto por Andrews y Harris (2000) y Lindow y Brandl (2003) quienes apuntan a que las bacterias podrían tener una ventaja competitiva con respecto a la colonización de la filósfera frente a los demás microorganismos, ya que se ha encontrado que la presencia de células bacterianas en las hojas oscila entre 10^6 y 10^7 células/cm^2. Por otra parte, Beattie y Lindow (1995) apuntan a que la muerte de microorganismos sobre la superficie de las plantas es mayor bajo condiciones de alta radiación UV, temperaturas altas, baja humedad relativa y baja disponibilidad de humedad libre; esto sumado al hecho de que muchas bacterias en la filósfera son no formadoras de esporas (Ercolani, 1978 citado por Hirano y Upper, 2000) podría suponer una predominancia de aislados fúngicos bajo dichas condiciones las cuales son relativamente similares a las de la zona de Aserrí donde se llevaron a cabo los muestreos.

En un estudio previo llevado a cabo en plantas de café donde se aisló la microflora epífita de las hojas se encontró una predominancia de asilados levaduriformes, seguidos de las bacterias y por último los hongos dentro de la población global (53,91%, 8,13% y 37,96% respectivamente) (Waller y Masaba, 2006). Estos resultados que difieren con lo observado en las dos zonas muestreadas para efectos del presente trabajo reafirman el argumento de Fokkema y Schipper (1987) citados por Carcache (2002) quienes apuntan que el patrón de comportamiento de las poblaciones microbianas sobre la filósfera se ve

alterado por efectos locales (prácticas de cultivo, grado de infestación de insectos y eventos climáticos entre otros).

Tanto para el caso de las muestras de Poás como de Aserrí, se observó que las poblaciones bacterianas globales se vieron conformadas por una mayoría de aislados presentando el desarrollo de pigmentación sobre medio PDA. Esta observación concuerda con los resultados obtenidos por Waller y Masaba (2006) quienes obtuvieron un mayor porcentaje de bacterias pigmentadas con respecto a las no pigmentadas (7,31% y 0,82%, respectivamente) a partir de la superficie de hojas de plantas de café. En su trabajo además, dicho comportamiento de abundancia de unas bacterias con respecto de las otras se mantuvo de manera similar tanto al aislar estos microorganismos a partir de muestras de tallo como en muestras de frutos. Con respecto a esto, algunos autores han reportado que una característica común de la microflora de la filósfera es la presencia abundante de especies bacterianas cromogénicas, lo cual supone una posible ventaja competitiva o selectiva de la producción de pigmentos a favor de los microorganismos que ocupan un habitad tan expuesto a la radiación solar (Sundin y Jacobs, 1999).

Para el caso de la zona de Poás, se observó una predominancia de los aislados bacterianos, seguidos de los fúngicos y con porcentajes menores las levaduras recuperados tanto de muestras de plantas asintomáticas como de sintomáticas. No obstante, se obtuvo una mayor diversidad tanto de los aislamientos bacterianos como levaduriformes a partir de plantas sintomáticas frente a las plantas asintomáticas; con respecto a esto Carcache (2002) encontró una fuerte correlación entre el número de las colonias bacterianas obtenidas a partir de hojas y la incidencia de la enfermedad del “Ojo de Gallo” en el sitio de muestreo, lo cual explicaría la mayor diversidad bacteriana observada en muestras de plantas sintomáticas en el presente trabajo.

Los aislados obtenidos a partir de muestras asintomáticas y sintomáticas de la zona de Aserrí presentaron de manera individual una predominancia de hongos siendo menos frecuentes las bacterias en ambos casos y quedando ausentes los aislados levaduriformes en las muestras sintomáticas. El comportamiento de predominancia de los aislados fúngicos para cada una de las submuestras puede haber sido favorecido por las condiciones ambientales características del sitio de muestreo, las cuales al mismo tiempo pudieron resultar adversas para el establecimiento de las bacterias y las levaduras (Beattie y Lindow, 1995)

1.2 Obtención de microorganismos endófitos a partir del material colectado en campo

En el aislamiento de endófitos mediante el protocolo empleado la cantidad global de microorganismos recuperados para el caso de la zona de Poás fue similar a la población global en muestras de la zona de Aserrí correspondiendo a un total de 9 y 14 aislados (bacterias, hongos y levaduras en conjunto para cada caso) respectivamente. Para ambas zonas de muestreo, las cantidades de microorganismos recuperados como endófitos fueron menores comparadas con sus contrapartes epífitos. Esto es justificable si se piensa en el hecho de que solo unos cuantos microorganismos son capaces de llegar a colonizar los espacios internos de las hojas, las cuales son ambientes cerrados y de difícil acceso en contra parte con la superficie de las hojas donde pueden establecerse, ya sea de manera temporal o formando parte de la microflora normal, cantidad de microorganismos transportados por el aire, los insectos, o el agua de lluvia que lava y traslada inóculos de las partes superiores de la planta hacia las bajas o que salpica del suelo moviendo microorganismos hacia las partes aéreas. En un estudio realizado por Huang y col. (2008), quienes llevaron a cabo el aislamiento de hongos endófitos en plantas medicinales, se encontró ciertas correlaciones entre la química de las plantas (contenidos totales de fenoles y flavonoides) y los hongos aislados a partir de cada una. Con respecto a esto, dicho autor y su

equipo argumentan que la relación que se presenta entre el hospedero y un microorganismo endófito es muy compleja y que envuelve muchos factores.

En otros estudios en plantas de café, se ha encontrado una relación de abundancia en lo que respecta a los aislados fúngicos obtenidos como habitantes de la filósfera en comparación a los presentes como endófitos. Así por ejemplo, Bayman y Santamaría (2005) obtuvieron un total de 481 colonias de hongos epífitos contra un total de 340 colonias de endófitos a partir de muestras de hoja de plantas de café. Sin embargo, aunque sería posible esperar lo mismo para el caso de los microorganismos bacterianos (y por tanto para la población global integrada por ambos), no se encuentran reportes de estudios previos en los que se haya llevado a cabo dicho análisis.

En la zona de Poás donde se hacía presente el "Ojo de Gallo", se obtuvo como grupo más representativo dentro de la población las bacterias (Figura 7), sin embargo para el caso de la zona de Aserrí, presentando sintomatología de "Crespera", lo fueron los hongos (Figura 10).

Varios autores hacen mención de que la heterogeneidad espacial de los aislados fúngicos endófitos en el campo podría deberse en parte a diferencias en las condiciones ambientales, incluidas la humedad, la temperatura, la cantidad de lluvia, la presencia de fuentes potenciales de inóculo (Photita *et al.*, 2001), así como la alta competición microbiana y la inconsistencia de prácticas culturales (como la irrigación) (Zinniel *et al.*, 2002). Al tratarse de dos localidades distintas es lógico pensar en que los factores anteriores presentan diferencias entre los sitios, reflejándose ya sea de manera negativa o positiva en la capacidad de los hongos de colonizar los tejidos. Por otro lado, con respecto a la predominancia de los aislados bacterianos como endófitos en la zona de Poás, se podría pensar en la probabilidad de que el comportamiento de abundancia de las bacterias epífitas en relación con la incidencia de "Ojo de gallo" observado por Carcache (2002) se aplique también para este caso.

Al comparar entre plantas asintomáticas y sintomáticas de la zona de Poás, quizá la característica más importante es el hecho de que en las primeras resultaron ausentes por completo los aislamientos levaduriformes, representando un importante porcentaje para el caso de las plantas sintomáticas. Los hongos pueden existir ya sea en forma micelial o como levaduras, habiendo solo algunos que pueden existir en el ambiente en ambas formas (dimórficos). El paso de los hongos del estado micelial al levaduriforme y viceversa se ve determinado por la acción de un solo factor, varios factores o la combinación de los mismos; dentro de éstos se pueden citar la temperatura, la anegación, la presencia de dióxido de carbono o la disponibilidad de nutrientes (Deacon, 1990). La presencia de aislados levaduriformes dentro de plantas sintomáticas y su ausencia dentro de las asintomáticas podría deberse quizás a que las condiciones presentes en los tejidos internos de las primeras- talvez disponibilidad de nutrientes- favorecen en mayor grado dicha forma frente a la micelial, lo cual explicaría a su vez la relación porcentual en que se obtuvo cada uno (40% levaduras contra un 20% hongos filamentosos).

Para las muestras de la zona de Aserrí, se da una ausencia de las bacterias como endófitos de las plantas asintomáticas, las cuales representan el mayor porcentaje dentro de las sintomáticas. Por otra parte, en ambos casos no se obtuvo levaduras .En un estudio previo realizado por Chacón (2008) se obtuvo de igual manera aislamientos bacterianos a partir de plantas sintomáticas de “Crespera” lo cual justifica para este caso su presencia, además, logró aislar levaduras a partir de una metodología similar pero utilizando medios de cultivo distintos que posiblemente favorecieron la diferencia en los resultados obtenidos al ser comparados con la presente investigación.

1.3 Identificación de los microorganismos aislados

La clasificación morfológica previa de los microorganismos aislados permite ahorrar tiempo en la identificación posterior mediante métodos más exactos y que

implican una mayor dificultad, ya que se puede agrupar los microorganismos con características similares. La identificación de los aislados permite conocer los microorganismos presentes dentro de las microfloras (tanto de los endófitos como epífitos) y además, permite relacionar los protocolos de aislamiento empleados con la probabilidad de obtener cierto tipo de microorganismo a partir de las muestras cada vez que se emplee determinado protocolo.

A. Aislamientos bacterianos

Se logró identificar siete géneros diferentes de bacterias de los ocho desconocidos que se sometieron a identificación por el sistema de BIOLOG® (Cuadros 2 y 3). En contra parte, solo se logró identificar dos de los cinco aislados sometidos a identificación por medio del sistema VITEK® (Cuadro 4).

El sistema VITEK® es utilizado más comúnmente en la identificación de microorganismos de interés clínico, lo cual podría explicar en parte el hecho de que no se haya podido identificar los microorganismos de los códigos B6, B7 y B10. En este caso, la naturaleza de la consistencia de los cultivos bacterianos impidió llevar a cabo la preparación de las suspensiones de los mismos, las cuales eran necesarias para la inoculación de las tarjetas respectivas y por tanto para el análisis e identificación de los aislados por medio del equipo VITEK®. Además, la diversidad bacteriana es tan inmensa en el filoplano que es razonable pensar en la existencia de una gran cantidad de microorganismos que aún no han sido identificados y por lo tanto que no se encuentran reportados en las bases de datos.

Para el caso de la zona de Poás, los aislamientos epífitos obtenidos en mayor porcentaje para el caso de plantas asintomáticas fueron identificados como *Chryseobacterium sp* y *Bacillus amyloliquefaciens*, además se identificó los géneros *Staphylococcus* y *Bacillus* como epífitos en menores porcentajes (Figura 2). Dentro de los aislados para las planas sintomáticas, el género más

representativo fue *Chryseobacterium*, obteniéndose en menores cantidades *Bacillus amyloliquefaciens*, *Ralstonia sp.* y *Pediococcus sp.*, además de otros cuatro géneros desconocidos correspondientes a los ID B6, B7, B10 y B11. La distribución de los endófitos para plantas asintomáticas se obtuvo en igual porcentaje *Bacillus amyloliquefaciens* y *Ralstonia sp.*; y en plantas sintomáticas los porcentajes se repartieron entre *Raoultella terrigena* y *Ralstonia sp* (Figura 8).

En la zona de Aserrí se identificó como epífito únicamente a *Enterobacter cloacae* a partir de plantas asintomáticas y en porcentajes iguales a *Ralstonia sp.* y a *Enterobacter cloacae* como epífitos en plantas sintomáticas (Figura 5). En el caso de los endófitos no se obtuvo ningún aislamiento a partir de plantas asintomáticas, sin embargo, se identificó a *Tsukamurella inchonensis* como el microorganismo más abundante en plantas sintomáticas y en menor porcentaje a *Staphylococcus sp.* habitando el interior de las hojas (Figura 12).

El género *Enterobacter* ha sido reportado como endófito en plantas de café previamente por Vega y col. (2005), y ha sido obtenido también junto con los géneros *Staphylococcus* y *Chryseobacterium* en estudios anteriores en plantas de café por Mariño (2007) y Chacón (2008). Además, este último autor también logró aislar representantes endófitos de *Raoultella terrigena* y *Bacillus amyloliquefaciens* en plantas de café. El género *Bacillus* ha sido reportado también como endófito en muestras de plantas de café por Vega y col. (2005), Shiomi y col. (2006) y Mariño (2007) y como un abundante colonizador de las superficies de las hojas de café en un estudio realizado por Carcache (2002). Sin embargo, no se encontraron reportes del aislamiento de los géneros *Staphylococcus, Chryseobacterium, Enterobacter*, *Ralstonia* o *Pediococcus* como epífitos, ni de los géneros *Ralstonia* o *Tsukamurella* como epífitos o endófitos en hojas de plantas de café.

En general, se puede afirmar que se han realizado a la fecha muy pocos estudios de los microorganismos epífitos y endófitos en plantas de café por lo cual muy acertadamente se podría asegurar que aún no se conoce a ciencia cierta cuales

microorganismos podrían formar parte de cada una de las microfloras ni mucho menos un patrón de frecuencia de los mismos como habitantes de cada una de ellas. Además, las variantes entre autores con respecto a las metodologías empleadas para el aislamiento de los microorganismos hacen posible el hecho de que sea más factible o no la obtención de ciertos géneros bacterianos. Por ejemplo, aunque la metodología de siembra en placa para efectos del trabajo presente fue la misma empleada para el aislamiento de endófitos llevado a cabo por Chacón (2008), en el estudio realizado por dicho autor se empleó un medio específico para el aislamiento de *Xylella fastidiosa* como lo es el medio BCYE en lugar de medio PDA que fue el empleado para el caso presente, lo cual induce una diferencia entre las microfloras que pueden ser obtenidas.

Muchos de los aislados bacterianos obtenidos poseen características importantes, resultando ya sea benéficos o perjudiciales tanto para las plantas como para el ser humano. No obstante, muchos microorganismos se pueden presentar como patógenos sobre cierto organismo y poseer una aplicación útil en otro campo o tener un comportamiento de simbiosis con respecto a un organismo distinto. En el cuadro 11 se resumen algunas de las características y posibles aplicaciones de los microorganismos aislados en este trabajo, según publicaciones de otros autores.

Cuadro 11. Resumen de algunas características importantes de los aislados bacterianos obtenidos e identificados en este trabajo.

ID	Identificación	Implicaciones y reportes	Referencias
B1	*Bacillus amyloliquefaciens*	Presente en muestras de suelo, producción de alfa amilasas y proteasas	Priest *et al.*, 1987
		Producción de alfa amilasas, enzimas de importancia en la industria alimenticia	Gangadharan *et al.*, 2006
B2	*Raoultella Terrigena*	Producción de fitasas, enzimas que promueven la digestión de proteínas y disponibilidad de nutrientes en el procesado de alimentos	Konietzny y Greiner, 2004
		Biorremediación de TNT (2,4,6-trinitrotolueno) en aguas residuales	Claus *et al.*, 2007

B3	*Chryseobacterium sp.*	Antibiosis contra *Ralstonia solanacearum* patógena en tomate	Teng *et al.*, 2006
		Producción de queratinasas con aplicación potencial en el procesamiento de desechos en la industria de crianza de aves de corral y la industria de cueros.	Brandelli y Rifell, 2005
B4	*Staphylococcus sp.*	Algunas especies responsables de infecciones hospitalarias	Vindel *et al.*, 2009
		Resistencia a gran cantidad de antibióticos	
		Tolerancia a altas concentraciones de metales pesados por lo cual podrían emplearse para la detoxificación de ecosistemas contaminados	Paniagua Contreras *et al.*, 2003
		Obtención de proteína A (de la pared) de *S.aureus* que permite detectar partículas virales presentes en muy bajas concentraciones en extractos de plantas	Shukla y Gough, 1979
B5	*Bacillus sp.*	Cepas con actividad antifúngica frente a *Streptomyces scabiei* patógeno en papa y *Fusarium oxysporum* agente causal de la enfermedad de la raíz seca	Han *et al.*, 2005
		Bioabsorción de metales pesados Cd, Cu y Pb	Choi *et al.*, 2009
B8	*Ralstonia sp.*	Bioabsorción de metales pesados Cd, Cu y Pb	Choi *et al.*, 2009
		Remediación de suelos contaminados con Cd y Zn	Prapagdee *et al.*, 2009
		Biodegradación de compuestos xenobióticos	Denger y Cook, 2001 y Elango *et al.*, 2006
B9	*Pediococcus sp.*	Frecuentes en materiales vegetales	Whittenbury, 1965
		Empleo de algunas especies como cultivos iniciadores en carnes fermentadas y productos vegetales	Garvie, 1986 y Stiles, 1996
		Producción de bacteriocinas	Moreira, 1993 y Stiles, 1996

B12	*Enterobacter Cloacae*	Epífito en plantas de Fresa (*Fragaria ananassa* cv. Elsanta)	Krim *et al.*, 2005
		Control biológico del ácaro *Varroa destructor* que ataca apiarios	Hrabák, J.
		Infecciones oportunistas en pacientes hospitalizados o inmunodeprimidos	Pino *et al.*, 2003
B13	*Tsukamurella inchonensis*	Actividad antifúngica frente a *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus* y *Aspergillus niger* patógenos en humanos; y frente a *Fusarium oxysporium*, *Penicillium digitatum* y *Alternaria solani* fitopatógenos	Gebreel *et al.* 2008
		Asociada con enfermedades clínicas en humanos	Kattar *et al.*, 2001

Microsoft Word

B. Aislamientos fúngicos

Tanto a partir de las muestras de plantas de la zona de Poás como de la zona de Aserrí los porcentajes de los asilamientos fúngicos obtenidos se dividieron en dos grandes grupos, por un lado los correspondientes al género *Cladosporium* y por el otro los aislados que no presentaron desarrollo de estructuras reproductivas. El género *Cladosporium* resultó ser el más abundante para el caso de las muestras de Poás y el menos abundante de manera global en muestras de Aserrí.

En el caso de los hongos obtenidos como epífitos en Aserrí el mayor porcentaje de la población se vio representado por *Cladosporium sp.*, esto sin importar si se trataba de muestras asintomáticas o sintomáticas, no obstante, la diversidad de aislados fúngicos fue mayor en el caso de las últimas. El comportamiento observado en los aislamientos fúngicos epífitos a partir de muestras de Aserrí siguió el mismo patrón que en el caso de Poás, con la variante de que la diversidad obtenida a partir de las plantas asintomáticas y sintomáticas fue similar.

Para los endófitos en la zona de Poás ninguno de los aislados obtenidos presentó esporulación sin importar si provenían de plantas asintomáticas o sintomáticas. No obstante, en el caso de los hongos endófitos de Aserrí aunque se obtuvo una mayor diversidad de aislados para las muestras asintomáticas con respecto a las sintomáticas, se mantuvo la predominancia de *Cladosporium sp.* como colonizador, representando en el caso de las últimas la totalidad de los aislamientos.

Con respecto al género *Cladosporium* a manera global ha sido reportado como un integrante frecuente de la microflora de las regiones tropicales, lo que justifica su marcada abundancia dentro de los aislados obtenidos para efectos de este trabajo (Gamboa y Bayman, 2001). Además, en un estudio realizado por Waller y Masaba (2006) el género se presentó como el más abundante de los aislamientos en superficies de hojas de café (24,84% del total de los aislados fúngicos). De igual forma, en otros estudios llevados a cabo por Bayman y Santamaría (2005) y Chacón (2008) se obtuvieron aislamientos de individuos del género *Cladosporium* como habitantes endófitos en plantas de café.

En un estudio realizado por Carcache (2002) se obtuvo un promedio de 3,5 % de hongos epífitos no esporulados (entre muestras del estrato superior e inferior) de plantas de café convencional y un promedio de 2,5% en plantas de café bajo el sistema orgánico, por otro lado, Bayman y Santamaría (2005) encontraron que un 25% del total de los aislados fúngicos obtenidos como endófitos a partir de hojas de café no presentaron esporulación en cultivo. Otros investigadores han reportado la abundancia de los hongos del grupo de los micelios estériles (hongos que no esporulan en medios sintéticos) como habitantes endófitos de las hojas, por ejemplo, Ramírez y col. (2006) encontraron este grupo como el más dominante en muestras de algunas plantas medicinales del Ecuador, mientras que Huang y col. (2008) los obtuvieron representando un 34,4% del total de los aislados a partir de hojas de 29 plantas medicinales tradicionales de China.

Lacap y col. (2003) apuntan que el grupo de los micelios estériles es considerablemente prevalente en estudios de endófitos, siendo también común su presencia para el caso de plantas tropicales (Arnold *et al.*, 2000). Por otro lado, según Espola (2005) citado por Ramírez y col. (2006) los hongos endófitos derivan de un largo proceso de coevolución con sus hospederos vegetales, dificultándose su aislamiento y una vez aislados, haciéndose difícil la observación de estructuras fértiles *in vitro*. Pretini (1981) cita que los aislados fúngicos endófitos pueden producir estructuras tan solo dos o tres meses posterior a la inoculación o llevarse entre 12 y 14 meses, por lo cual para dicho autor el tiempo se constituye como el factor más importante en la inducción de la esporulación.

2. Pruebas in vitro del Potencial Biocontrolador de los microorganismos endófitos y epífitos aislados contra Mycena citricolor (Ojo de gallo).

2.1 Selección de microorganismos con Potencial Biocontrolador

La bioprospección de microorganismos nativos con posible potencial antagónico frente a enfermedades de los cultivos es una herramienta biotecnológica de gran utilidad para el campo de la fitopatología, la cual ha ganado mucho auge en la actualidad. La metodología de siembra dual en placa empleada en este trabajo mostró ser de gran practicidad, ya que permitió observar con claridad la presencia de halos de inhibición del crecimiento del patógeno *Mycena citricolor* cepa My1 por parte de los microorganismos ensayados.

A. Pruebas de antagonismo de los aislamientos bacterianos y levaduriformes

Muchos autores han observado en otros estudios el potencial biocontrolador que presentan las bacterias contra patógenos tanto de origen bacteriano como fúngico

(Jan *et al.*, 2005; Teng *et al.*, 2006; Gebreel *et al.* 2008). No obstante, también muchos otros mencionan que el aislamiento de microorganismos antagonistas es un proceso ineficiente que consume mucho tiempo, además de que dicha actividad es dependiente de la eficiencia de los métodos de búsqueda y requiere del análisis de miles de aislados, resultando solo unos cuantos útiles ya que no todos las cepas de dadas especies son activas. Según ellos debido a que el porcentaje de aislados con efecto antagónico significativo obtenidos en relación a los ensayados es muy bajo, la bioprospección con miras a la obtención de agentes de biocontrol resulta ser un proceso muy poco rentable (Montesinos *et al.*, 2002).

De los 24 aislamientos probados para biocontrol *in vitro* de *M.citricolor* solo 4 de ellos parecieron tener un potencial, disminuyendo el mismo con el transcurso del tiempo de observación con excepción del asilamiento de ID B10 correspondiente a un bacilo gram positivo esporulado. Esto concuerda con los resultados obtenidos en un estudio realizado para el control del moho azul causado por *P. expansum* en manzana, en el cual de 264 aislados obtenidos sólo 39 inhibieron el crecimiento del patógeno después de tres días de co-cultivo en medio PDA, dándose la pérdida de la actividad por parte de 29 de los aislamientos luego de diez días de incubación (Slavov, 2006).

Se presume que el efecto antagónico del asilado bacteriano de ID B10 podría deberse a la liberación de un compuesto antibiótico difusible en el medio, evidenciado por un halo de inhibición que visualmente no presenta crecimiento bacteriano ni micelial. Según Gutterson (1990), en ciertos casos el biocontrol mediante antagonismo se ha adjudicado a la síntesis de compuestos antimicrobianos, bacteriocinas y nuevos compuestos antibióticos por parte del agente controlador, lo cual podría argumentar lo expuesto para el agente aislado en este trabajo.

B. Pruebas de antagonismo de los aislamientos fúngicos

En estudios anteriores en los que se ha llevado a cabo aislamiento de hongos en plantas de café, se ha determinado la presencia de aislados fúngicos con potencial biocontrolador, por ejemplo *F. stilboides* y *Colletotrichum gloeosporioides* aislados como endófitos presentaron actividad *in vitro* contra *Colletotrichum kahawae* (Waller y Masaba, 2006)

Los aislamientos fúngicos probados contra la cepa My1 de *M.citricolor* no presentaron un verdadero efecto antagónico. Esto se fundamenta en el hecho de que los aislados de ID H5- no identificado- e ID H32- identificado como *Cladosporium sp.*- que presentaron un pequeño halo de inhibición del crecimiento del patógeno, perdieron efecto con el avance del período de incubación. Basado en dicha observación, se determinó que podría tratarse más bien de una resistencia presentada por dichos hongos a ser colonizados por *M.citricolor,* resultando interesante está característica puesto que se presentó únicamente para el caso de esos dos aislados y no para los demás. Como se citó en el apartado anterior Slavov (2006) también observó de manera similar una pérdida en la actividad de los aislamientos probados para biocontrol *in vitro* de *P. expansum* con el avance del período de incubación.

CONCLUSIONES

Se obtuvo una mayor cantidad de aislados epífitos con respecto a los endófitos para ambos sitios de muestreo lo cual concuerda con lo reportado en estudios previos.

Las diferencias en la cantidad y diversidad de los aislados tanto epífitos como endófitos entre las dos zonas de muestreo evidencian la influencia de factores ambientales locales sobre las microfloras presentes en las hojas.

La presencia de distintas enfermedades en los sitios de muestreo pueden ayudar a determinar las poblaciones de aislados obtenidos tanto de manera epífita como endófita para cada zona.

De los géneros bacterianos obtenidos como epífitos, únicamente *Bacillus* ha sido reportado en esa condición en plantas de café por otros autores y de los géneros bacterianos obtenidos como endófitos solo *Enterobacter, Staphylococcus, Bacillus* y *Raoultella* han sido aislados previamente por otros autores a partir de los tejidos internos de plantas de café, lo cual podría deberse a las diferencias en las metodologías de aislamiento así como a la escasez de estudios de este tipo realizados en el cultivo.

La presencia de aislados fúngicos del género *Cladosporium*, así como la obtención de hongos no esporulados como epífitos y endófitos concuerdan con lo reportado por otros autores para el caso de las regiones tropicales y para plantas de café.

Los métodos de inducción de la esporulación ensayados para los aislados fúngicos en este trabajo no resultaron efectivos en la formación de estructuras reproductivas por parte de los mismos.

El método de cultivo dual resultó ser efectivo para evidenciar el potencial antagónico de los epífitos y endófitos aislados.

El tiempo de incubación por 15 días de los ensayos de antagonismo presenta utilidad en el descarte de aislados con actividad antagónica temporal.

De los aislamientos bacterianos y levaduriformes solo el de ID B10, correspondiente a una bacteria, fue el que presentó potencial antagónico significativo contra *Mycena citricolor* cepa My1.

De los aislamientos fúngicos ensayados como antagonistas frente a *Mycena citricolor* cepa My1, ninguno mostró una actividad antagónica significativa.

La bioprospección de microorganismos nativos con posible potencial antagónico frente a enfermedades de los cultivos es una herramienta de gran utilidad.

RECOMENDACIONES

Llevar a cabo el aislamiento de hongos y bacterias por separado en estudios futuros.

Emplear distintas metodologías de aislamiento de epífitos y endófitos para obtener una mayor diversidad de aislados.

Emplear técnicas moleculares de mayor sensibilidad y confianza con respecto a las bioquímicas para la identificación de epífitos y endófitos, sobre todo para aquellos con potencial biocontrolador.

Emplear otras técnicas para la inducción de la esporulación en hongos y así facilitar su identificación.

Llevar a cabo pruebas de antagonismo de los epífitos y endófitos frente a distintos patógenos de interés.

Llevar a cabo pruebas de cámara húmeda y ensayos en invernadero con los aislados que presentan potencial antagónico para corroborar su efectividad bajo condiciones *ex vitro*.

BIBLIOGRAFÍA

AMARAL, J.F.; TEIXEIRA, C.; PINHEIRO, E.D. 1956. A bactéria causadora da mancha aureolada do cafeeiro. Arq. Inst. Biol. 23. p.151.

ANDREWS, J.H.; HARRIS, R.F. 2000. The ecology and the biogeography of microorganisms on plant surfaces. Annu. Rev. Phytopathol. 38: 145-180.

ARAUJO W.L.; MENDES, R.; PIZZIRANI-KLEINER, A. AND J.M., RAAIJMAKERS. 2007. Diversity of Cultivated Endophytic Bacteria from Sugarcane: Genetic and Biochemical Characterization of *Burkholderia cepacia* Complex Isolates. Applied and Environmental Microbiology. 73 (22): 7259–7267.

ARNOLD, A.E; MAYNARD, Z.; GILBERT, G.; COLEY, P.D.; KURSAR, T.A. 2000. Are tropical fungal endophytes hyperdiverse?. Ecology Letters. 3: 267–274.

ASHBOLT, N.J.; & P.E., INKERMAN. 1990. Acetic acid bacterial biota of the pink sugarcane mealybug, *Saccharicoccus sacchari*, and its environs. Applied and Environmental Microbiology. 56: 707-712.

BARNETT, H.L. & HUNTER, B.B. 1972. Illustrated Genera of Imperfect Fungi. Third Edition. Burgess Publishing Company. Minneapolis, Minnesota. 241p.

BARQUERO, M. 2007. Situación actual del conocimiento de la “Crespera” del café. Instituto del Café de Costa Rica. En: Boletín Informativo CICAFE 2007. 10 p.

BAYMAN, P.; SANTAMARÍA, J. 2005. Fungal epiphytes and endophytes of coffee leaves (*Coffea arabica*). Microbial Ecology. 50: 1-8.

BERTRAND, B.; RAPIDEL, B. 1999. Desafíos en la caficultora en Centroamérica. IICA-PROMECAFE; CIRAD; IRD; CCCR. p. IX.

BEATTIE, G. A.; LINDOW, S.E. 1995. The secret life of foliar bacterial pathogens on leaves. Annu. Rev. Phytopathol. 33: 145–172.

BONILLA, J.C. 1980. Estudio del ojo de Gallo causado por el hongo *Mycena citricolor*. En: Simposio Latinoamericano sobre Caficultura (3º, 1980, Tegucigalpa, Honduras) Trabajos, Tegucigalpa, IICA, PROMECAFE. (IICA: Serie ponencias, resultados y recomendaciones de eventos técnicos no.263) p: 177-188.

BORGES, M.; GRAÇA BARREIRO, M. AND J.M., PEDRO. 2004. Biological control of postharvest decay with epiphytic microorganisms of Rocha pear. En: Maturação e Pós-Colheita 2004 - Frutos e Hortícolas. (Ed.), Oeiras, Portugal. p: 513-517.

BRANDELLI, A.; RIFFEL, A. 2005. Production of an extracellular keratinase from *Chryseobacterium sp.* growing on raw feathers. Electronic Journal of Biotechnology. 8(1): 35-42.

BRENES, J Y FLORES, D. 2006. Manual de Laboratorio de Manejo de Cultivos. Montaje y Reconocimiento de Insectos de Importancia Agroeconómica. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. p. 23- 24.

CARCACHE, M.X. 2002. Microorganismos no patógenos en la filósfera y rizósfera del café y su relación sobre la incidencia de enfermedades foliares y población de nemátodos fitopatógenos en los sistemas convencional y orgánico. Tesis M. Sc. Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación. Escuela de Posgrado. 111 p.

CARVAJAL, B.F. 1939. Ojo de gallo *Omphalia flavida*. Revista del Instituto de Defensa del Café. Costa Rica. 7: 535-576.

CHACÓN, R. 2008. Identificación de microorganismos endógenos en cicadélidos y endófitos asociados a la Crespera del café en el Valle Central Occidental de Costa Rica. Tesis Bach. Cartago, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 178 p.

CHOI, A.; WANG, S.; LEE, M. 2009. Biosorption of cadmium, copper, and lead ions from aqueous solutions by *Ralstonia sp.* and *Bacillus sp.* isolated from diesel and heavy metal contaminated soil.Geosciences Journal. 13(4): 331-341.

CLAUS, H.; BAUSINGER, T.; LEHMLER, I.; PERRET, N.; FELS, G.; DEHNER, U.; PREUß, J.; & H. KÖNIG. 2007. Transformation of 2,4,6-trinitrotoluene (TNT) by *Raoultella terrigena*. Biodegradation. 18: 27-35.

DEACON, J.W. 1990. Introducción a la micología moderna. Primera Reimpresión. Trad. por Javier Jiménez Ortega. México, Editorial Limusa S.A. de C.V.. 350 p.

DEMAIN, A.; DAVIES, J. 1999. Manual of industrial microbiology and biotechnology. Segunda Edición. ASM Press. Washington D.C.

DENGER, K.; COOK, A.M. 2001. Ethanedisulfonate is degraded via sulfoacetaldehyde in *Ralstonia sp.* strain EDS1. Archives of Microbiology. 176: 89-95.

DONG, Z.; CANNY, M.J; MCCULLY, M.E.; ROBOREDO, M.R.; CABADILLA, C.F.; ORTEGA, E.; RODES, R. 1994. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. A new role for the apoplast. Plant Physiology. 105: 1139-1147.

ELANGO, V.K; LIGGENSTOFFER, A.S.; FATHEPURE, B.Z. 2006. Biodegradation of vinyl chloride and cis-dichloroethene by a *Ralstonia sp.* strain TRW-1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 72: 1270-1275.

FINCH, H. & FINCH, A. 1990. Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina. 2da Ed. Editorial Trillas. México, D.F. 189p.

FISCHERSWORRING, B.; ROBKAMP, R. 2001. Guía para la Caficultura Ecológica. Tercera Edición. Editorial López. p: 1-152.

FUENTES-RAMÍREZ, L.E.; JIMÉNEZ-SALGADO, T.; ABARCA-OCAMPO, I.R.; CABALLERO-MELLADO, J. 1993. *Acetobacter diazotrophicus*, and indolacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. Plant Soil. 154: 145-150.

GAMBOA, M.A.; BAYMAN, P. 2001. Communities of endophytic fungi in leaves of a tropical timber tree (*Guarea guidonia*: Meliaceae). Biotropica. 33: 352–360.

GANGADHARAN, D.; SIVARAMAKRISHNAN, S.; MADHAVAN NAMPOOTHIRI, K.; PANDEY, A. 2006. Solid Culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for Alpha Amylase Production. Food Technol. Biotechnol. 44 (2): 269–274.

GARLAND, J. 1999. Potential and limitations of BIOLOG for microbial community analysis. methods of microbial community analysis microbial biosystems: new frontiers proceedings of the 8th International Symposium on Microbial Ecology Bell CR, Brylinsky M, Johnson-Green P(ed) Atlantic Canada Society for Microbial Ecology, Halifax, Canada. s.p.

GARVIE, E.I. 1986. Genus *Pediococcus*. En: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Edited by P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe & J. G. Holt. Williams & Wilkins Co. Baltimore. 2. p: 1075-1079..

GEBREEL, H.M.; EL-MEHALAWY, A.A.; EL-KHOLY, I.M; RIFAAT, H.M.; AND HUMID, A.A. 2008. Antimicrobial Activities of Certain Bacteria Isolated from Egyptian Soil Against Pathogenic Fungi. Research Journal of Agriculture and Biological Sciences. 4(4): 331-339.

GEISER, D.M.; IVEY, M.LL.; HAKIZA, G.; JUBA, J.H.; MILLER, S.A. 2005. *Gibberella xylarioides* (anamorph: *Fusarium xylarioides*), a causative agent of coffee wilt disease in Africa, is a previously unrecognized member of the *G. fujikuroi* species complex. Mycologia. 97:191-201.

GUTTERSON, N. 1990. Microbial fungicides. Crit. Rev. Biotechnol. 10: 69–91.

HAN, J.S.; CHENG, J.H.; YOON, T.M.; SONG, J.; RAJKARNIKAR, A.; KIM, W.G.; YOO, I.D.; YANG, Y.Y.; SUH, J.W. 2005. Biological control agent of common scab disease by antagonistic strain *Bacillus sp.* sunhua. Journal of Applied Microbiology. 99: 213–221.

HRABÁK, J. s.f. The microorganisms isolated from the mites *Varroa destructor* and the verification of their pathogenity. Standing Commission of Bee Pathology. Selected papers - XXXVIII Congress APIMONDIA - Ljubljana – Slovenia. Apimondia Journal. 6 p. Disponible en: http://www.apiservices.com/apimondia/index_sp_apiacta.htm. Consultado el: 12 de enero 2010.

HIRANO, S.S.; UPPER, C.D. 2000. Bacteria in the Leaf Ecosystem with Emphasis on *Pseudomonas syringae*—a Pathogen, Ice Nucleus, and Epiphyte. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64(3): p. 624–653.

HUANG, W.Y.; CAI, Y.Z.; HYDE, K.D.; CORKE, H.; Y SUN, M. 2008. Biodiversity of endophytic fungi associated with 29 traditional Chinese medicinal plants. Fungal Diversity. 33: 61-75.

ICAFE. 2009. Instituto del Café de Costa Rica: Informe sobre la Actividad Cafetalera de Costa Rica. Preparado en el Instituto del Café de Costa Rica para los Delegados al XXXVIII Congreso Nacional Cafetalero Ordinario San José, Costa Rica. p: 1-96.

JIMÉNEZ-SALGADO, T.; FUENTES-RAMÍREZ, L.E.; TAPIA-HERNÁNDEZ, A.; MASCARUA-ESPARZA, M.A.; MARTÍNEZ-ROMERO, E.; CABALLERO-MELLADO, J. 1997. *Coffea arabica* L., a new host plant for *Acetobacter diazotrophicus* and isolation of the nitrogen-fixing-acetobacteria. Appl. Environ. Microbiol. 63: 3676-3683.

KATTAR, M.; COOKSON, B.; CARLSON, L.; STIGLICH, S.; SCHWARTZ, M.; NGUYEN, T.; DAZA, R.; WALLIS, C.; YARFITZ, S.; COYLE, M. 2001. *Tsukamurella strandjordae* sp. nov., a Proposed New Species Causing Sepsis. Journal of Clinical Microbiology. 39(4): 1467–1476.

KONIETZNY, U.; GREINER, R. 2004. Bacterial phytase: potential application, in vivo function and regulation of its synthesis. Brazilian Journal of Microbiology. 35:11-18.

KRIMM, U.; ABANDA-NKPWATT, D.; SCHWAB, W.; SCHREIBER, L. 2005. Epiphytic microorganisms on strawberry plants (*Fragaria ananassa* cv. Elsanta): identification of bacterial isolates and analysis of their interaction with leaf surfaces. FEMS Microbiology Ecology. 53: 483–492

LACAP, D.C.; HYDE, K.D.; LIEW, E.C.Y. 2003. An evaluation of the fungal “morphotype” concept based on ribosomal DNA sequences. Fungal Diversity. 12: 53-66.

LEITE JR., R.P.; MEHTA, A.; CARVALHO, F.M.S.; UENO, B. 1999. Genetic analysis of Brazilian strains of *Xylella fastidiosa* associated with citrus and

coffee. En: Proceedings of III International Seminar on Biotechnology in the Coffee Agrindustry. Londrina, Brasil. pp.151-154.

LI, W-B.; PRIA, W.D.; TEIXEIRA D.C.; MIRANDA, V.S.; AYRES, A.J.; FRANCO, C.F.; COSTA, M.G.; HE, C-X.; HARTUNG, J.S. 2001. Coffee leaf scorch caused by a strain of *Xylella fastidiosa* from citrus. Plant Dis. 85: 501-505.

LINDOW, S.E.; BRANDL, M.T. 2003. MINIREVIEW: Microbiology of the Phyllosphere. Applied and Environmental Microbiology. 69 (4): 1875–1883.

MARIÑO, Y.A. 2007. Identificación de bacterias en cicadélidos vectores potenciales de *Xylella fastidiosa* Wells *et al.* que se alimentan del tejido vascular de plantas de café *Coffea arabica* L. en tres localidades de Puerto Rico. Tesis M. Sc en Protección de Cultivos. Universidad de Puerto Rico, Recinto Universitario de Mayagüez. 160 p.

MOREIRA DOS SANTOS, W.L. 1993. Aislamiento y caracterización parcial de una bacteriocina producida por *Pediococcus sp*. 347, de origen cárnico. Memoria para optar por el grado de Doctor en Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid. Departamento de Nutrición y Bromatología III (Higiene y Tecnología de los Alimentos). Facultad de Veterinaria. p: 1-310.

MORRIS, C.E; MONIER, J.M; & M.A., JAQUES. 1997. Methods for Observing Microbial Biofilms Directly on Leaf Surfaces and Recovering Them for Isolation of Culturable Microorganisms. Applied and Environmental Microbiology. 63 (4): 1570–1576.

MONTESINOS, E.; BONATERRA, A.; BADOSA, E.; FRANCÉS, J.; ALEMANY, J.; LLORENTE, I.; MORAGREGA, C. 2002. Review Article: Plant-microbe interactions and the new biotechnological methods of plant disease control. Int. Microbiol. 5: 169-175.

PANIAGUA CONTRERAS, G.L.; MONROY PÉREZ, E.; VACA PACHECO, S.; GONZÁLEZ ALMAZÁN, S.E. 2003. Resistencia a antibióticos y metales pesados en cepas clínicas de *Staphylococcus aureus*. Revista Médica del Hospital General de México. 66 (1): 13-21.

PARRA, P. 2008. Informe de coyuntura Trimestral, Marzo 2008. Sector Infusiones café. 8 p.

PETRINI, O. 1981. Fungal endophytes of tree leaves. En: Andrews J.H., Hirano S.S. (Eds.) Microbial ecology of leaves. Springer-Verlag, New York. pp.179-197.

PEYSSON R.S. 2001. Historia del café. En: El mundo del café. Barcelona: Ultramar Eds. S.A. p. 5-21.

PHOTITA, W.; LUMYONG, S.; LUMYONG, P.; HYDE, K.D. 2001. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. Mycological Research. 105: 1508-1513.

PRAPAGDEE, B.; WATCHARAMUSIK, A. 2009. Adaptive and cross-protective responses against Cadmium and Zinc toxicity in cadmium-resistant bacterium isolated from a zinc mine. Brazilian Journal of Microbiology. 40: 838-845.

PRIEST, F.G.; GOODFELLOW, M.; SHUTE, L.A.; & R.C.W. BERKELEY. 1987. *Bacillus amyloliquefaciens* sp. nov. norn. rev. International Journal of Systematic Bacteriology. 37 (1): 69-71.

RAMÍREZ, J.Y.; DELGADO, E.; RODOLFI, M.; SOLVEIG, T. 2006. Actividad antagónica de hongos endófitos de plantas medicinales del Ecuador sobre bacterias patógenas. Boletín micológico. 21: 49-53.

ROJAS, L.; GODOY, C.; HANSON, P.; HILJE, L. 2001. A survey of homopteran species (Auchenorrhyncha) in coffee, poro and laurel in shaded coffee plantations, in Turrialba, Costa Rica. Revista de Biología Tropical. 49(3): 981-989.

SAKIYAMA, C.C.H.; PAULA, E.M.; PEREIRA, P.C.; BORGES, A.C.; SILVA, D.O. 2001. Characterization of pectin lyase produced by an endophytic strain isolated from coffee cherries. Lett. Appl. Microbiol. Vol. 33: 117–121.

SHETTY, N.; HILL, G.; RIDGWAY, G.L. 1998. The Vitek analyser for routine bacterial identification and susceptibility testing protocols, problems, and pitfalls. Technical report. Journal of Clinical Pathologie. 51: 316-323.

SHIOMI, H.F.; ALVES SILVA, H.S.; SOARES DE MELO, I.; VIEIRA NUNES, F.; BETTIOL, W. 2006. Bioprospecting endophytic bacteria for biological control of coffee leaf rust. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.). 63 (1): 32-39.

SHUKLA, D.D.; GOUGH, K.H. 1979. The Use of Protein A, from *Staphylococcus aureus*, in Immune Electron Microscopy for Detecting Plant Virus Particles. Short Communications. J. gen. Virol. 45: 533-536.

SILVA, M.C.; VÁRZEA, V.; GUERRA-GUIMARÃES, L.; GIL AZINHEIRA, H.; FERNANDEZ, D.; PETITOT, A.S.; BERTRAND, B.; LASHERMES, P.; Y NICOLE, M. 2006. Coffee resistance to the main diseases: leaf rust and coffee berry disease. Braz. J. Plant Physiol. 18(1):119-147.

SLAVOV, I. 2006. Preliminary studies on the epiphytes for postharvest biological control of blue mould on apple fruits. Fruit Growing Institute, Plovdiv, Bulgaria. Phytopathol. Pol. 39: 119–123.

STILES, M.E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Leeuwenhoek*. 70: 331-345.

STROBEL, G.A.; LONG, D.M. 1996. Endophytic microbes embody pharmaceutical potencial. ASM News. 64: 263-268.

SUNDIN, G. W.; JACOBS, J.L. 1999. Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field-grown peanut (*Arachis hypogeae* L.). Microbial Ecology. 38: 27–38.

SUTTON, S.V.; CUNDELL, A. 2004. Microbial Identification in the Pharmaceutical Industry. USP Expert Committee on Analytical Microbiology. Pharmacopeial Forum. 30(5): 1884- 1894.

TENG, Y.C.; TZENG, K.C.; HSU, S.T. 2006. Screening rhizobacteria for promoting tomato growth and testing their potential for control of bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum*. Plant Pathology. Bull. 15: 83-95.

URIBE, L. 2009. Identificación Bacteriana mediante el sistema BIOLOG. Comunicación Personal. Directora del Laboratorio de Microbiología Agrícola. Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. Consulta 16/06/2009.

VARGAS, L. 2000. Determinación de la enzima trehalasa en el hongo *Mycena citricolor*. En: Simposio Latinoamericano de Caficultura (19, 2000, San José, Costa Rica). Memorias. San José, Costa Rica, IICA/Promecafe/ICAFE. p: 355-364.

VARGAS, E.; UMAÑA, G.; VARGAS, L.; GONZÁLEZ, M. 1990. Epidemiología del ojo de gallo *Mycena citricolor* en cafeto en diferentes zonas cafetaleras en Costa Rica. 12 Simposio de Caficultura Latinoamericana. IICA, Costa Rica. p. 191.

VEGA, F.E.; PAVA-RIPOLL, M.; POSADA, F.; BUYER, J.S. 2005. Endophytic bacteria in *Coffea arabica* L. J. Basic Microbiol. 45 (5): 371–380.

PINO, V.; PANDO, J.M.; TRINIDAD RAMOS, G.; TRINIDAD RUÍZ, G.; PARDO, G.; BLASCO, A. 2003. Otitis externa aguda por *Enterobacter cloacae*. ORL-DIPS. 30(4): 226-228.

VINDEL, A.; CUEVAS, O.; CERCENADO, E.; MARCOS, C.; BAUTISTA, V.; CASTELLARES, C.; TRINCADO, P.; BOQUETE, T.; PÉREZ-VÁZQUEZ, M.; MARÍN, M.; BOUZA, E.; and the Spanish Group for the Study of *Staphylococcus*. 2009. Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in Spain: molecular epidemiology and utility of different typing methods. Journal of Clinical Microbiology. p:1-27.

VON ARX, J.A. 1981. The genera of Fungi Sporulating in Pure Culture. Third Edition. Editorial J. Cramer. Germany. 424p.

WALLER, J.M.; MASABA, D.M. 2006. The microflora of coffee surfaces and relationships to coffee berry disease. International Journal of Pest Management. 52 (2): 89-96.

WANG, A.; AVELINO, J. 1999. El ojo de gallo del cafeto *Mycena citricolor*. En: Desafíos de la caficultora Centroamericana. Bertrand, B.; Rapidel, B. editores. San José, Costa Rica, IICA/PROMECAFE/CIRAD. p: 243-260.

WELLS, J.; RAJU, B.; HUNG, H.; WEISBURG, W.; MANDELCO-PAUL, L. Y BRENDER, D. 1987. *Xylella fastidiosa General* nov., sp. Nov. Gram negative, xylem-limited, fastidious plant bacteria related to *Xantomonas spp.* En: International Journal of System Bacteriology. 37: 136-143.

WHITTENBURY, R. 1965. A Study of some *Pediococci* and their Relationship to *Aerococcus viridans* and the *Enterococci*. J. gen. Microbial. 40: 97-106.

ZINNIEL, D.K.; LAMBRECHT, P.; HARRIS, N.B.; FENG, Z.; KUCZMARSKI, D.; HIGLEY, P.; ISHIMARU, C.A.; ARUNAKUMARI, A.; BARLETTA, R.G.; Y VIDAVER, A.K. 2002. Isolation and Characterization of Endophytic Colonizing Bacteria from Agronomic Crops and Prairie Plants. Applied and Environmental Microbiology. 68 (5): 2198–2208.

APÉNDICES

Apéndice 1. Detalle de inoculación para aislamiento de microorganismos.

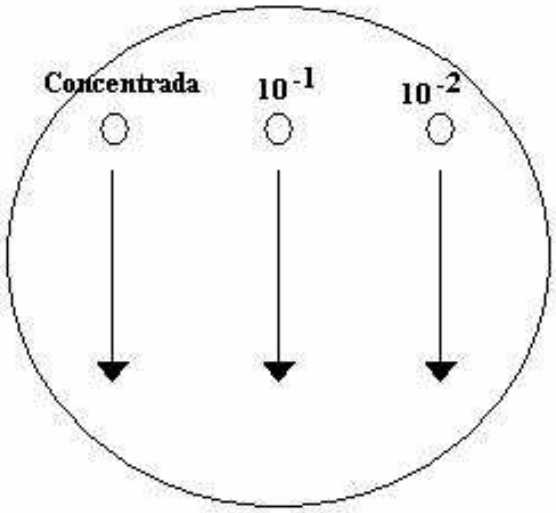
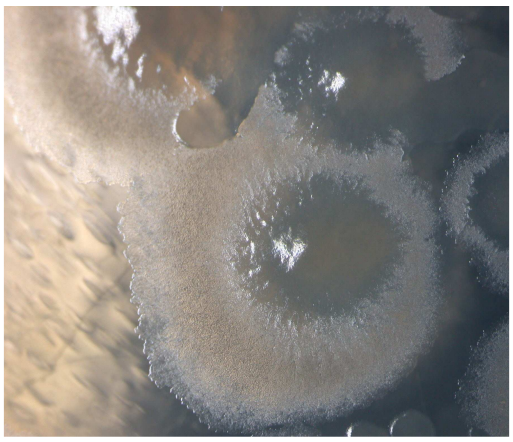
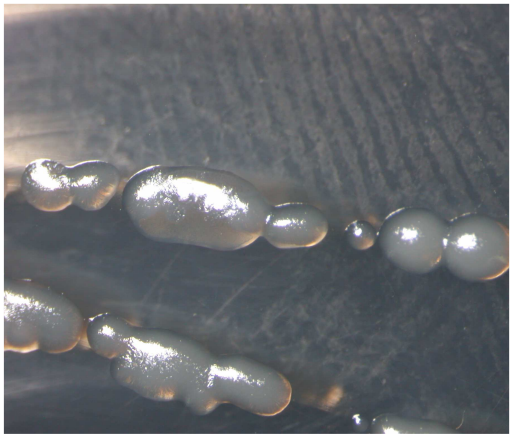
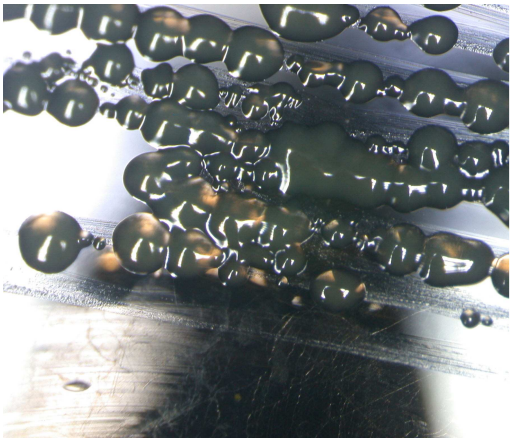
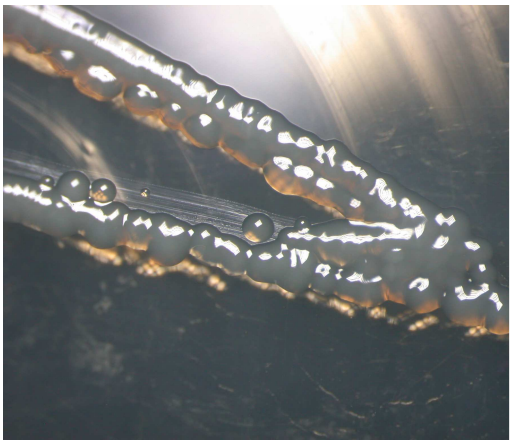
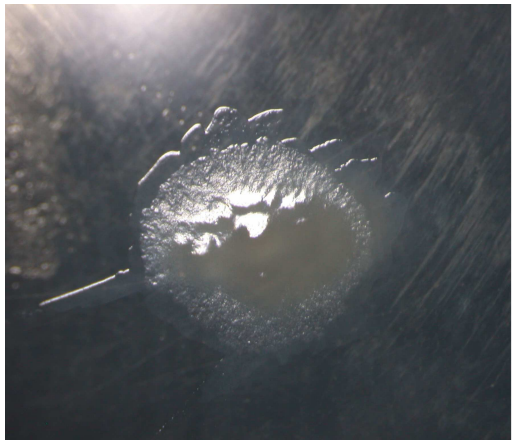
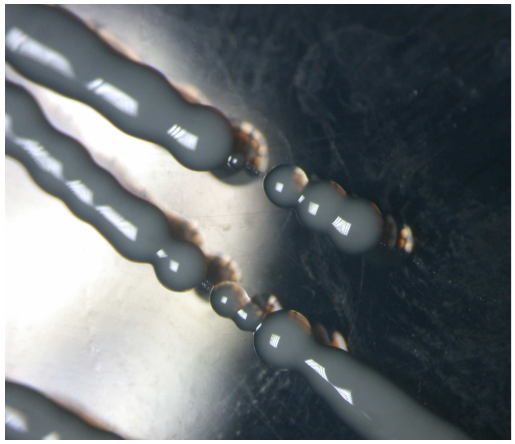


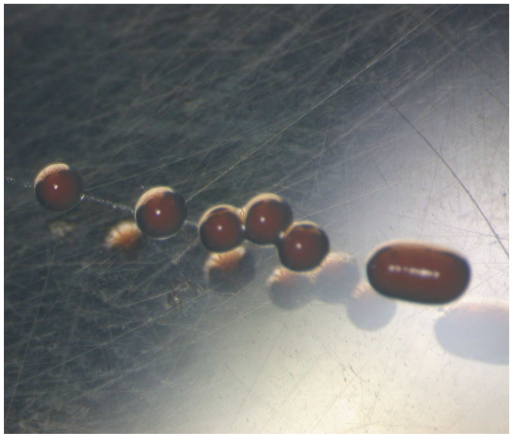
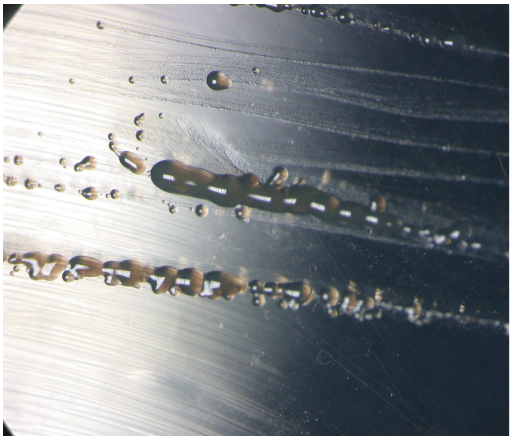
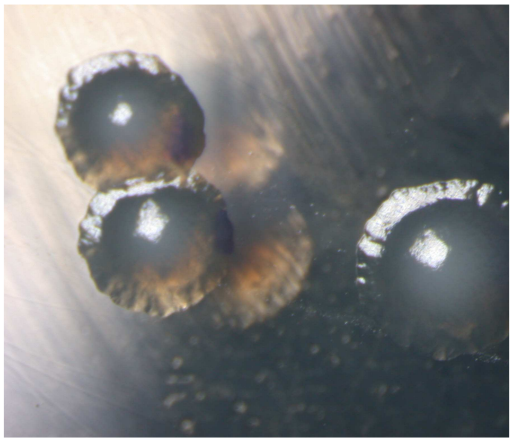
Diagrama de distribución de la inoculación de diluciones sobre medio PDA a 21 ºC, empleado tanto para el aislamientos de microorganismos epífitos como endófitos (Tomado de Chacón, 2008).

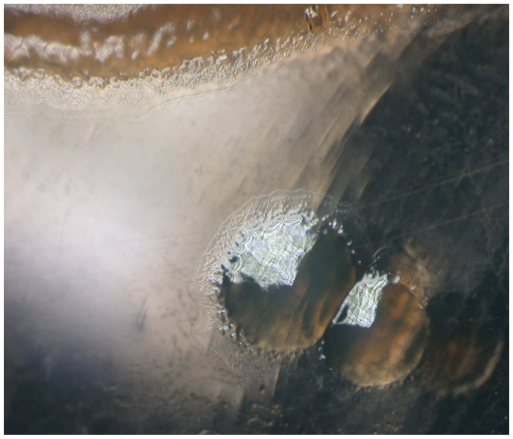
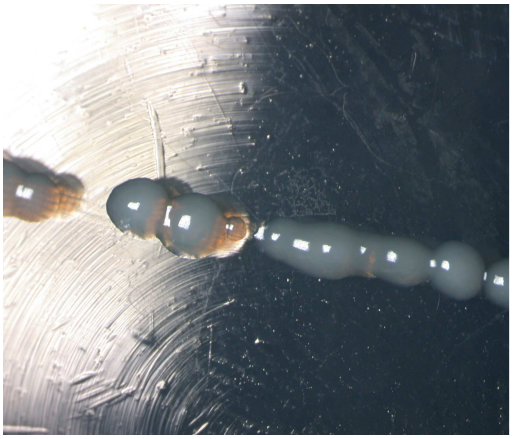
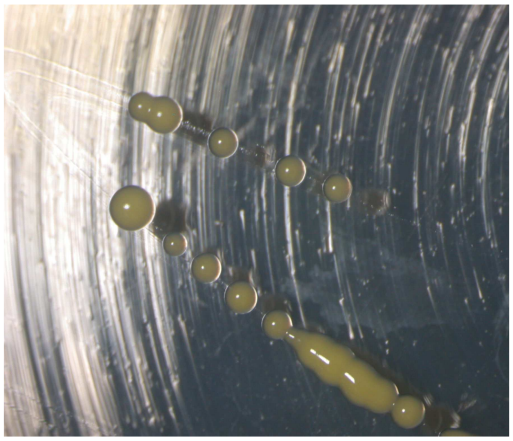
Apéndice 2. Registro fotográfico de las bacterias epífitas y endófitas aisladas en dos diferentes zonas de Costa Rica.

ID	Microorganismo	Colonia en PDA	Objetivo
B1	*Bacillus Amyloliquefaciens*		0.8X

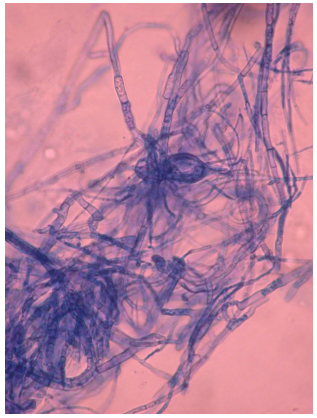
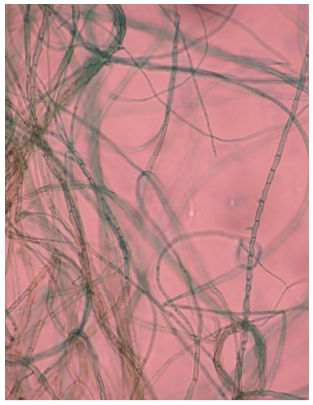
B2	*Raoultella terrigena*		0.8X
B3	*Chryseobacterium sp.*		0.8X
B4	*Staphylococcus sp.*		1X

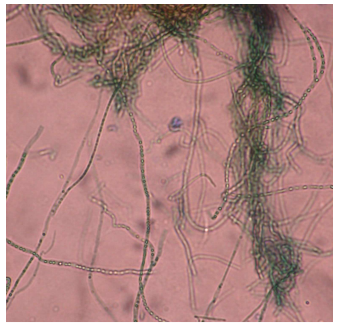
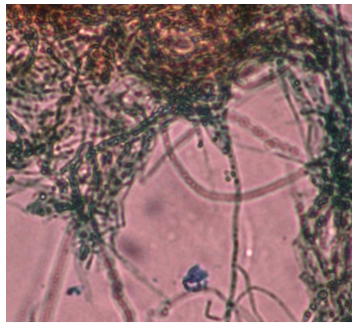
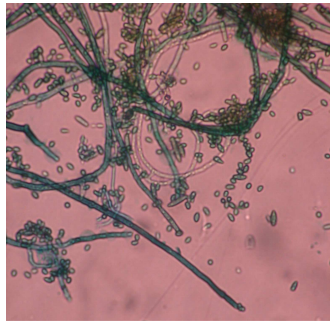
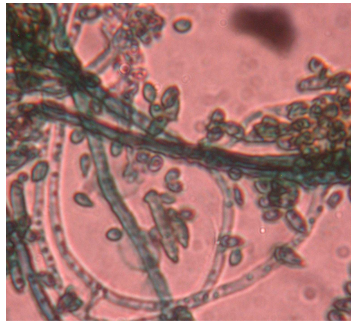
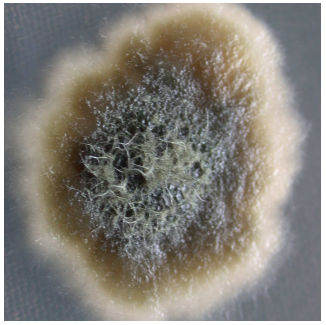
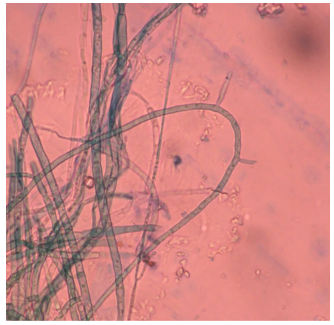
B5	*Bacillus sp.*		0.8X
B6	Bacilos Gram positivos esporulados, esporas terminales		1.25X
B7	Bacilos Gram positivos esporulados		0.8X

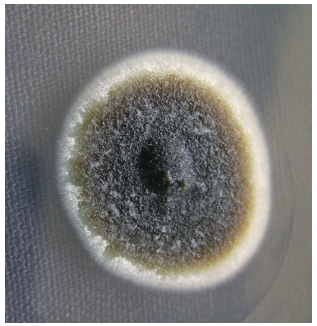
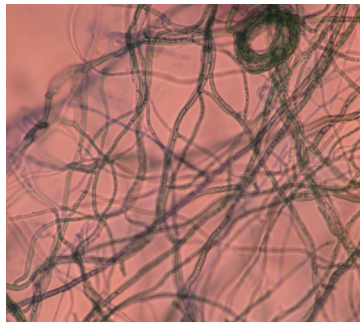
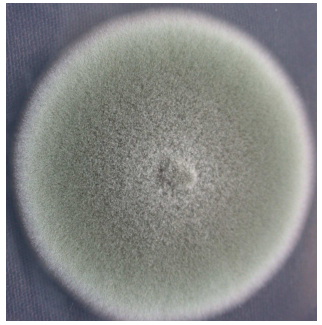
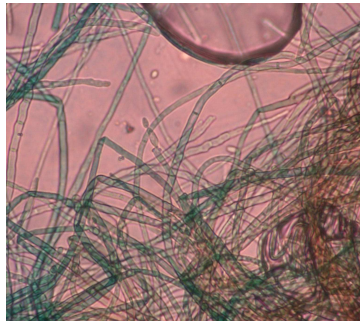
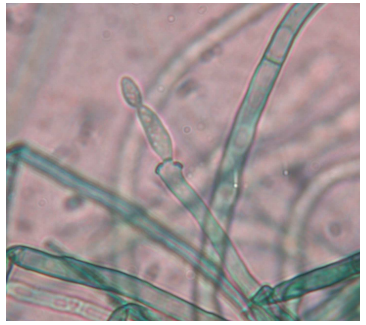
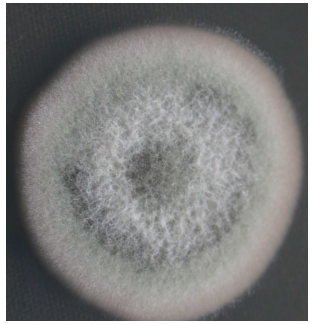
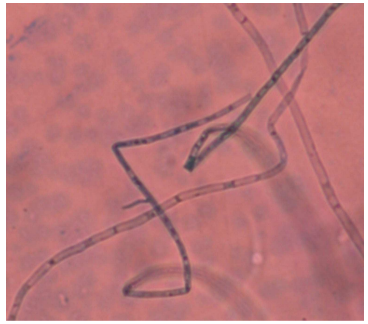
B8	*Ralstonia sp.*		0.8X
B9	*Pediococcus sp.*		1.25X
B10	Bacilos Gram positivos esporulados		0.8X

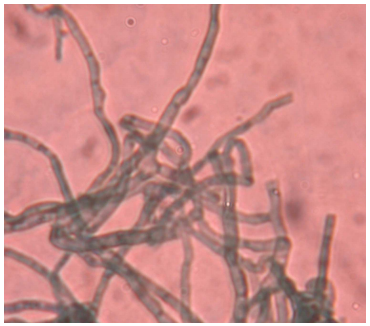
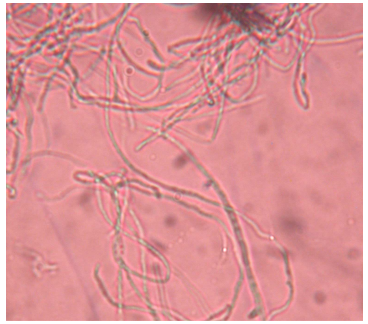
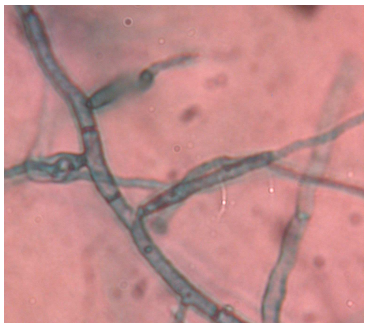
B11	Bacilos Gram positivos		0.8X
B12	*Enterobacter cloacae*		0.8X
B13	*Tsukamurella inchonensis*		0.8X

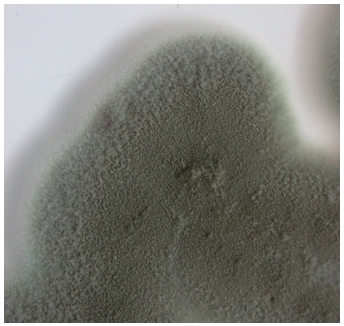
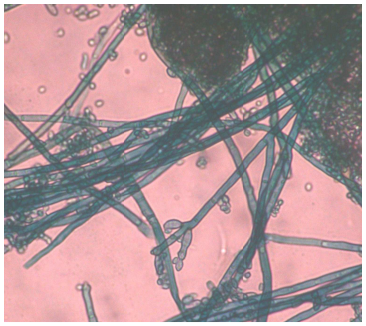
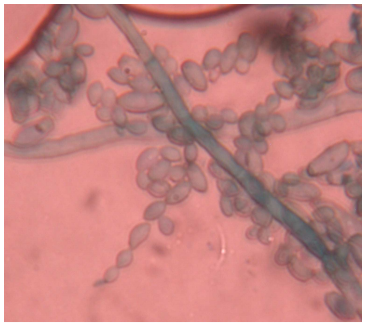
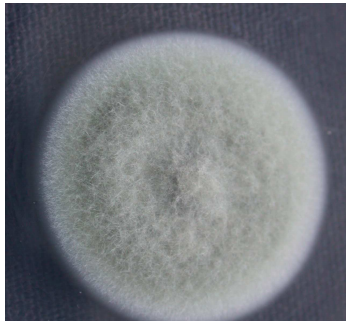
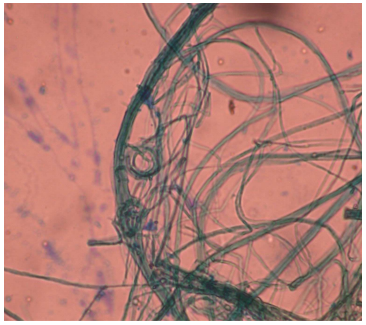
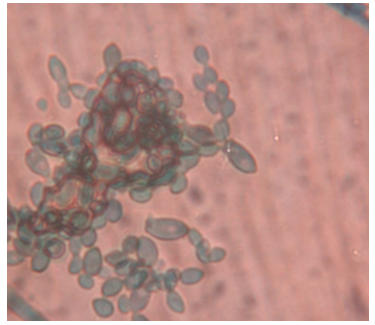
Apéndice 3. Registro fotográfico de los hongos epífitos y endófitos aislados en dos diferentes zonas de Costa Rica.

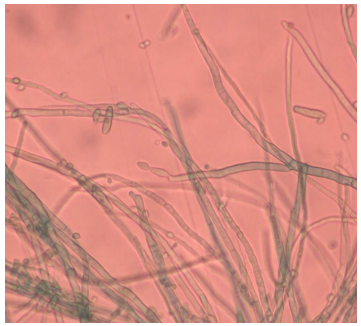
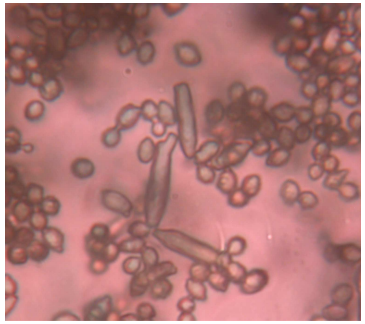
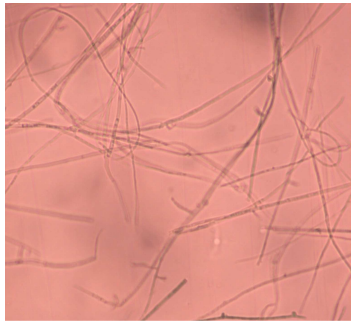
ID	Microorganismo	Crecimiento en placa	Micelio	Obj	Estructuras reproductivas	Obj
H1	No Identificado			40X	No observadas	__
H2	No Identificado			40X	No observadas	__

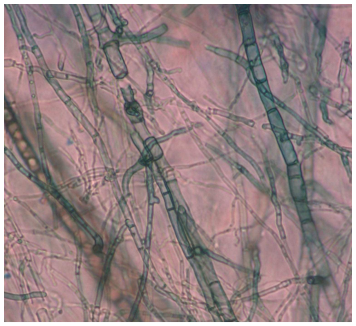
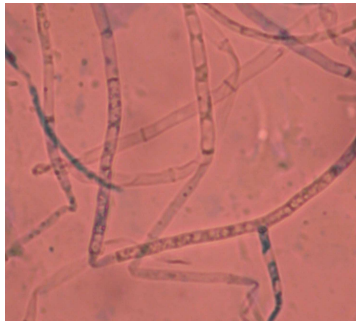
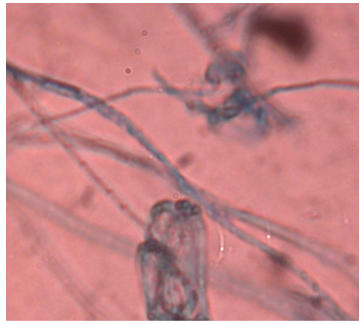
H3	No identificado			40X		100X
H4	*Cladosporium sp.*			40X		100X
H5	No Identificado			40X	No observadas	__

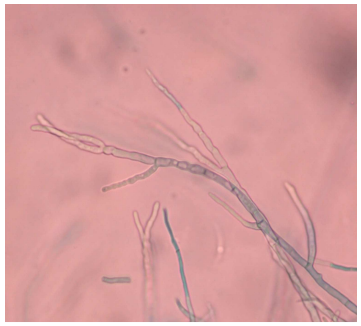
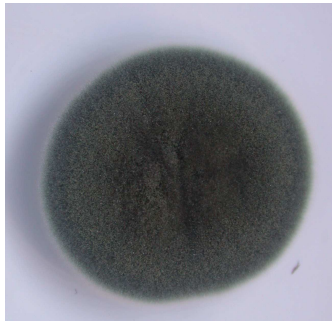
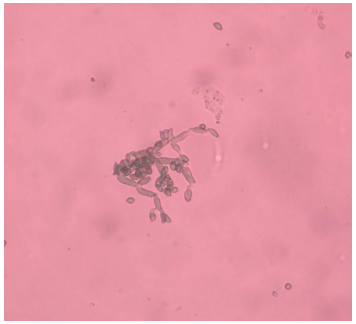
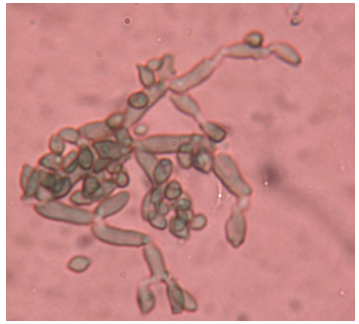
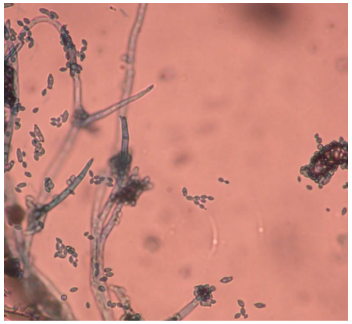
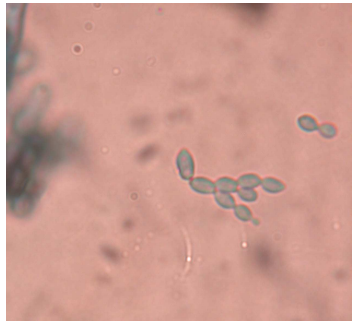
H6	No identificado			40X	No observadas		__
H7	*Cladosporium sp.*			40X			100X
H8	No Identificado			40X	No observadas		__

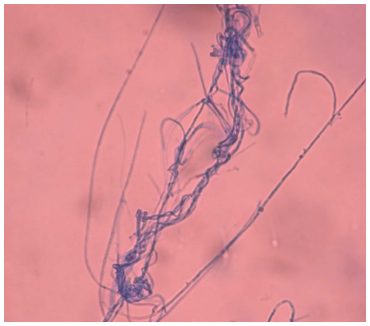
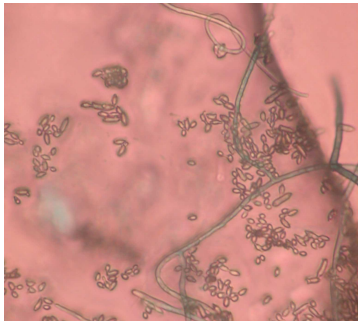
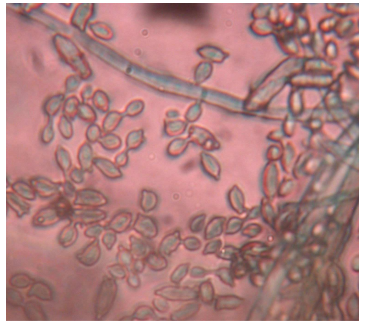
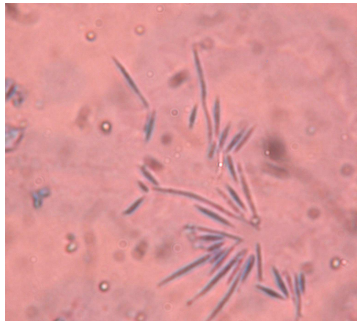
H9	No identificado			100X	No observadas	__
H10	No Identificado			40X	No observadas	__
H11	No Identificado			100X	No observadas	__

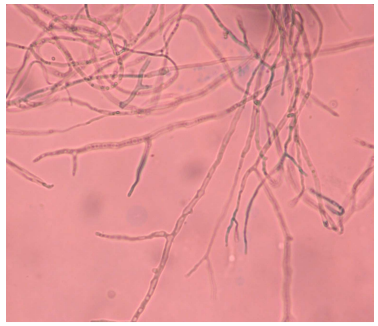
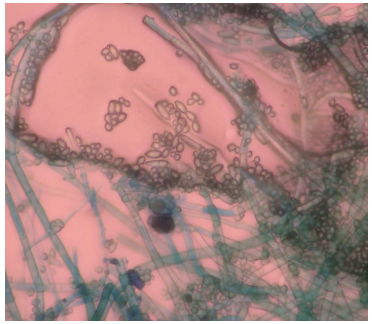
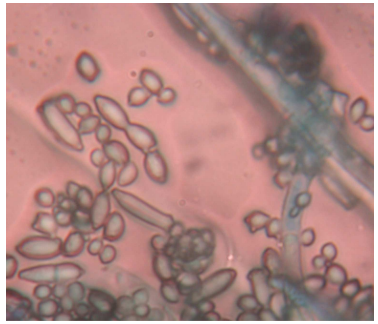
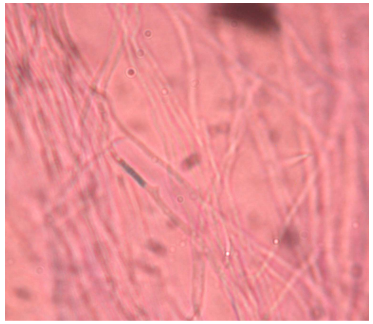
H12	*Cladosporium sp.*			40X		100X
H13	No Identificado			40X	No observadas	__
H14	*Cladosporium sp.*			40X		100X

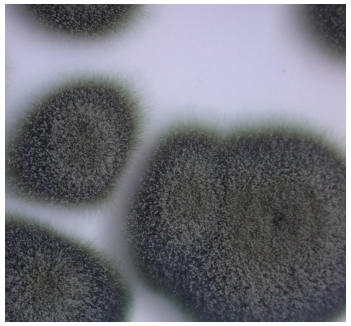
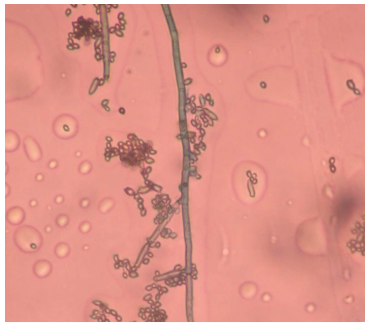
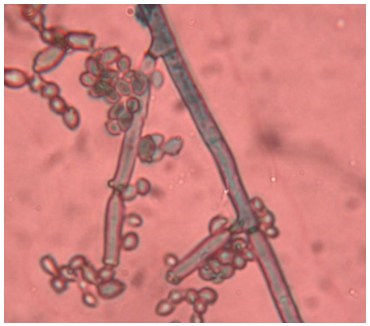
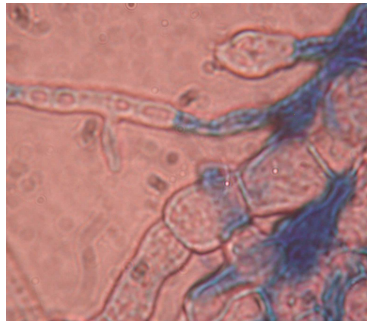
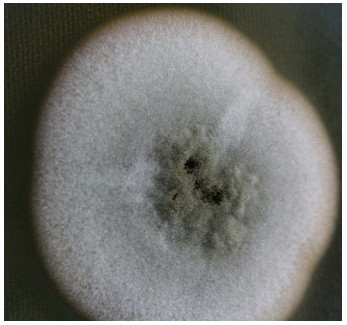
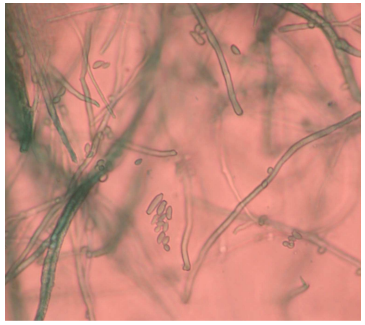
H15	*Cladosporium sp.*			40X		100X
H16	*Cladosporium sp.*		No disponible	__		100X
H17	No Identificado			40X	No observadas	__

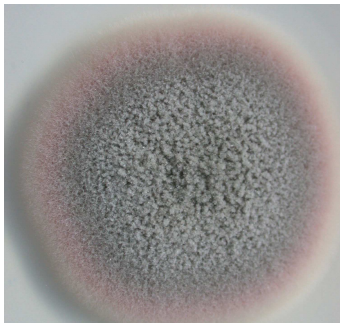
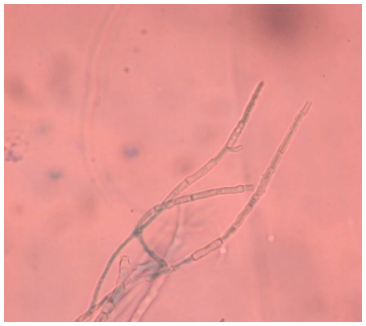
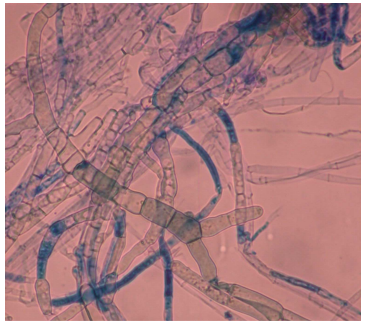
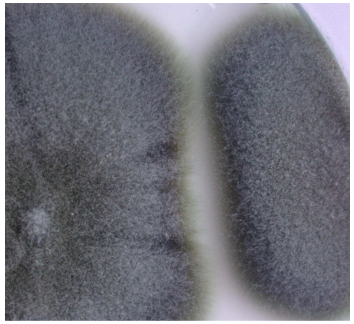
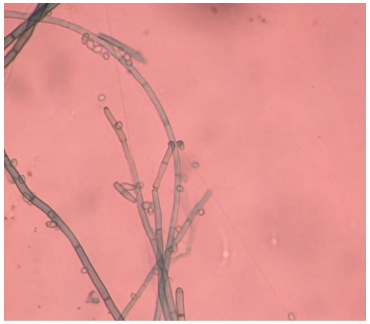
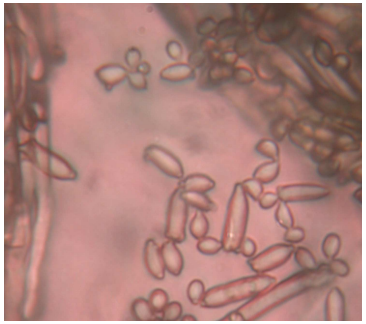
H18	No identificado			40X	No observadas	__
H19	No Identificado			100X	No observadas	__
H20	No Identificado			100X	No observadas	__

H21	No identificado			40X	No observadas		__
H22	*Cladosporium sp.*			40X			100X
H23	*Cladosporium sp.*			40X			100X

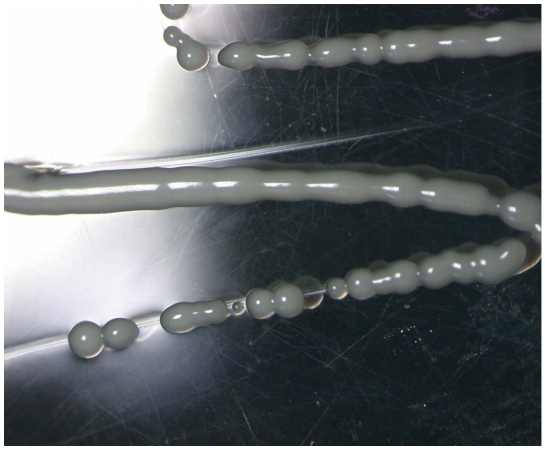
H24	No identificado			40X	No observadas	—	
H25	*Cladosporium sp.*			40X		100X	
H26	No Identificado		No observado	—		100X	

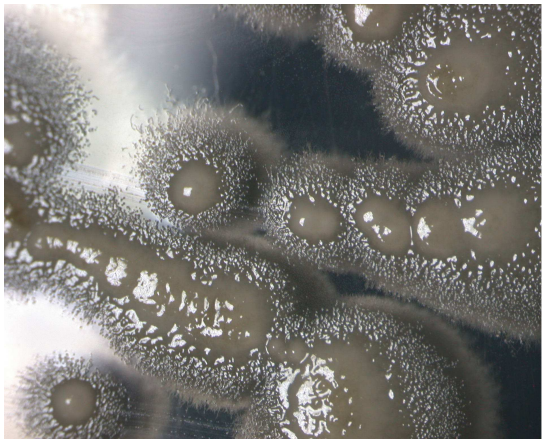
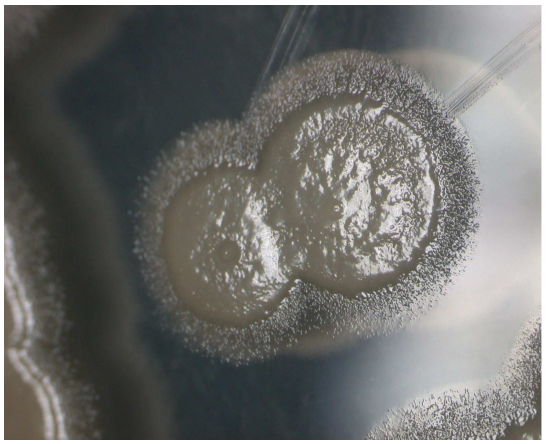
H27	No identificado			40X	No observadas		__
H28	*Cladosporium sp.*			40X		100X	
H29	No Identificado			40X	No observadas		__

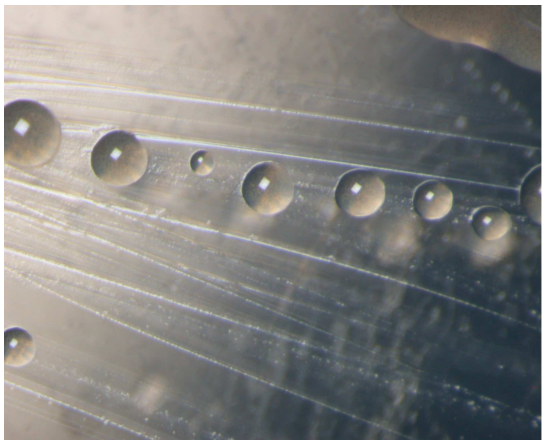
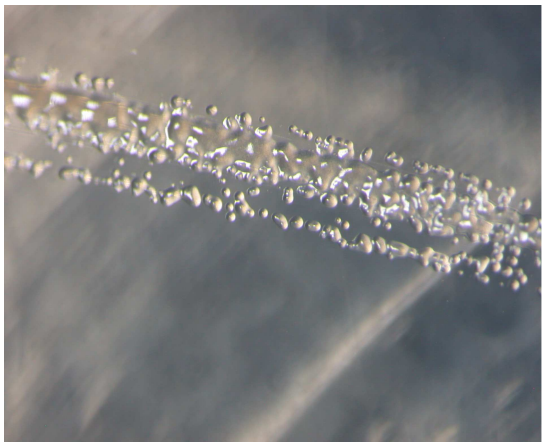
H30	*Cladosporium sp.*			40X		100X
H31	No Identificado			100X	No observadas	__
H32	*Cladosporium sp.*			40X		100X

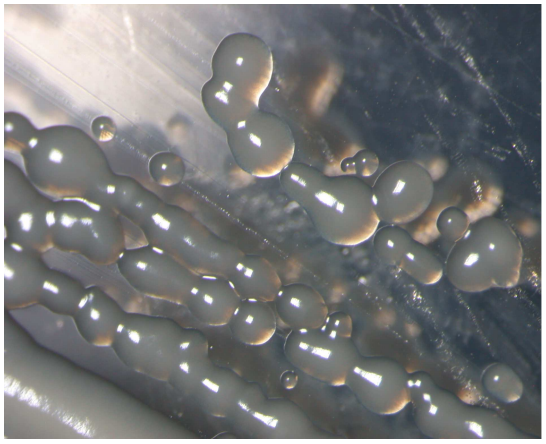
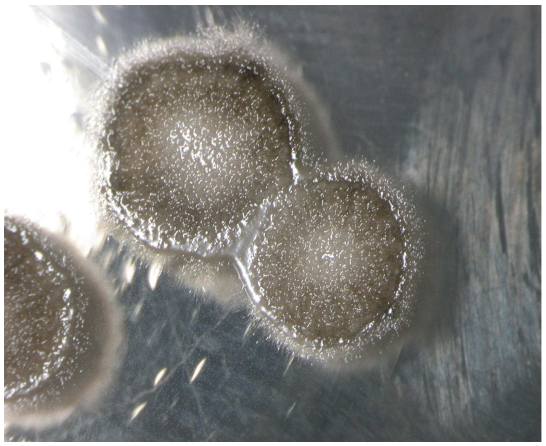
H33	No identificado			40X	No observadas	__	
H34	No Identificado			40X	No observadas	__	
H35	*Cladosporium sp.*			40X		100X	

Apéndice 4. Registro fotográfico de las levaduras epífitas y endófitas aisladas en dos diferentes zonas de Costa Rica.

ID	Microorganismo	Colonia en PDA	Objetivo
L1	No identificado		5X
L2	No identificado		0.8X
L3	No identificado		0.8X

L4	No identificado		0.8X
L5	No identificado		0.8X
L6	No identificado		0.8X

L7	No identificado		0.8X
L8	No identificado		1X
L9	No identificado		2.5X

L10	No identificado		1.25X
L11	No identificado		0.8X

ANEXOS

Anexo 1. Preparación de un Litro de solución de Buffer de Fosfato

En un volumen de 1000ml de agua destilada se mezclan hasta disolver 6, 75g de KH_2PO_4 (Fosfato de potasio monobásico anhídro) y 8,75g de K_2HPO_4 (Fosfato de potasio dibásico anhídro) con ayuda de un agitador magnético. Una vez disueltos los reactivos se ajusta el pH a 7,0 unidades y se autoclava la solución a 121º C por 30 minutos. Se almacena a temperatura ambiente hasta su uso (Morris *et al*., 1997)

.

Anexo 2. Preparación de un Litro de solución de Buffer PBS 1X

En un volumen de 1000ml de agua destilada se mezclan hasta disolver 8,0g de Cloruro de Sodio; 1,15g de Fosfato de Sodio Dibásico (Anhidro); 0,2g de Fosfato de Potasio Monobásico (Anhidro) y 0,2g de Cloruro de Potasio con ayuda de un agitador magnético. Una vez disueltos los reactivos se ajusta el pH a 7.4 unidades y se autoclava la solución a 121º C por 15 minutos. Se almacena a temperatura ambiente hasta su uso (Chacón, 2008).