

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA *IN VITRO* DE SUSTANCIAS  
QUÍMICAS Y MICROORGANISMOS ANTAGÓNICOS DEL GÉNERO  
*Trichoderma* spp., COMO HERRAMIENTA PARA LA TOMA DE  
DECISIONES EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES  
“CASO MUERTE DESCENDENTE DEL CULTIVO DE PIÑA  
*Ananas comosus* (L) Merr”**

**JHONNY VÁSQUEZ JIMÉNEZ**

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

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

**2009**

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA *IN VITRO* DE SUSTANCIAS  
QUÍMICAS Y MICROORGANISMOS ANTAGÓNICOS DEL GÉNERO  
*Trichoderma* spp., COMO HERRAMIENTA PARA LA TOMA DE  
DECISIONES EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES  
“CASO MUERTE DESCENDENTE DEL CULTIVO DE PIÑA  
*Ananas comosus* (L) Merr”**

**JHONNY VÁSQUEZ JIMÉNEZ**

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

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

**2009**

**EVALUACIÓN DE LA EFICACIA *IN VITRO* DE SUSTANCIAS  
QUÍMICAS Y MICROORGANISMOS ANTAGÓNICOS DEL GÉNERO  
*Trichoderma* spp., COMO HERRAMIENTA PARA LA TOMA DE  
DECISIONES EN EL CONTROL DE ENFERMEDADES  
“CASO MUERTE DESCENDENTE DEL CULTIVO DE PIÑA  
*Ananas comosus* (L) Merr”**

**JHONNY VÁSQUEZ JIMÉNEZ**

Aprobado por los miembros del Tribunal Evaluador:

Ing. Agr. Xiomara Mata Granados, Lic.

\_\_\_\_\_  
Asesora

Ing. Agr. Miguel Obregón Gómez, PhD

\_\_\_\_\_  
Jurado

Ing. Agr. Zulay Castro Jiménez, MGA

\_\_\_\_\_  
Jurado

Ing. Agr. Fernando Gómez Sánchez, MAE

\_\_\_\_\_  
Coordinador  
Trabajos Finales de Graduación

Ing. Agr. Arnoldo Gadea Rivas, MSc

\_\_\_\_\_  
Director  
Escuela de Agronomía

**2009**

## DEDICATORIA

A la memoria de mi padre Nicolás Vásquez Ovarés...  
A mi madre Lidia Jiménez Sandí.



## AGRADECIMIENTO

A mi Señor Jesucristo, por la dirección, convicción y apoyo en los retos que emprendo, así como todas las enseñanzas y formación de carácter con las que me enriquece en el transcurso de ellas y hasta alcanzarlas.

Al señor Gabriel Montoya Aristizabal, por su apoyo empresarial en tiempo, espacio y finanzas para la elaboración de este estudio.

Al señor Roger Hidalgo Mora, por su aporte en la visión gerencial de los problemas fitosanitarios potenciales que puede enfrentar a futuro el cultivo de la piña.

A Xiomara Mata Granados, por la dedicación extraordinaria en tiempo y profesionalismo en la dirección de esta tesis.

Al señor Miguel Obregón Gómez, por su asesoría y facilitar su micoteca de *Trichoderma* para la realización de parte de esta investigación.

A Zulay Castro Jiménez, por sus importantes aportes en la revisión de este documento.

Al señor Fernando Gómez Sánchez, por su apoyo y consejo en las consultas realizadas.

# TABLA DE CONTENIDO

|                          |  |               |
|--------------------------|--|---------------|
| <b>DEDICATORIA</b> ..... |  | <b>IV</b>     |
| <b>1.</b>                | <b>INTRODUCCIÓN</b> .....  | <b>- 1 -</b>  |
| 1.1                      | OBJETIVO GENERAL .....   | - 3 -         |
| 1.2                      | OBJETIVO ESPECÍFICOS.....  | - 3 -         |
| <b>2.</b>                | <b>REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....  | <b>- 4 -</b>  |
| 2.1                      | ORIGEN Y CLASIFICACIÓN DEL CULTIVO DE PIÑA .....   | - 4 -         |
| 2.2                      | REQUERIMIENTOS EDAFOCLIMÁTICOS DEL CULTIVO DE PIÑA .....   | - 5 -         |
| 2.2.1                    | TEMPERATURA .....  | - 6 -         |
| 2.2.2                    | PRECIPITACIÓN .....  | - 7 -         |
| 2.2.3                    | TOPOGRAFÍA.....  | - 8 -         |
| 2.2.4                    | FERTILIDAD.....  | - 8 -         |
| 2.2.5                    | TEXTURA .....  | - 9 -         |
| 2.3                      | ASPECTOS FITOSANITARIOS DEL CULTIVO DE LA PIÑA .....   | - 9 -         |
| 2.4                      | SITUACIÓN ACTUAL DE LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIES DE FUSARIUM.....   | - 10 -        |
| 2.4.1                    | SINTOMATOLOGÍA DE LA FUSARIOSIS DE LA PIÑA .....   | - 12 -        |
| 2.4.2                    | SINTOMATOLOGÍA DE LA PUDRICIÓN DEL TALLO POR FUSARIUM.....   | - 13 -        |
| 2.5                      | ALTERNATIVAS PARA EL COMBATE DE LA ENFERMEDAD CAUSADA POR FUSARIUM .....   | - 14 -        |
| 2.5.1                    | ALTERNATIVAS QUÍMICAS “FUNGICIDAS” .....   | - 15 -        |
| 2.5.1.1                  | TRIADIMEFON.....   | - 15 -        |
| 2.5.1.2                  | CARBENDAZIM.....   | - 16 -        |
| 2.5.2                    | ALTERNATIVAS BIOLÓGICAS .....  | - 17 -        |
| <b>3.</b>                | <b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....  | <b>- 19 -</b> |
| 3.1                      | UBICACIÓN .....  | - 19 -        |
| 3.2                      | METODOLOGÍA .....  | - 19 -        |
| 3.2.1                    | OBTENCIÓN DE LA MUESTRA .....  | - 19 -        |
| 3.2.2                    | AISLAMIENTO DEL AGENTE CAUSAL DE LA MUERTE DESCENDENTE DEL CULTIVO DE PIÑA .....   | - 19 -        |
| 3.2.2.1                  | PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS A ANALIZAR .....   | - 19 -        |
| 3.2.2.2                  | SIEMBRA E INCUBACIÓN DE LOS AISLADOS .....   | - 19 -        |
| 3.2.2.3                  | OBTENCIÓN DE CULTIVOS AXÉNICOS .....   | - 20 -        |
| 3.2.2.4                  | CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL AGENTE CAUSAL .....  | - 20 -        |
| 3.2.3                    | BIOENSAYOS IN VITRO CON SUSTANCIAS QUÍMICAS VRS EL AGENTE CAUSAL .....   | - 21 -        |
| 3.2.3.1                  | SELECCIÓN DE LOS FUNGICIDAS .....  | - 21 -        |
| 3.2.3.2                  | ESTABLECIMIENTO BIOENSAYOS MEDIANTE TÉCNICA DE MEDIOS ENMENDADOS Y DISCOS<br>IMPREGNADOS.....  | - 22 -        |
| 3.2.4                    | EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD IN VITRO DE AISLADOS DE HONGOS DEL GÉNERO TRICHODERMA<br>VRS EL AGENTE CAUSAL CARACTERIZADO. ....                 | - 24 -        |
| 3.2.4.1                  | ESTABLECIMIENTO DE BIOENSAYOS DE CULTIVOS DUALES .....   | - 24 -        |
| 3.2.4.2                  | BIOENSAYOS DE POTENCIAL FUNGISTÁTICO DEL MICROORGANISMO ANTAGONISTA SOBRE EL<br>AGENTE CAUSAL CARACTERIZADO.....                               | - 25 -        |
| 3.3                      | DISEÑO EXPERIMENTAL .....  | - 25 -        |
| 3.4                      | MODELOS MATEMÁTICOS EMPLEADOS EN EL ANÁLISIS ESTADÍSTICO: .....  | - 25 -        |
| 3.4.1                    | PARA LA EVALUACIÓN DE LAS ALTERNATIVAS QUÍMICAS.....   | - 25 -        |
| 3.4.2                    | PARA LA EVALUACIÓN DE LAS ALTERNATIVAS BIOLÓGICAS .....  | - 26 -        |
| <b>4.</b>                | <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....  | <b>- 27 -</b> |
| 4.1                      | CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DEL AGENTE CAUSAL DE LA MUERTE DESCENDENTE EN EL<br>CULTIVO DE LA PIÑA .....                                       | - 27 -        |
| 4.2                      | CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL AGENTE CAUSAL DE LA MUERTE DESCENDENTE EN EL CULTIVO<br>DE LA PIÑA .....   | - 30 -        |
| 4.3                      | CARACTERIZACIÓN DE LOS SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD LLAMADA MUERTE DESCENDENTE DEL<br>CULTIVO DE PIÑA CAUSADA POR HONGOS DEL GÉNERO FUSARIUM..... | - 31 -        |

|       |   |        |
|-------|---|--------|
| 4.4   | BIOENSAYOS IN VITRO DE SUSTANCIAS QUÍMICAS CONTRA EL AGENTE CAUSAL AISLADO F. OXYSPORUM .....           | - 38 - |
| 4.4.1 | INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO RADIAL (IC) DE F. OXYSPORUM EN LA TÉCNICA DE MEDIOS ENMENDADOS .....         | - 39 - |
| 4.4.2 | BIOENSAYO IN VITRO PORCENTAJE DE COLONIZACIÓN DE F. OXYSPORUM EN LA TÉCNICA DE DISCOS IMPREGNADOS. .... | - 47 - |
| 4.5   | BIOENSAYOS IN VITRO DE ENFRENTAMIENTOS DE TRICHODERMA SPP CONTRA F. OXYSPORUM ..                        | - 53 - |
| 4.5.1 | BIOENSAYOS DE ANTAGONISMO DE TRICHODERMA SPP CONTRA F. OXYSPORUM EN CULTIVOS DUALES .....               | - 54 - |
| 4.5.2 | POTENCIAL FUNGISTÁTICO DE TRICHODERMA SPP CONTRA F. OXYSPORUM .....                                     | - 60 - |
| 5.    | <b>CONCLUSIONES</b> .....   | - 64 - |
| 6.    | <b>RECOMENDACIONES</b> .....  | - 65 - |
| 7.    | <b>LITERATURA CONSULTADA</b> .....  | - 66 - |
| 8.    | <b>APENDICE</b> .....   | - 70 - |

## LISTA DE CUADROS

| Número | Título   | Página |
|--------|--|--------|
| 1.     | Fungicidas y concentraciones de i.a evaluados sobre el agente causal de la muerte descendente del cultivo de piña.   | - 21 - |
| 2.     | Tabla de comparación medias para la interacción A x B (fungicida y tiempo de evaluación) en el bioensayo de sustancias químicas contra <i>F. oxysporum</i> en la técnica de medios enmendados.                     | - 39 - |
| 3.     | Comparación de medias para la interacción A x C (fungicida y dosis evaluada) de medios enmendados, en el bioensayo de sustancias químicas contra <i>F. oxysporum</i> en la técnica de medios enmendados.           | - 41 - |
| 4.     | Comparación de medias para la interacción BxC (tiempo de evaluación y dosis evaluada) de medios enmendados, en el bioensayo de sustancias químicas contra <i>F. oxysporum</i> en la técnica de medios enmendados.  | - 42 - |
| 5.     | Comparación de medias para interacción A x B x C (fungicida, tiempo de evaluación y dosis evaluada) en técnica de medios enmendados con fungicidas del bioensayo contra <i>F. oxysporum</i> .                      | - 45 - |
| 6.     | Comparación de medias para la interacción A x C (fungicida y dosis evaluada) del porcentaje de colonización del agente causal en medios de cultivo con discos impregnados con los diferentes ingredientes activos. | - 49 - |
| 7.     | Características técnicas y fisicoquímicas de los ingredientes activos evaluados en el control de <i>F. oxysporum</i> en las pruebas de eficacia biológica con fungicidas.  | - 51 - |
| 8.     | Comparación de medias para la interacción CEPA x HDS en la variable porcentaje de colonización del enfrentamiento de <i>Trichoderma</i> sp contra <i>F. oxysporum</i> en la técnica de cultivos duales.            | - 55 - |
| 9.     | Comparación de medias en la variable porcentaje de colonización para el factor Cepa en la técnica de potencia fungistático de <i>Trichoderma</i> spp contra <i>F. oxysporum</i> .                                  | - 61 - |
| 10.    | Niveles óptimos de ufc/gr de suelo.  | - 63 - |

## LISTA DE FIGURAS

| Número | Título  | Página |
|--------|---|--------|
| 1.     | Protocolo para la identificación de especies de <i>Fusarium</i> según Summerell <i>et al.</i> (2003).   | - 11 - |
| 2.     | Ciclo de la fusariosis de la piña causada por <i>Fusarium guttiforme</i> (Syn: <i>Fusarium subglutinans</i> f. sp. <i>ananas</i> ). (Traducido de Ventura (2008)).  | - 14 - |
| 3.     | Morfología de la colonia aislada en medio de cultivo PDA. Aislamiento proveniente de tallo de planta de piña con sintomatología de muerte descendente del cultivo de la piña.                             | - 27 - |
| 4.     | Estructuras características del género <i>Fusarium</i> sp, obtenida de aislamientos de tallo de plantas de piña con sintomatología de la muerte descendente del cultivo de la piña.                       | - 28 - |
| 5.     | Muestra los conidios aislados de tallo de planta de piña con síntoma de la muerte descendente del cultivo de piña, microconidios (a), macroconidios (b).  | - 28 - |
| 6.     | Muestra una clamidospora aislada de tallo de planta de tallo de planta de piña con síntoma de la muerte descendente del cultivo de la piña, clamidospora (c).   | - 29 - |
| 7.     | Condición de una plantación de piña afectada por <i>F. oxysporum</i> , con edad de 5 meses.   | - 33 - |
| 8.     | Sintomatología de <i>F. oxysporum</i> .en planta de piña.   | - 33 - |
| 9.     | Daño de <i>F. oxysporum</i> . en tallo de planta de piña.   | - 34 - |
| 10.    | Síntoma foliar típico de una planta enferma por <i>F. oxysporum</i> .   | - 37 - |
| 11.    | Síntoma de la mancha cristalina del cultivo de la piña.   | - 38 - |
| 12.    | Comparación de medias para la interacción de los factores AxB (fungicidas y tiempos de evaluación), en el bioensayo de sustancias químicas contra <i>F. oxysporum</i> en la técnica de medios enmendados. | - 40 - |
| 13.    | Comparación de medias para la interacción de los factores AxC (fungicidas y dosis evaluadas), en el bioensayo de sustancias químicas contra <i>F. oxysporum</i> en la técnica de medios enmendados.       | - 41 - |

14. Comparación de medias para la interacción de los factores B x C (tiempo de evaluación y dosis evaluadas), en el bioensayo de sustancias químicas contra *F. oxysporum* en la técnica de medios enmendados. - 43 -
15. Comparación de medias para la interacción de los factores A x B x C (fungicidas, tiempo de evaluación y dosis evaluadas), en la técnica de medios enmendados, en el bioensayo de sustancias químicas contra *F. oxysporum* en la técnica de medios enmendados. - 44 -
16. Comparación de medias para la interacción A x .C (fungicida y dosis evaluada) del porcentaje de colonización del agente causal en medios de cultivo con discos impregnados con los diferentes ingredientes activos. - 48 -
17. Comparación del porcentaje de colonización en la interacción CEPA x HDS del enfrentamiento de *Trichoderma* sp contra *F. oxysporum* en la técnica de cultivos duales. - 54 -
18. Fotografía de *Trichoderma* spp Cepa 7 en enfrentamiento dual contra *F. oxysporum* en la evaluación de las 120 horas. - 56 -
19. Comparación de medias para la interacción CEPAXHDS de cepas de *Trichoderma* spp que crecieron en medio agar dextrosa sin presencia de otro organismo. - 57 -
20. Inicio de la colonización de *Trichoderma* spp Cepa 5 de áreas previamente colonizadas por *F. oxysporum*, evaluación de las 60 HDS. - 58 -
21. Curva de crecimiento general (cm/hora) de *Trichoderma* sp y *F. oxysporum* enfrentados bajo la técnica de cultivos duales. - 58 -
22. Colonización de *Trichoderma* spp Cepa 6 de áreas previamente colonizadas por *F. oxysporum*, evaluación de las 60 HDS. - 59 -
23. Curvas y ecuaciones de crecimiento polinomial para cada cepa de *Trichoderma* sp en presencia de *F. oxysporum*, enfrentados bajo la técnica de cultivos duales. - 59 -
24. Porcentaje de colonización por hora de cada cepa de *Trichoderma* spp en presencia de *F. oxysporum*, enfrentados bajo la técnica de cultivos duales. - 60 -
25. Comparación de medias en la variable porcentaje de colonización para el factor Cepa en la técnica de potencial fungistático de *Trichoderma* spp contra *F. oxysporum*. - 60 -

## RESUMEN

Se aisló y caracterizó molecularmente el agente que causa la enfermedad denominada “muerte descendente del cultivo de la piña”, identificándolo como *Fusarium oxysporum*, enfermedad que se caracteriza por un desecamiento de las hojas, notable pérdida de vigor de la plantación y severas lesiones a nivel vascular, específicamente en el tallo. Este problema fitosanitario fue catalogado por otros autores como una enfermedad emergente en el cultivo, razón por la cual no existen muchos productos registrados para el control de este patógeno, por lo que se evaluó ***In vitro*** la efectividad de siete ingredientes activos (i.a) en dosis altas, medias y bajas, dos de los i.a con registro y autorización para ser utilizados en el cultivo de piña en Costa Rica, los bioensayos se establecieron mediante la técnica de medios enmendados y discos impregnados, además con el objetivo de impulsar un manejo integrado, se establecieron ensayos ***In Vitro*** para determinar el efecto antagonista de diez cepas nativas de *Trichoderma* spp sobre el agente causal aislado, mediante las técnicas de cultivos duales y potencial fungistático.

Se encontró que los fungicidas carbendazim y metil-thiophanato, el primero con registro de uso en el cultivo de piña en Costa Rica, inhiben 100% el crecimiento de *F. oxysporum* en las tres dosis evaluadas. El i.a, spiroxamine, inhibe el desarrollo del hongo 100% a dosis media y alta, sin diferencias estadísticas entre ellos, encontrándose que *F. oxysporum* es altamente sensible a estos fungicidas. Se encontraron resultados medianamente sensibles de *F. oxysporum* para el difeconazol y pyraclostrobin de 60% a 75% de dosis media a alta y baja sensibilidad para el bitertanol y el triadimefon, inferior a 40%, este último con registro para el cultivo de piña en Costa Rica.

En las pruebas de cultivos duales así como en las de potencial fungistático se determinó que las diferentes cepas evaluadas inhiben el crecimiento y desarrollo de *F. oxysporum*, observando que además éstas muestran diferentes mecanismos de acción tales como competencia, lisis y antibiosis, micoparasitismo, así como producción de metabolitos volátiles y no volátiles, características deseables en un agente biocontrolador (BCAs), de las cepas evaluadas destacó la número siete contra el fitopatógeno.

Palabras claves: piña, *Fusarium oxysporum*, eficacia biológica, ***In vitro***.

## ABSTRACT

Was isolated and molecularly characterized the agent that causes the disease known as “death downstream of the pineapple crop” or “Bromelias Blight” and identified as *Fusarium oxysporum*, a disease that is characterized by drying up of leaves, loss of significant effect of planting and severe vascular lesions, specifically in the stem. The plant health was branded by other authors as an emerging disease in the crop, which is why there are not many products registered to control this pathogen, which was evaluated *In vitro* the effectiveness of seven active ingredients (a.i) at doses high, medium and low, two of i.a with registration and approval for use in the pineapple crop in Costa Rica, the bio-trials were established by means of technical amendments and disks impregnated also with the aim of fostering an integrated, were established *In vitro* trials to determine the antagonistic effect of ten native strains of *Trichoderma* spp on the causative agent isolated *F. oxysporum*, using the techniques of cultivation and potential dual fungistatic.

We found that the fungicides carbendazim and methyl thiophanato, (the first recorded for pineapple use in Costa Rica), inhibit the growth of 100% *F. oxysporum* in three doses tested. The spiroxamine (a.i) inhibits the development of the fungus 100% in medium and high doses, without statistical differences between them, indicating that *F. oxysporum* is highly sensitive to these fungicides. In addition, results were found moderately susceptible to *F. oxysporum* difeconazol and pyraclostrobin with 60% to 75% of medium to high dose and low sensitivity to bitertanol and triadimefon with less than 40%, the last molecule is already registered for pineapple use in Costa Rica.

In tests of dual crops and of fungistatic potential is determined that the different strains tested inhibited growth and development of *F. oxysporum*, noting that they also show different mechanisms of action such as competition, antibiosis and lysis, mycoparasitism and production of volatile metabolites and non-volatile, characteristics desirable in a biocontrol agents (BCAs) of the evaluated strains highlighted the number seven against the phytopathogen.

Keywords: pineapple, *Fusarium oxysporum*, biological effectiveness, *In vitro*.



## 1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de la piña es una actividad agrícola de mucha importancia para varios países, entre estos, Brasil figura como el país con la mayor área de terreno cultivada de piña en el mundo superando las 76.000 hectáreas netas de cultivo; sin embargo su participación en el mercado internacional es reducida ya que su producción se dirige al mercado local (Ventura *et al.* 2008). Mientras que, datos actualizados al primer semestre 2008 por la Cámara Nacional de Productores y Exportadores de piña “CANAPEP” indican que, Costa Rica posee 40.000 hectáreas netas en producción de piña (33% más con respecto al año anterior), de las cuales la Zona Norte representa 50% del área en producción y con 98% de los productores, seguido de la Zona Atlántica con 1.5% de los productores y 31% del área, por último la región Pérez Zeledón y Pacífico Sur con 0.5% de los productores y 18% del área.

Tradicionalmente en Costa Rica se sembró la variedad Monte Lirio sin embargo, a finales de la década de los 70s la transnacional Del Monte adquirió las áreas de piña de Del Campo, donde a partir de 1982 y durante ocho años, mantuvo la exclusividad del clon Ch F 153, conocido como Champaka y para finales de la década de los noventa introdujo el híbrido MD-2 del cual solo Del Monte exportaba (Jiménez 1999). Según cifras de FAO (2008), en la actualidad Costa Rica comercializa alrededor de 39% de fruta fresca, mientras que Filipinas apenas alcanza 14% y Costa de Marfil 12%. En informes del CNP del 2008, se indica que la piña es el segundo producto agrícola de importancia y el cuarto en la exportación nacional, siendo superado por el banano, los microchips y el turismo.

Esta posición coloca este cultivo como una fuente de considerables ingresos y generación de empleo en el país. En el 2008 generó \$US644.40 millones, 20.1% más que en el 2007 (CNP 2009), sin embargo la intensificación de este cultivo desde finales de la década de los 70s, ha ido acompañado por la adopción de tecnologías totalmente nuevas en el país, que según Obregón y Mata (2008) a traído como consecuencia problemas fitosanitarios que eventualmente pueden ser confundidos por problemas de tipo abiótico. Con el objetivo de contrarrestar el efecto de éstos, se

han aplicado métodos de combate basados en el uso intensivo de sustancias químicas, lo que ha generado una serie de problemas y críticas por los aparentes daños ambientales y a la salud pública, por lo cual se plantea la búsqueda de alternativas, de tal manera que se logre alcanzar un sistema de producción sostenible.

Estas alternativas no se reducen únicamente a la selección y aplicación de sustancias químicas, sino también a la aplicación de tecnologías limpias como el uso de agentes de biológicos de control. Stefanova y colaboradores (1999) indican que en plantaciones de piña en Cuba, se aplican hongos antagonistas del género *Trichoderma* para el combate de *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium*, *Phytophthora* y *Fusarium*, logrando controlarlos eficientemente.

En ese sentido, a pesar de contar con fungicidas de una efectividad y selectividad alta y con el objetivo de responder a las normas establecidas en materia de buenas prácticas agrícolas (GLOBAL GAP), es necesario conocer cuales son los índices de sensibilidad que muestran los agentes causales de enfermedades en este cultivo ante ingredientes activos de baja residualidad o que su uso no esta permitido en este cultivo. Tal como lo menciona Hernández (1999), esta herramienta es trascendental pues en aquellos casos que corresponden con ingredientes activos aun no introducidos permiten llegar a obtener las líneas básicas de referencia para la determinación de cambios en poblaciones de campo.

Considerando lo anterior, y con el objetivo de establecer métodos de combate integrales, esta investigación plantea evaluar la efectividad *In vitro* de diferentes sustancias químicas registradas y no registradas para el combate de patógenos en el cultivo de la piña, así como la efectividad biológica de aislados de hongos del género *Trichoderma* sobre el agente que causa la muerte descendente en el cultivo de la piña.

## 1.1 Objetivo general

- Determinar la eficacia biológica *In Vitro* de sustancias químicas fungicidas y microorganismos antagonistas del género *Trichoderma* spp, para el control del agente causal de la muerte descendente del cultivo de la piña.

## 1.2 Objetivo específicos

- Aislar el agente causal de la muerte descendente del cultivo de piña.
- Obtener cultivos axénicos del agente causal de la muerte descendente del cultivo de piña.
- Caracterizar morfológica y molecularmente el agente causal de la muerte descendente del cultivo de piña.
- Seleccionar las sustancias químicas y dosis a evaluar.
- Seleccionar cepas de microorganismos antagonistas para el combate del agente causal de la muerte descendente del cultivo de la piña.
- Establecer bioensayos *In vitro* con las sustancias químicas y el agente causal de la muerte descendente del cultivo de piña.
- Evaluar el efecto antagonista de cepas seleccionadas sobre el agente causal de la muerte descendente del cultivo de piña.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 Origen y clasificación del cultivo de piña

Previo al descubrimiento de la fruta de piña por Cristóbal Colón en 1493 (Morrison 1963, citado por Bartholomew *et al.* 2003), considera que la fruta era ya un componente estable de los cultivos y dieta de los nativos americanos de las tierras bajas del trópico. Py (1987), menciona que la familia completa Bromeliaceae se originó en el Nuevo Mundo, con la excepción de una especie, *Pitcairnia feliciana*, la cual es originaria de Guinea, en el este de Africa. La familia Bromeliaceae contiene 50 géneros y alrededor de 2000 especies distribuidas en muchos hábitats; que van desde el caliente y húmedo trópico hasta frío y seco subtrópico. Este mismo autor menciona que las especies del género *Ananas* han sido clasificadas en diferentes vías, muchas especies y formas se han clasificado dependiendo del punto de vista de cada autor. Además las muestras de herbarios están incompletas, lo cual ha dificultado a botánicos reunir flores y frutas de cada muestra, particularmente porque se encuentran muy lejos.

En 1747, Rumphius publicó su “Herbario Amboinense”, en el cual dividió la piña en tres formas botánicas; masculina, femenina y alba. Mas tarde él mismo las clasificó como *Anassa silvestres* y la femenina como *Anassa domestica*. Los trabajos en taxonomía para el género *Ananas* fueron iniciados probablemente durante el siglo 16 cuando Charles Plumier (1755), un sacerdote Jesuita coleccionó plantas de piña en la Isla Hispaniola. Estas plantas fueron llamadas “Karatas” por los nativos, pero Plumier la llamó Bromelia en honor al físico sueco Olaf Bromel (Py 1987).

El género establecido por Plumier fue considerado oficialmente válido cuando Linnaeus publicó su “Especies plantarum” en 1753, en el cual designó las especies de Rumphius como; *Bromelia ananas* (que fue la *Anassa domestica* de Rumphius) y la *Bromelia comosa* (que fue la *Anassa silvestris* de Rumphius) (Py *et al.* 1987). En 1827, Lindley creó el género *Ananassa* y clasificó la piña como *Ananassa sativa*, luego en 1830, Schultes y Schultes crearon el género *Ananas*, con la especie *Anana sativus*, porque su creencia fue que la piña solo eran especies cultivadas.

En 1917, Merrill estableció la nomenclatura binomial *Ananas comosus* basado en Linnaeus *Bromelia comosa*, sinonimo de *Bromelia ananas*, porque la regla de tautónimos fue no permitir el uso de *Ananas ananas*. Bertoni (1919) dividió el género *Ananas* en seis especies: *A. guaraniticus*, *A. microstachys*, *A. microcephalus*, *A. muriaticus*, *A. bracteatus* y *A. sativus* y consideró frutas comestibles las pertenecientes a las especies *A. bracteatus* y *A. sativus*. En 1939, Smith dividió el género en cuatro especies: *A. bracteatus*, *A. comosus*, *A. erectifolius* y *A. ananassoides*; de acuerdo a él; las especies de Bertoni *A. sativus* es un sinónimo de *A. comosus*, *A. guaraniticus* y *A. microstachys* son sinónimos de *A. ananassoides*.

Finalmente Py (1987), resume que en 1979, Smith estableció ocho válidas especies dentro del género *Ananas*. Sin embargo menciona que el autor no estuvo totalmente satisfecho con su llave, por lo que ciertamente no se puede considerar definitiva. Las especies fueron: *A. monstrosus*, *A. ananassoides*, *A. nanas*, *A. parguazensis*, *A. lucidus*, *A. bracteatus*, *A. fritzmulleri*, *A. comosus*. La clasificación a pesar de diversos ensayos (Hume y Miller 1904; Bertoni 1919, Munro 1935), se considera que está todavía por establecer.

En la actualidad se continúa refiriéndose a las tres grandes divisiones instituidas por Humme y Miller: grupo “Cayenne”, grupo “Queen” y grupo “spanish”, a estos tres se agrega un cuarto grupo “Abacaxi” que en la clasificación de Humme y Miller se confunde con el grupo “spanish” (Py 1987). De acuerdo con Bartholomew *et al.* (2003) y Py *et al.* (1987), la piña comestible se clasifica taxonómicamente en: Orden *Bromeliales*; Familia *Bromeliaceae*; Subfamilia *Bromelioideae*; Género: *Ananas*; Especie: *comosus*.

## **2.2 Requerimientos edafoclimáticos del cultivo de piña**

Estudios de Malézieux *et al.* (2003) indican que la piña se cultiva desde los 4.5° Latitud Norte hasta los 26° 30´ Latitud Sur. Estos autores mencionan que la piña pocas veces requiere menos de 12 meses para completar su ciclo (siembra-cosecha),

y más comúnmente la duración del ciclo es de 18-24 meses e incluso hasta 36 meses en ambientes fríos subtropicales.

Las altas productividades del cultivo de piña dependen del éxito que se tenga en el manejo de los factores controlables, como el suministro de agua y nutrientes; así como también del control de plagas invertebradas y enfermedades. Factores ambientales como temperatura, irradiación y precipitación interactúan con el mecanismo CAM de las plantas, y las extraordinarias características morfológicas y anatómicas de la piña finalmente determinan la productividad dentro de un ambiente dado (Malézieux *et al.* 2003).

### **2.2.1 Temperatura**

El metabolismo ácido de las crasuláceas (CAM, del inglés, *Crassulacean Acid Metabolism*) debe su nombre a que se descubrió por primera vez en plantas de la familia de las crasuláceas, aunque no es exclusivo de dicho grupo. El nombre de metabolismo ácido hace referencia a la acumulación de ácidos orgánicos durante la noche por las plantas que poseen este mecanismo de fijación de carbono. En cualquier caso, la fotosíntesis CAM va asociada normalmente con hojas de anatomía suculenta, con grandes vacuolas llenas de agua (Azcón-Bieto y Talón 2000). De acuerdo con Py *et al.* (1987), si no existe déficit de agua, el termo período determina la actividad CAM de la piña.

Estudios realizados por Malézieux *et al.* (2003), revelan que temperaturas extremas sobre las hojas de piña causan daños no permanentes, pero que sus efectos específicos sobre los procesos fisiológicos no han sido estudiados; no obstante, consideran que los efectos de la temperatura sobre la conductancia estomática son significativos. Por su parte Bartholomew *et al.* (2003) indican que, bajo temperaturas de 30/26 °C, para el día y la noche respectivamente la planta de piña muestra una mejor respuesta en términos de ganancia de peso seco de la planta.

Py *et al.* (1987) reportan que la radiación solar tiene un efecto directo en las reacciones fotosintéticas y sobre la temperatura de las hojas. Adicionalmente

comentan que una cantidad mínima de radiación solar es necesaria para causar la descarboxilación total de los ácidos y que la completa descarboxilación es indispensable para la absorción durante la subsiguiente fase nocturna; donde la cantidad de absorción es directamente proporcional a la cantidad de energía solar previamente absorbida. La habilidad de los estomas para abrirse o cerrarse permite que la transpiración disminuya cuando no se está efectuando la fotosíntesis (Salisbury y Parke 1968).

En ambientes naturales, las hojas de las plantas que se desarrollan con poca radiación solar son largas, erectas y verde oscuro, mientras que las plantas que se desarrollan con alta radiación solar son rojizas o incluso amarillas (Bartholomew *et al.* 2003). Py *et al.* (1987) encontraron que, bajo condiciones experimentales de 11,5 horas luz y con temperaturas de 30 a 26,5 °C día/noche respectivamente la absorción de CO<sub>2</sub> aumenta con incrementos de la intensidad lumínica y resulta en la producción de más materia seca. Adicionalmente comentan que la producción de materia seca se ve limitada por intensidades lumínicas de menos de 30 klux.

### **2.2.2 Precipitación**

La piña puede desarrollarse en áreas con lluvias que varían desde 600 mm año<sup>-1</sup>, con una estación seca de varios meses, hasta 3.500 mm o 4.000 mm año<sup>-1</sup>. La adaptabilidad de la piña a diferentes regimenes es muy notable y esta capacidad de sobrevivir a pronunciados y prolongados periodos de estrés hídrico es muy destacada (Py *et al.* 1987). Estos autores reportan que en Hawai se obtuvieron altas producciones con una evaporación de 1.850 mm año<sup>-1</sup> y lluvias anuales de solo 1.000 mm año<sup>-1</sup>.

Py *et al.* 1987 encontraron que después de varios meses de sequía el crecimiento se detiene. En siembras de regiones bajas de Guinea estos autores encontraron que el crecimiento vegetativo se detiene de tres a tres y medio meses durante cinco meses de estación seca, en comparación con plantas con suministro normal de agua. La transpiración también depende de la disponibilidad de agua en el suelo. El suelo presentará una alta resistencia al paso de agua hacia la raíz, cuando

la cantidad de agua esté por debajo de la capacidad de campo. Esto indica la importancia que tiene el alto grado de contacto de la raíz con el suelo (Moreno 1991).

### **2.2.3 Topografía**

Bartholomew *et al.* (2003) mencionan que lo más importante a considerar en este sentido es la erosión, en cuanto al cultivo de piña debería seleccionarse los terrenos menos inclinados. Cuando las labores son manuales se han seleccionado terrenos extremadamente inclinados y cuando las labores son mecanizadas deben seleccionarse terrenos más planos. Reportan siembras en Australia en terrenos con 40% de pendiente con buenos resultados productivos pero con altas pérdidas de suelo por erosión.

### **2.2.4 Fertilidad**

Desde el punto de vista químico la acidez del suelo (pH) es la característica más relevante para el cultivo de piña. En ambientes controlados el potasio es más activamente absorbido que el calcio, y los nitratos más que los sulfatos. Esto resulta en la acidificación de la solución nutritiva sin tomar en cuenta el pH inicial, el cual influencia el crecimiento de la raíz y el crecimiento de la planta como un todo (Py *et al.* 1987). También indican que todos los estudios realizados a nivel de campo muestran que el pH óptimo está entre 4,50 y 5,50.

Bartholomew *et al.* (2003) mencionan que la piña se adapta bien a suelos ácidos, donde el pH de 4,5 a 5,5 reduce la incidencia de enfermedades que provienen del suelo; mencionan que es preferible evitar suelos con pH superiores a 7.0, indican que la piña tolera suelos de baja fertilidad, pero que las mejores producciones son obtenidas de suelos con alta fertilidad; afirman además que la piña tolera altos niveles de aluminio soluble y manganeso y que son deseados suelos con altos contenidos de materia orgánica y potasio.

Partiendo del valor óptimo, la producción decrece más rápidamente con un incremento en la acidificación que con un incremento en la alcalinización (Py *et al.* 1987). Además reportan que el aluminio extraíble incrementa rápidamente con decrecimientos de pH por debajo de 4,5, lo cual puede explicar las reacciones de la planta aunque el umbral de tolerancia al aluminio no es conocido. Estos autores



observaron que el pH alto limita el desarrollo radicular y causa el bloqueo de ciertos elementos traza. En consecuencia en lugares donde el origen del suelo explica las deficiencias o toxicidades el control del pH es el camino más efectivo para evitar la degradación del suelo y asegurar la óptima nutrición de elementos traza.

### **2.2.5 Textura**

La calidad del suelo puede ser evaluada en relación con las características de crecimiento de las plantas y el clima. La morfología de las raíces depende en alto grado de las características físicas del suelo. El sistema radical adventicio se encuentra alrededor del tallo en la base de las hojas, es extenso, sin ramificaciones y posee numerosos pelos absorbentes. Raíces similares se producen si el suelo está cubierto con plástico. Bajo condiciones de constante humedad se fomenta el normal crecimiento y la mayor actividad. (Py *et al.* 1987).

En suelos bien aireados, sin excesos de humedad, las raíces pueden desarrollar hasta más de 60 cm de longitud. Aunque esto no es posible en arenas ferralíticas donde una densidad aparente de  $1,4 \text{ g ml}^{-1}$  reduce considerablemente la elongación de las raíces y también afecta la morfología y la anatomía, incrementando la cantidad de médula y aerénquima y reduciendo el largo de las raíces (Py *et al.* 1987). Los pelos radicales son aún más sensibles que las raíces y la actividad de la raíz depende de la capacidad de los pelos de funcionar satisfactoriamente y aún más, de sobrevivir (Py *et al.* 1987).

De acuerdo con Bartholomew *et al.* (2003) un suelo ideal para el cultivo de piña debe ser alto en contenido de materia orgánica, con excelente drenaje interno y alta aireación, que provea una óptima cantidad de agua, nutrientes y oxígeno a las raíces.

### **2.3 Aspectos fitosanitarios del cultivo de la piña**

Son varios los insectos, ácaros, nemátodos y microorganismos que afectan la piña e informados a escala mundial, entre los citados por Bartholomew *et al.* (2003) de acuerdo a su repercusión económica, se encuentran *Carpophilus hemipterus* (L) y *Dysmicoccus brevipes* (Cockerell) entre los insectos de mayor importancia, ácaros

como *Dolichotetranychus floridanus* (Banks) y hongos como *Chalara paradoxa* (De Seynes) Sacc. y *Fusarium subglutinans* (Wollenw & Reinking) Nelson, Tousson & Marasas y *Phytophthora nicotianae* Breda de Hann, entre los más relevantes en cuanto a incidencia.

En el caso particular de Costa Rica, se encuentran, *Strymon basilides*, *Elaphria nucicolora*, *Dysmicoccus brevipes*, *Solenopsis geminata*, entre los insectos con mayor repercusión económica y *Phytophthora nicotianae*, *Phytophthora cinnamomi* también como microorganismos dañinos que atentan contra la productividad del cultivo (Jiménez 1999).

Por su parte Py *et al.* (1987) informan como hongo de importancia en la fase de plantación a *Pythium* spp, estos autores escriben que Klemmer y Nakano (1964) identificaron cinco diferentes especies patógenas de este género relacionados con la piña entre ellas *P. arrhenomames*, *P. graminicola*, *P. spendens*, *P. torulosum* y *P. irregular*. Mientras que Obregón y Mata (2008), en investigaciones recientes reportan en Costa Rica como el agente causal de la muerte descendente de plantas de piñas a *Fusarium* spp, señalando su importancia económica en este cultivo debido a los daños que causa en la planta, alta incidencia y severidad observada.

En Brasil Haroldo *et al.* (2000), Bartholomew *et al.* (2003), Carballo *et al.* (2007), Ventura *et al.* (2008), indican que de los problemas que limitan el cultivo de piña en este país es la fusariosis, informan pérdidas estimadas hasta 40% de fruta empacable y de 20% de material propagativo (entre hijos basales y guías).

#### **2.4 Situación actual de la identificación de especies de *Fusarium***

Summerell *et al.* (2003) señalan la necesidad de seguir un proceso de identificación lógico y sistemático a través de una serie de pasos involucrados. Indican que la historia de la biología del género *Fusarium* está plagado de publicaciones e informes que ahora son difíciles de interpretar debido, ya sea, a que el informe es ambiguo o porque está completamente equivocado. Afirman que infortunadamente este tipo de publicaciones siguen produciéndose en la actualidad.

Estos autores proponen un protocolo de flujo gráfico (Figura 1) para la clasificación de especies de *Fusarium*, consideran que el proceso de identificación se simplifica si este se aplica lógicamente, siguiendo los pasos que se indican cuidadosamente, y de esta forma las limitaciones en la información que pueden ser adquiridos son claramente identificadas y entendidas.

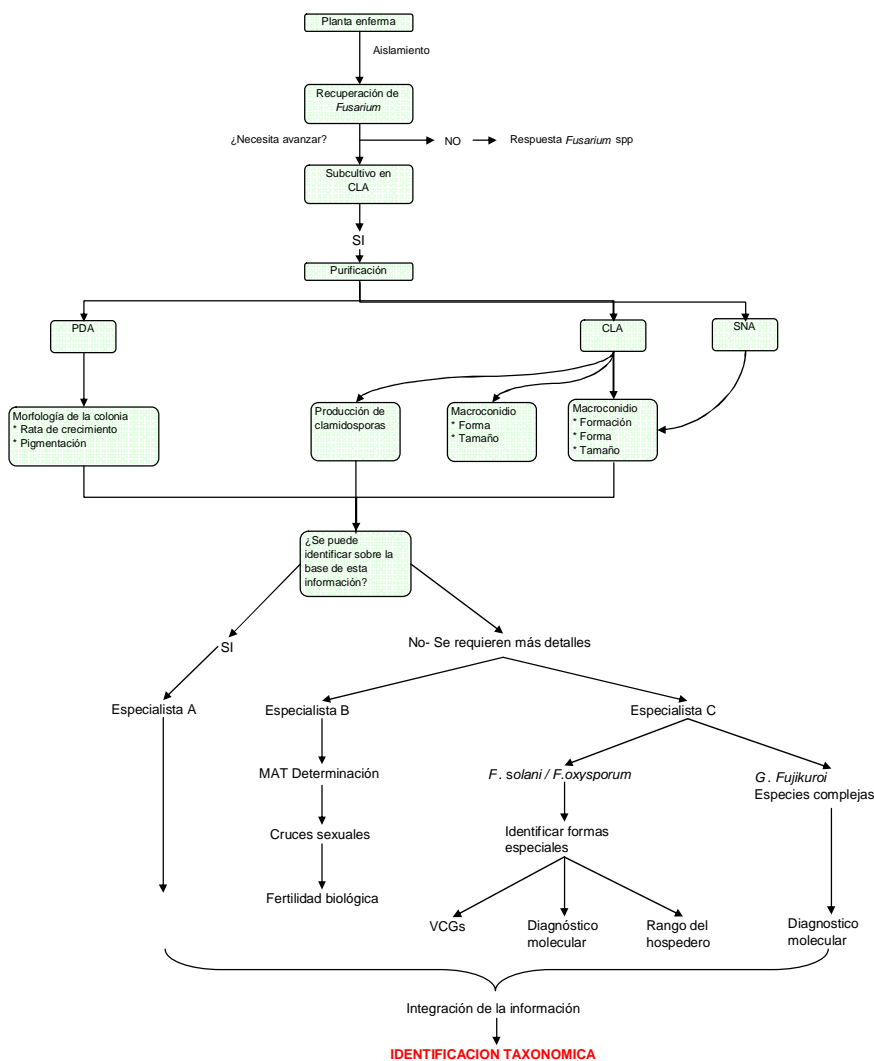


Figura 1. Protocolo para la identificación de especies de *Fusarium* según Summerell *et al.* (2003).

Por otra parte Geiser *et al.* (2008) indican que las especies de hongos filamentosos como el *Fusarium* colectivamente representan el más importante grupo toxigénico de patógenos de las plantas. Este investigador coincide con Summerell *et al.* (2003) en que los esfuerzos para comunicar con precisión qué especies de *Fusarium* son responsables de las enfermedades de las plantas, y la contaminación

por toxinas de los alimentos y piensos, se han visto obstaculizados debido a que la mayoría de las especies son bien difíciles o imposibles de diferenciar mediante la morfología por sí misma. No obstante Geiser *et al.* (2008) exponen que para hacer frente a este problema, se ha construido una web accesible de bases de datos llamada FUSARIUM-ID que permite identificar a los individuos de interés aislados, con un parcial de la secuencia del ADN de un gen llamado *factor de elongación de traducción*. Una vez que esta secuencia se genera a partir del aislado de interés, que se compara con los de la base de datos de FUSARIUM-ID se obtiene una rápida y precisa identificación. Indican que las futuras versiones de esta base de datos se ampliarán para incluir a todos los tóxicos y especies patógenas. Afirman que este software será de gran beneficio para micotoxicólogos, fitopatólogos y médicos micólogos en la precisión de la comunicación de sus resultados a la comunidad científica.

#### **2.4.1 Sintomatología de la fusariosis de la piña**

De acuerdo con Py (1987) esta enfermedad es causada por especies del género *Fusarium*, básicamente solo encontrada en Brasil, sin embargo indica que es originaria de Uruguay o Argentina, donde el patógeno *F. subglutinans* fue aislado por primera vez por Carrera en 1954. Este autor, comenta que el patógeno ha sido encontrado en otras partes del mundo, por ejemplo en Sur África y Australia. Sin embargo en Brasil es el principal factor limitante del cultivo.

Por otra parte, *F. subglutinans* también se cita a nivel de fruta como uno de los agentes causales de la pudrición del corazón del frutículo "FCR" por sus siglas en ingles, y Bartholomew *et al.* (2003), menciona que la literatura no certifica si el *F. subglutinans* de Brasil corresponde a la misma especie de *Fusarium* que causa el FCR, este mismo autor indica que Lavilla (1980) considera a *F. subglutinans* como una especie claramente diferente a la especie de *Fusarium* causante del FCR y que otros autores como Rohrbach (1983) atribuyen el FCR a *F. moliniforme*.

Bartholomew *et al.* (2003), indica que el FCR de *Fusarium* sp, es usualmente un tipo de podredumbre seca mientras que en la fusariosis de Brasil el síntoma no se limita a un único frutículo infectado como se define el FCR en otros lugares

productores de piña. Comenta que los síntomas de la fruta involucran múltiples frutículos, apareciendo primeramente en la parte afectada de la fruta un área incolora que luego se hunde y adquiere un profuso color rosado con supuración y exudación de goma que puede confundirse con la exudación de goma de los daños de *Strymon*.

Con apoyo en la afirmación de Ploetz (1998), “*la fusariosis es principalmente una enfermedad de la fruta, pero también puede afectar las plantas de piña*”, tal como lo indica Valerín (1994) donde hace una separación entre el *Fusarium* que afecta la fruta y el *Fusarium* que afecta la raíz y el tallo.

#### **2.4.2 Sintomatología de la pudrición del tallo por *Fusarium***

Bartholomew *et al.* (2003) y Ventura *et al.* (2008) mencionan que la enfermedad está asociada con la fase de pudrición de la fruta “fusariosis”, donde se dan infecciones del tallo en la base de las hojas desde el material de siembra, el cual resulta en curvaturas de las plantas afectadas debido a que porciones del tallo se encuentran muertas. Comentan también que una vez que la fruta es infectada, simultáneamente pueden originarse infecciones secundarias en hijos guías y basales y este material luego es distribuido a nuevas áreas de siembra y de esta manera se infectan nuevos sitios.

Ventura *et al.* (2008) exponen en la Figura 2, el ciclo biológico del agente causal de la fusariosis en Brasil.

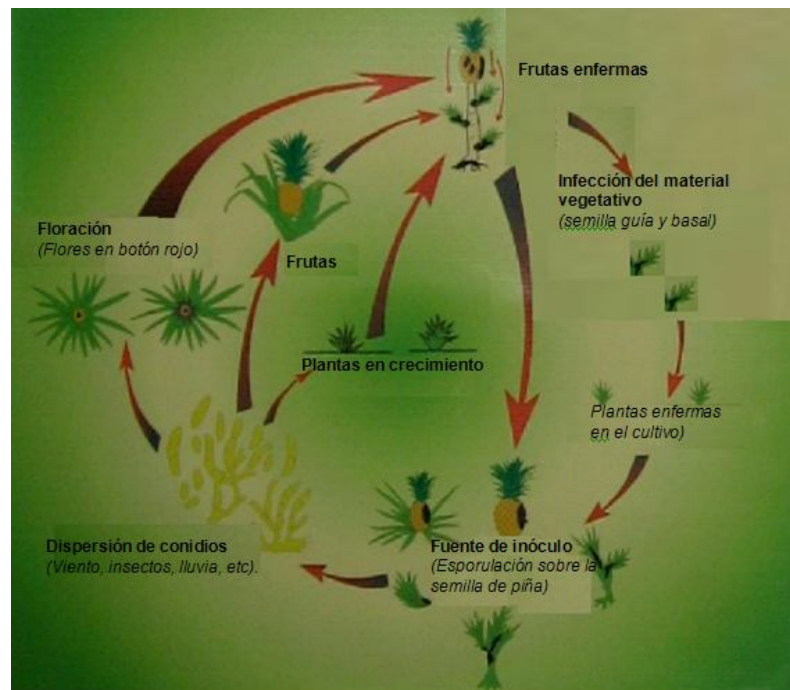


Figura 2. Ciclo de la fusariosis de la piña causada por *Fusarium guttiforme* (Syn: *Fusarium subglutinans* f. sp. *ananas*). (Traducido de Ventura (2008)).

Pires *et al.* (2007) describen el síntoma en plantación como una lesión en el tallo y en la región aclorofilada de la base de las hojas, con exudación de una sustancia gomosa en los tejidos infectados, describen una "apertura" de la roseta central que deja expuestas las hojas más nuevas; mencionan una curvatura del tallo hacia la parte donde se encuentra la lesión y cambios en la filotaxia de la planta, aumento del número de hojas por espiral, amarillamiento, parálisis del crecimiento y la muerte de las hojas de la planta.

## 2.5 Alternativas para el combate de la enfermedad causada por *Fusarium*

Ventura *et al.* (2008) informan que el control de la enfermedad está basada en la integración de prácticas culturales y el uso de fungicidas desde estados tempranos del desarrollo de la inflorescencia hasta que cierran las flores, no obstante menciona que a largo plazo pueden surgir poblaciones resistentes del patógeno a los fungicidas convencionales.

Como estrategias para el control Ventura *et al.* (2008), citan el uso de variedades resistentes como una alternativa económica de eficiente control y

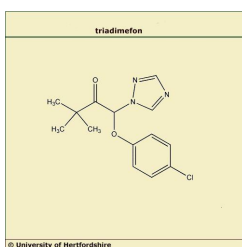
protección al ambiente. Menciona que prometedores genotipos (híbridos) de piña de buenas características hortícolas y calidad de fruta fueron identificadas y evaluadas bajo condiciones de campo en Brasil. Informa que en este trabajo se encontró que el cultivar Vitória presentó resistencia a la fusariosis con buena calidad de la fruta y características agronómicas similares o superiores al cultivar comercial común

### 2.5.1 Alternativas químicas “Fungicidas”

El combate de las enfermedades causadas por los hongos del género *Fusarium* en piña, está basado en tratamientos preventivos de fungicidas y en materia de ingredientes activos en Costa Rica solo el carbendazim y el triadimefon en dosis de 200 a 800 ml de ingrediente activo (i.a) / 200 l de agua están autorizados para tratar las plantaciones. Sin embargo dentro de las alternativas químicas para el control de *Fusarium*, se tienen varios grupos químicos de fungicidas, entre las que sobresalen actualmente también spiroquetalaminas, y las estrobirulinas, estos tienen efectos biocidas sobre deuteromicetes. En ensayos realizados en Venezuela para evaluar la eficacia biológica de diferentes químicos, encontraron inhibición del crecimiento del patógeno con los fungicidas Benomil y Procloraz (Páez *et al* 2001).

Por su parte Muiño *et al.* (2000), realizó ensayos de sensibilidad sobre *Fusarium subglutinans* a los inhibidores de la biosíntesis del ergosterol (IBE), en este trabajo evaluó triadimenol, propiconazol, difeconazol, hepoxiconazol, tebuconazol y bitertanol, encontrando que el difeconazol es el más activo.

#### 2.5.1.1 Triadimefon



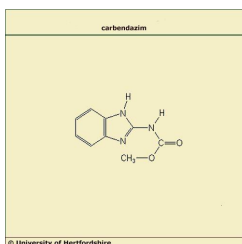
El triadimefon pertenece al grupo de los triazoles, Los fungicidas DMI son esteroides inhibidores de la biosíntesis (SBIs). El triadimefon ubicado por FRAC en el grupo de los DMI (DeMethylation Inhibitors) (SBI: Class I).

De acuerdo con FRAC (2007), el triadimefon es un fungicida con modo de acción sistémico con actividad curativa y protectante que interrumpe la función de la membrana del hongo. En la lista de códigos FRAC (2007) el triadimefon se encuentra en el grupo tres y está clasificado como de mediano riesgo de

resistencia. FRAC comenta que existen grandes diferencias en la actividad de los espectros de los fungicidas DMI, se conoce resistencia en diversas especies fúngicas. Varios mecanismos de resistencia son conocidos; por ejemplo mutaciones con sitio destino en gen *cyp51* (*erg 11*), V136A, Y137F, A379G, I381V; promotor *cyp51*; ABC transportistas y otros. De acuerdo a FRAC (2007) se acepta en general que la resistencia cruzada está presente entre fungicidas DMI contra el mismo hongo, pero no muestran resistencia cruzada entre otras clases de SBI.

En Costa Rica la molécula triadimefon tiene registro para uso en *Coffea arabica*, *Cucumis melo*, Ornamentales y *Ananas comosus*. En el cultivo de piña es muy utilizado en el control de enfermedades de la fruta y en poscosecha, siendo su uso bastante generalizado y frecuente en los paquetes tecnológicos de protección de enfermedades de la fruta tanto en campo como en poscosecha.

### 2.5.1.2 Carbendazim



El carbendazim pertenece al grupo de los benzimidazoles, es un fungicida polivalente y sistémico, de amplio espectro, de uso curativo y preventivo, que se absorbe por los órganos verdes y las raíces de los vegetales siendo su permanencia de acción de dos a tres semanas. El carbendazim ubicado por FRAC en el grupo de los MBC (Fungicide Methyl Benzimidazole Carbamate) agente fungitoxico que bloquea de forma específica la formación de microtúbulos (un sitio) mediante una proteína que se une al carbendazim con propiedades características de las tubulinas las cuales determinan el bloqueo constructivo de microtúbulos. Esta proteína tiene una alta afinidad con el carbendazim, nocodazol, thiabendazol y otros miembros del grupo.

De acuerdo con FRAC (2007), el carbendazim es un fungicida con modo de acción sistémico con actividad curativa y protectante e inhibidor de la mitosis y división celular. En la lista de códigos FRAC (2007) el carbendazim se encuentra en el grupo uno y está clasificado como de alto riesgo de resistencia. Posee resistencia común in muchas especies de hongos, muchas mutaciones de los sitios de acción, estando la mayor parte en los genes E198A/GK, F200Y de la  $\beta$ -tubulin.



En Costa Rica la molécula carbendazim tiene registro para uso en *Persea americana*, *Oryza sativa*, *Musa spp*, *Allium cepa*, *Allim sativum*, *Cucumis melo*, *Cucumis sativus*, *Lycopersicum sculentum*, *Citrus spp*, *Ananas comosus*, *Maguifera indica*, *Lactuca sativa* y ornamentales. En el cultivo de la piña no es un fungicida frecuente en los paquetes tecnológicos de producción.

### **2.5.2 Alternativas biológicas**

Carballo y Guharay (2004), consideran que la versatilidad, adaptabilidad y la fácil manipulación de las especies del género *Trichoderma* han permitido su uso efectivo en el control biológico. Informan que generalmente este hongo es saprófito y es encontrado comúnmente en el suelo. Estos investigadores comentan que *Trichoderma* produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios, las cuales son activas contra fitopatógenos en diferentes fases del ciclo de vida, desde la germinación de las esporas hasta la esporulación. Estos autores indican que los productos de *Trichoderma* son producidos por fermentación; y que para uso comercial es preferido el material seco, explican que las hifas son poco resistentes al secado por lo que se trabaja en formulaciones de las formas reproductoras (conidios y clamidosporas), por otra parte afirman que los conidios son más resistentes que las clamidosporas y se producen en mayor cantidad por diferentes vías: sobre soporte sólido y en cultivos líquidos estáticos y agitados.

Stefanova (1999), Carballo y Guharay (2004), comunican que varias especies parasitan hongos patogénicos, comentan que son hongos competitivos de rápido crecimiento y alta esporulación lo cual les permite competir muy bien con otros microorganismos del suelo; los catalogan como hongos antagónicos, esto es, que producen antibióticos como gliotoxinas, viridinas y enzimas líticas, estas últimas producidas en gran cantidad, lo cual les permite degradar la pared celular del hospedero como gluconasas, quitinasas, xylanasas y proteasas.

Por su parte Stefanova *et al.* (1999) indica que especies de *Trichoderma*, ocupan, actualmente, un lugar importante dentro de las prácticas de manejo de enfermedades, principalmente para combatir los géneros *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pytium*, *Phytophthora* y *Fusarium*.

Páez *et al.* (2001), reportan que en enfrentamientos de *Fusarium subglutinans* con *Trichoderma harzianum* se obtuvo una leve disminución del crecimiento y un porcentaje de inhibición de la esporulación del 44,6%, por su parte Hernández *et al.* (2006), encontró un 48% de inhibición de *Trichoderma atroviride* y *Trichoderma harzianum* sobre *Fusarium subglutinans*. Este autor considera que estos microorganismos son capaces de generar un elevado nivel de competitividad por el sustrato, pues ejercen un micoparasitismo parcial y total sobre las colonias de los fitopatógenos.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Ubicación**

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biocontroladores del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede Regional San Carlos, bajo condiciones totalmente controladas.

#### **3.2 Metodología**

##### **3.2.1 Obtención de la muestra**

Se colectaron plantas de diferentes puntos de la plantación que mostraban síntomas característicos de la enfermedad “muerte descendente del cultivo de piña” en estado inicial o intermedio, en fincas ubicadas en Venecia de San Carlos. Las muestras colectadas se acondicionaron mediante separación del follaje de las mismas, se colocaron los tallos afectados en papel servilleta húmedo, posteriormente se trasladaron al Laboratorio de Biocontroladores del Instituto Tecnológico de Costa Rica donde se realizaron los análisis correspondientes.

##### **3.2.2 Aislamiento del agente causal de la muerte descendente del cultivo de piña**

###### **3.2.2.1 Preparación de las muestras a analizar**

Se cortaron las hojas de la planta a nivel del meristemo foliar, para facilitar la manipulación del tallo. Luego se cortaron las raíces de tal forma que quedó un trozo de aproximadamente 15 cm de longitud; con el objetivo de eliminar partículas gruesas, el tejido se lavó con abundante agua.

Posteriormente se hizo un corte longitudinal de tal forma que dejó visible el área afectada con el síntoma, luego se lavó de nuevo las muestras a analizar con agua corriente y posteriormente con agua destilada y esterilizada.

###### **3.2.2.2 Siembra e incubación de los aislados**

Se obtuvieron trozos de tejido haciendo una disección del tallo en el perímetro del área afectada, de tal forma que cada trozo tuviera una porción de tejido sano y otra de tejido dañado.

En la cámara de flujo laminar bajo condiciones de asepsia, se procedió a realizar la desinfección del tejido, para esto y con la ayuda de una pinza estéril, se colocó el tejido sobre un colador estéril, sumergiéndolo posteriormente en una solución de NaOCL a 1% durante un minuto, posteriormente se pasó a alcohol de 98% por treinta segundos, finalmente se colocó en agua destilada y esterilizada durante tres minutos. Con el objetivo de eliminar el exceso de humedad, se colocó el tejido desinfectado sobre papel toalla estéril, luego con la ayuda de una pinza estéril, se colocaron cinco trozos de manera equidistante en cajas petri que contenían P.D.A (papa, agar, dextrosa) previamente acidificado con ácido tartárico (Obregón 2000).

Se establecieron diez repeticiones, las cuales se colocaron en incubación a  $27\pm 2^{\circ}$  C, humedad relativa de 80% durante ocho días, tiempo donde se evaluó crecimiento, colonización y pureza.

### **3.2.2.3 Obtención de cultivos axénicos**

De los diferentes aislados obtenidos, se seleccionaron colonias del agente desarrollado, posteriormente en la cámara de flujo laminar y con una aguja micológica estéril, se obtuvieron trozos del medio con micelio del agente en activo crecimiento y se transfirieron a caja de petri con P.D.A acidificado. Incubando las mismas por un período de ocho días, a  $27\pm 2^{\circ}$  C, humedad relativa de 80%, para este proceso se establecieron diez repeticiones.

### **3.2.2.4 Caracterización morfológica del agente causal**

La caracterización morfológica del agente causal se realizó, preparando muestras en portaobjetos estériles, tomando fragmentos del micelio desarrollado en los cultivos axénicos multiesporicos, posteriormente se observaron al microscopio tomando como referencia las características morfológicas.

Esta caracterización se realizó también molecularmente utilizando cultivos axénicos monospóricos; los cuales se obtuvieron a partir del cultivo multiespórico, del cual se tomaron discos de micelio en activo crecimiento, se extrajeron con una aguja micológica esterilizada y se colocaron en tubos de ensayo que contenían 10 ml de agua destilada y estéril, posteriormente se realizaron diluciones y se colocaron

alícuotas de 0,1 ml en platos petri que contenían P.D.A, realizando posteriormente una siembra por extensión, los cultivos se incubaron por un período de 24 horas, a  $26\pm 2^{\circ}$  C de temperatura y 80% de humedad relativa.

Transcurrido este período se seleccionaron macroconidios y se transfirieron a cajas petri que contenían P.D.A, se incubaron por un período de ocho días a  $26\pm 2^{\circ}$  C de temperatura y 80% de humedad relativa.

Obtenido el crecimiento de los cultivos monospóricos, se preparó un medio líquido a base de papa y dextrosa, se fraccionaron los cultivos monospóricos y se colocaron en este medio, los mismos se enviaron al Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica, donde se realizó la caracterización molecular.

### 3.2.3 Bioensayos *In vitro* con sustancias químicas vrs el agente causal

#### 3.2.3.1 Selección de los fungicidas

Aislado y caracterizado el agente causal de la muerte descendente del cultivo de piña, se revisó y seleccionaron siete fungicidas específicos de uso común para el combate de hongos en estado anamorfo ( Cuadro 1).

Cuadro 1. Fungicidas y concentraciones de i.a evaluados sobre el agente causal de la muerte descendente del cultivo de piña.

| Características Técnicas |                    | Concentraciones evaluadas mg i.a/L |       |      |
|--------------------------|--------------------|------------------------------------|-------|------|
| Grupo Químico            | Ingrediente Activo | Máxima                             | Media | Baja |
| Benzimidazol             | Carbendazim        | 2,00                               | 1,00  | 0,50 |
| Triazol                  | Bitertanol         | 0,75                               | 0,38  | 0,19 |
| Spiroketalamina          | Spiroxamine        | 1,60                               | 0,80  | 0,40 |
| Estrobirulina            | Pyraclostrobin     | 0,50                               | 0,25  | 0,13 |
| Triazol                  | Difenoconazol      | 0,50                               | 0,25  | 0,13 |
| Triazol                  | Triadimefon        | 0,50                               | 0,25  | 0,13 |
| Carbamato                | Metil-Thiophanato  | 1,88                               | 0,94  | 0,47 |

Se evaluaron tres dosis por cada fungicida seleccionado, como dosis máxima se evaluó la indicada en la etiqueta, la misma se fraccionó a la mitad y tercera parte para obtener las dosis restantes, tal como se muestra en el Cuadro 1. Cada tratamiento estuvo conformado por seis repeticiones y sus respectivos testigos.

### **3.2.3.2 Establecimiento bioensayos mediante técnica de medios enmendados y discos impregnados**

Para evaluar los tratamientos se aplicaron dos metodologías; medios enmendados o crecimiento radial de la colonia de agente caracterizado y discos impregnados con el fungicida.

#### *a. Medios enmendados o inhibición del crecimiento radial de la colonia del agente caracterizado:*

Por cada tratamiento evaluado se prepararon 250 ml de P.D.A, esterilizando el mismo y cuando éste alcanzó una temperatura aproximada a los 40 – 35 °C, en la cámara de flujo laminar, se procedió a agregar la dosis de i.a/lit calculado para cada tratamiento, posteriormente se dispuso en cajas de petri estériles y una vez solidificado, se procedió a extraer discos con ayuda de un sacabocados y aguja micológica estéril.

Para realizar la siembra de agente causal caracterizado, se obtuvieron discos de cultivos axénicos. Los cuales se extrajeron con la ayuda de una aguja micológica y se colocaron en los medios enmendados. Los testigos se establecieron de la misma manera en P.D.A sin enmendar, cada tratamiento constó de seis repeticiones y sus respectivos testigos.

Las placas se incubaron por un período de ocho días, a 27±2° C, humedad relativa de 80%.

#### *i. Evaluaciones para medios enmendados:*

Para las evaluaciones de los medios enmendados se evaluó el porcentaje de inhibición del crecimiento (% IC), mediante las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ IC: } \frac{DT - DC}{DT} \times 100$$

Donde:

DT= Diámetro de la colonia en el Testigo.

DC= Diámetro de la colonia en el tratamiento.

*b. Discos impregnados:*

En frasco de dilución de leche con 100 ml de agua destilada y esterilizada, se procedió a agregar la dosis de i.a/lt calculado para cada tratamiento, en cada uno se agregaron discos de papel absorbente estériles, los testigos se establecieron agregando los discos en agua destilada estéril.

La siembra del agente causal se realizó por extensión en cajas de petri con P.D.A estéril, para esto se obtuvo a partir de cultivos axénicos un disco de 1 cm de diámetro el cual se suspendió en 10 ml de agua destilada y estéril más 0,1 ml de tween 80, se colocó en un vortex para obtener el desprendimiento de las estructuras del medio, de esta suspensión madre se tomó con una pipeta estéril de 1 ml y se dispensó en 10 ml de agua destilada y estéril, se agitó por un minuto en vortex y se repitió el mismo procedimiento hasta obtener una dilución de  $10^{-3}$ , de esta dilución se hicieron conteos de conidios y se procedió a tomar con una pipeta estéril alícuotas de 0,5 ml, las cuales se colocaron en las cajas que contienen el medio y posteriormente con una espátula de drigalsky estéril se realizó la siembra.

Establecido el agente causal de la enfermedad caracterizada y con la ayuda de una pinza estéril, se procedió a tomar cinco discos de papel impregnados para cada dosis de los fungicidas a evaluar y ha colocarlos en las cajas donde se sembró el agente, este procedimiento se hizo inmediato a la siembra.

Las placas se incubaron por un período de ocho días, a  $27 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , humedad relativa de 80%, cada tratamiento constó de seis repeticiones más los respectivos testigos.

*i. Evaluaciones para discos impregnados*

Para las evaluaciones de los discos impregnados se evaluó el porcentaje de colonización (% Col), mediante las siguientes fórmulas:

$$\% \text{ Col: } \frac{AP_T - AH_T}{AP_T} \times 100$$

Donde:

AH<sub>T</sub>= Area del halo de inhibición.

AP<sub>T</sub> = Area del plato petri.

### 3.2.4 Evaluación de la efectividad *In vitro* de aislados de hongos del género *Trichoderma* vs el agente causal caracterizado.

El efecto supresor de las cepas de los microorganismos antagonistas, se evaluaron mediante bioensayos *In vitro* de cultivos duales y potencial fungistático del antagonista sobre el agente causal aislado.

#### 3.2.4.1 Establecimiento de bioensayos de cultivos duales

Se seleccionaron diez cepas de microorganismos antagonistas del género *Trichoderma* de la micoteca del Laboratorio Dr. Obregón, considerando características como tasa de crecimiento acelerada, tolerancia a temperaturas superiores a los 25 °C, entre otros aspectos.

Seleccionadas las cepas y obtenidos los cultivos axénicos tanto del antagonista como del agente causal identificado, se procedió a obtener discos de micelio en activo crecimiento de 1 cm de diámetro aproximadamente. Esto se realizó con la ayuda de un sacabocados estéril; posteriormente con una aguja estéril, se extrajeron discos del agente causal identificado y se colocaron en cajas de petri con P.D.A, se procedió de la misma manera con el antagonista. Los testigos de ambos se establecieron por separado.

Se establecieron ocho repeticiones más los respectivos testigos, los mismos se incubaron por un período de ocho días, a  $27 \pm 2$  °C, humedad relativa de 80%.

##### a. Evaluaciones para cultivos duales:

Las evaluaciones se realizaron cada dos días y se calculó el porcentaje de colonización (% Col) mediante la fórmula de Camporota (1985).

$$\% \text{ Col} = \frac{DT}{DE} \times 100$$

Donde:

% Col= Porcentaje de colonización.

DT= distancia recorrida por el antagonista sobre el eje que los separa.

DE= distancia entre ambos puntos de siembra.

Para los cultivos testigo se determinó crecimiento radial.



### **3.2.4.2 Bioensayos de potencial fungistático del microorganismo antagonista sobre el agente causal caracterizado**

En cajas de petri con P.D.A solidificado se obtuvo del punto medio con la ayuda de un sacabocados estéril, discos del medio, los cuales se extrajeron con una aguja estéril, posteriormente de los cultivos axénicos tanto del agente causal caracterizado como de las cepas de los microorganismos seleccionados, se procedió a obtener de igual forma con un sacabocados estéril discos de micelio en activo crecimiento de 1 cm de diámetro aproximadamente, luego con una aguja estéril, se extrajeron los mismos y se colocaron en las cajas de petri. Realizadas las siembras de ambos, se procedió a quitar las tapas de las cajas y colocar la base de la caja donde se sembró el agente causal sobre la base donde se sembró el microorganismo benéfico.

Se establecieron ocho repeticiones más los respectivos testigos, los mismos se incubaron por un período de ocho días, a  $27 \pm 2$  C, humedad relativa de 80%.

#### *a. Evaluaciones para potencial fungistático:*

Para evaluar el potencial fungistático se evaluó el porcentaje de colonización mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Col: } \frac{DT - DC}{DT} \times 100$$

Donde:

DT= Diámetro de la colonia en el Testigo.

DC= Diámetro de la colonia en el tratamiento.

### **3.3 Diseño experimental**

Se estableció un diseño Irrestricto al Azar; se realizó análisis de varianza para cada evento de evaluación y para cada técnica de evaluación utilizada.

### **3.4 Modelos matemáticos empleados en el análisis estadístico:**

#### **3.4.1 Para la evaluación de las alternativas químicas**

Tanto para medios enmendados como para discos impregnados se utilizó un diseño de trifactorial de subparcelas divididas, para evaluar la variable de respuesta

de porcentaje de inhibición del crecimiento en el caso de medios enmendados y porcentaje de colonización en el caso de discos impregnados.

$$\gamma_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k + (\alpha\beta)_{ij} + (\alpha\gamma)_{ij} + (\beta\gamma)_{ij} + (\alpha\beta\gamma)_{ijk} + \xi_{ijkl}$$

Donde:

Variable dependiente ( $\gamma_{ijk}$ ): variable de respuesta % inhibición del crecimiento (% IC).

$\mu$ : Media general.

$\alpha_i$ : variación causada por el primer factor principal que se investiga (A= fungicida).

$\beta_j$ : variación causada por el segundo factor (B: tiempo).

$\gamma_k$ : variación causada por el tercer factor (C: dosis).

$(\alpha\beta)_{ij}$ : variación causada por la interacción A (fungicida) x B (tiempo)

$(\alpha\gamma)_{ij}$ : variación causada por la interacción A (fungicida) x C (dosis)

$(\beta\gamma)_{jk}$ : variación causada por la interacción B (tiempo) x C (dosis)

$(\alpha\beta\gamma)_{ijk}$ : variación causada por la interacción A (fungicida) x B (tiempo) x C (dosis)

$\xi_{ijkl}$ : Error general aleatorio.

### 3.4.2 Para la evaluación de las alternativas biológicas

Tanto para la técnica de cultivos duales como para la técnica de potencial fungistático se estableció un diseño estadístico bifactorial en bloques. Para la técnicas de cultivos duales los resultados se expresan mediante el porcentaje de colonización (%Col), mientras que para la técnica de potencial fungistático los resultados se expresan como porcentaje de inhibición del crecimiento (% IC).

$$\gamma_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \delta_k + \xi_{ijk}$$

Donde:

Variable dependiente ( $\gamma_{ijk}$ ): variable de respuesta % de colonización (% Col).

$\mu$ : Media general.

$\alpha_i$ : variación causada por el primer factor principal que se investiga (A= cepa).

$\beta_j$ : variación causada por el segundo factor (B: tiempo).

$(\alpha\beta)_{ij}$ : variación causada por la interacción A (cepa) x B (tiempo)

$\delta_k$ : variación causada por el efecto de bloque.

$\xi_{ijk}$ : Error general aleatorio.

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Caracterización morfológica del agente causal de la muerte descendente en el cultivo de la piña

En los aislados obtenidos de las plantas enfermas se observó el crecimiento micelial inicialmente de color blanco y que conforme avanzó se tornó de color rosa pálido, el medio tendió a pigmentarse de color morado o lila. (Figura 3), muy similares a las caracterizaciones realizadas por Summerell *et al.* (2003). Además, en las muestras observadas al microscopio, se determinó la presencia de hifas hialinas septadas, así como la presencia de hifas especializadas (Figura 4), sobre las cuales según Agrios (2005) se forman las estructuras de reproducción asexual, observadas también en los aislados obtenidos.

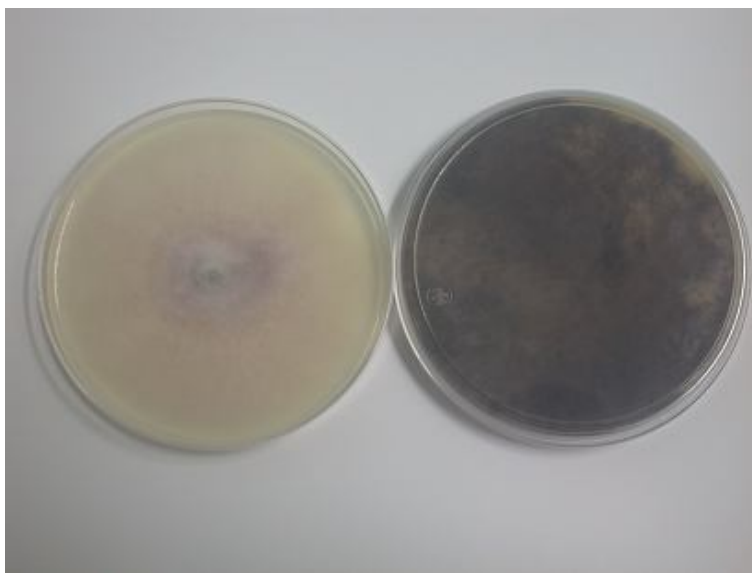


Figura 3. Morfología de la colonia aislada en medio de cultivo PDA. Aislamiento proveniente de tallo de planta de piña con sintomatología de muerte descendente del cultivo de la piña.

Estas estructuras reciben el nombre de macroconidios y microconidios (Figura 5), en microfotografías realizadas a estos aislados mediante microscopio electrónico de barrido (MEB) modelo S570 de la Universidad de Costa Rica, se observó la presencia de éstas. Los macroconidios de acuerdo a la especie pueden estar constituidas de tres a cinco células, se adelgazan gradualmente y se encorvan hacia los extremos, mientras que los microconidios pueden tener únicamente una o dos células y son las estructuras que el hongo produce en mayor abundancia; Agrios

(2005), indica que las macroconidas son estructuras típicas de hongos del género ***Fusarium***.

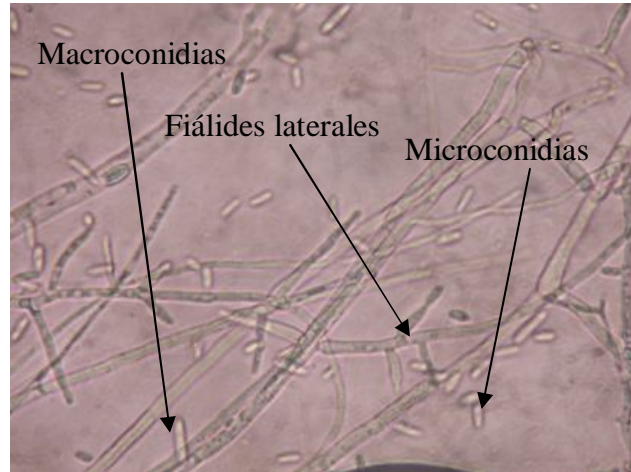


Figura 4. Estructuras características del género *Fusarium* sp, obtenida de aislamientos de tallo de plantas de piña con sintomatología de la muerte descendente del cultivo de la piña.

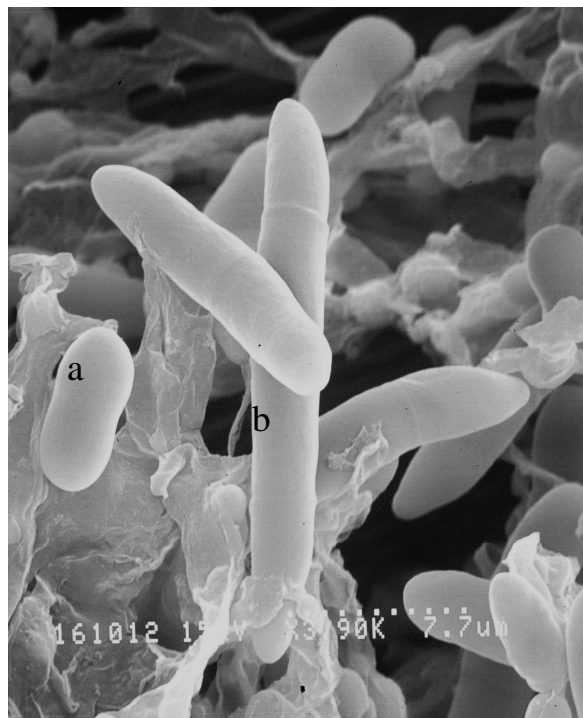


Figura 5. Muestra conidios aislados de tallo de planta de piña con síntoma de la muerte descendente del cultivo de piña, microconidios (a), macroconidios (b).

Se observó la presencia de otro tipo de estructuras llamadas clamidosporas, estas están constituidas por una o dos células, son de pared gruesa y son esporas redondas que se forman terminal o intercaladamente en el micelio (Figura 6), son

estructuras de sobrevivencia y pueden permanecer en el sustrato o suelo por largos períodos (Agrios 2005).

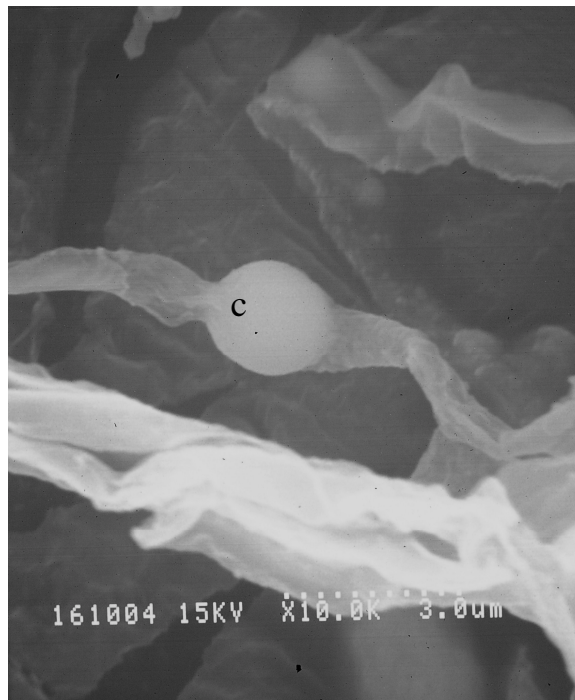


Figura 6. Muestra una clamidospora aislada de tallo de planta de tallo de planta de piña con síntoma de la muerte descendente del cultivo de la piña, clamidospora (c).

De acuerdo a las estructuras obtenidas en los aislados y la descripción de las mismas, los resultados revelan que el agente que causa la enfermedad denominada como muerte descendente en el cultivo de la piña es debida a hongos del género *Fusarium*, lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Obregón y Mata (2008) quienes con el fin de esclarecer la etiología de estas manifestaciones recolectaron plantas con síntomas de distintas zonas productoras del país y encontraron que el sistema radicular es atacado severamente por hongos como *Pythium* y *Rhizoctonia*, la base del tallo es atacada por *Thielaviopsis*, *Rhizoctonia* y *Fusarium*. Estos autores mencionan que en los aislamientos y pruebas de patogenicidad realizadas, la piña es afectada severamente por *Fusarium* y además único agente causal que invade el sistema vascular de esta planta.

En países como Venezuela y Brasil, este agente es reportado causando enfermedad principalmente a nivel de fruta (gomosis), se indica que las especies

identificadas son *F. subglutinans* (Haroldo *et al.* 2000; Bartholomew *et al.* 2003), mientras que Ventura *et al.* (2008); menciona que esta enfermedad es importante también a nivel de planta, como consecuencia se obtiene una importante reducción en el rendimiento de los hijos.

De acuerdo a los comentarios de Obregón y Mata (2008), quienes catalogan este agente como causante de enfermedades emergentes en las áreas productoras de piña, este organismo hasta la fecha no se había considerado oficialmente como importante en el cultivo de piña en Costa Rica, por lo que al no tener también una descripción de síntomas el diagnóstico en cuanto este tipo de problema se ha tendido a confundir con otros problemas fitosanitarios muy comunes y de igual importancia económica como *Phytophthora*, además al no ser hasta la fecha una enfermedad de importancia en los programas fitosanitarios o paquetes tecnológicos no se han contemplado opciones para contrarrestar su efecto.

#### **4.2 Caracterización molecular del agente causal de la muerte descendente en el cultivo de la piña**

En el laboratorio de biotecnología de plantas del CIA se extrajo el ADN del hongo y se determinó que las muestras correspondían a *Fusarium* spp según la metodología descrita por Geiser *et al.* (2004). Mediante la aplicación de la técnica de PCR-RFLP se identificó la especie *F. oxysporum*. Finalmente en el Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular (CIBCM, UCR) se confirmó la identidad de la especie mediante la secuenciación de un segmento del gen de elongación (EF-1).

La clasificación anterior concuerda con hallazgos en Venezuela de Páez *et al* (2001) el cual ha reportado la especie de *F. oxysporum* caracterizándola como una enfermedad necrótica a nivel de los haces vasculares y una coloración rojiza en las hojas, pero en las variedades Cayena lisa y Española.

Booth (1977), describe que *F.oxisporum* puede tener micelios de color blanco, melocotón, salmón, color vinaceo de gris a púrpura o bien color violeta, lo cual coincide con lo encontrado en la caracterización morfológica indicada para el

organismo aislado. Este autor indica que las microconidias de *F. oxysporum* son ovaladas o elipsoidales, cilíndricas, rectas o curvadas producidas de fiálides laterales cortas y simples, indica que la macroconidia generalmente presenta de tres a cinco septos, condición que se refleja en la Figura 5. Por otra parte las clamidosporas son globosas de formación singular o en pares, intercaladamente o en las branquias laterales cortas.

#### **4.3 Caracterización de los síntomas de la enfermedad llamada muerte descendente del cultivo de piña causada por hongos del género *Fusarium*.**

Las plantas que presentan esta enfermedad pueden encontrarse desde parches sintomáticos hasta bloques completos de siembra; se caracteriza por una muerte descendente de las plantas infectadas; las cuales presentan un amarillamiento observándose un desecamiento de las hojas de la parte superior (ápice) hacia la base.

Cuando la enfermedad está avanzada se presenta un desecamiento total en los primeros 10 – 15 centímetros de la hoja, luego el resto de las hojas toman un color amarillento similar a una planta con el virus del wilt, estos síntomas pueden ser evidentes desde los dos meses después de la siembra en lotes muy infestados, presentando un crecimiento retardado que deja la plantación rezagada (Figura 7), mostrando un porte no superior a una plantación de cuatro a cinco meses aún cuando tiene inclusive más de ocho meses, de acuerdo con Obregón y Mata (2008), esto se debe a que el patógeno se encuentra en el sistema vascular de las plantas; por su parte Rivera (1999), Agrios (2005), indica que las estructuras de este patógeno pueden permanecer en el suelo principalmente en forma de clamidosporas, y cuando las plantas comienzan a desarrollarse estas estructuras germinan por los estímulos de los exudados de las raíces penetrando directamente en las puntas de las raíces, por medio de la zona donde se forma la raíz lateral o en última instancia por heridas.

Además condiciones donde se desarrollan microorganismos anaeróbicos que obtienen su energía de la reducción del nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ) a nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) o óxido nitroso ( $\text{N}_2\text{O}$ ) y nitrógeno molecular ( $\text{N}_2$ ). Y a medida que las condiciones se hacen cada vez más reductoras los microorganismos anaeróbicos reducen  $\text{Fe}^{+3}$  a  $\text{Fe}^{+2}$  debido a su mayor solubilidad, el hierro  $\text{Fe}^{+2}$  puede alcanzar concentraciones tóxicas cuando los suelos están en condiciones anaeróbicas durante muchas semanas (apéndice 10). Otros microorganismos anaeróbicos pueden reducir ( $\text{SO}_4^{-2}$ ) a sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ), un veneno que afecta la respiración (Taiz y Zeiger 2006).

Según Taiz y Zeiger (2006), cuando los microorganismos anaeróbicos tienen aporte abundante de sustrato orgánico, los metabolitos bacterianos como el ácido acético y el ácido butírico pueden ser liberados del agua del suelo y estos ácidos, junto a compuestos de azufre reducidos, son los que dan ese olor desagradable al agua encharcada. Todas estas sustancias producidas por los microorganismos en condiciones anaeróbicas son tóxicas para las plantas a altas concentraciones. Estos autores comentan que la tasa respiratoria y el metabolismo de las raíces se ven afectados incluso antes de que el  $\text{O}_2$  disuelto sea totalmente eliminado del entorno de la raíz.

Lo anterior puede explicar que las malas condiciones de aireación del suelo (compactación "apéndice 9") y problemas de drenaje (nivel freático alto "apéndice 11), camas de poca altura; favorecen el desarrollo de la enfermedad, pues al haber presencia de precipitaciones es posible que se produzca la muerte del sistema radicular, ataques de artrópodos como varios géneros y especies de sílfidos, insectos como *Pyllophaga* sp y además nematodos pueden también favorecer la incidencia de la enfermedad en suelos con inóculo ya que podrían representar importantes vías de ingreso del patógeno al sistema vascular, mientras que en condiciones secas la infección la puede favorecer el hombre cuando ingresa al cultivo a realizar labores manuales como control de maleza o muestreos.



De acuerdo a Agrios (2005), este patógeno se mantiene en los vasos xilemáticos, donde germina y produce gran cantidad de microconidias que son llevadas a la parte superior de la planta a través del torrente de savia.

Individualmente las plantas muestran marchitamiento de arriba hacia abajo, necrosis en los primeros 15 cm de las hojas intermedias y pérdida de la coloración y turgencia foliar general en resto del área foliar (Figura 8).



Figura 7. Condición de una plantación de piña afectada por *F. oxysporum*, con edad de 5 meses.



Figura 8. Sintomatología de *F. oxysporum* en planta de piña.

Si se realiza un corte transversal al tallo se encuentra una lesión que dependiendo del clima puede estar acuosa o seca (pudre) de color café rojizo a negro, con presencia o ausencia de un corcho blanco compacto en el centro del área afectada (principalmente en verano), sin olor o de muy poco mal olor, las pocas raíces que se encuentran adheridas al tallo son únicamente remanentes fibroso/corchosos (Figura 9).



Figura 9. Daño de *F. oxysporum*. en tallo de planta de piña.

Se ha determinado que las plantas afectadas rápidamente disminuyen de peso producto de una pérdida del sistema radicular y la destrucción del sistema vascular en el tallo que no permite el flujo transpiratorio; Agrios (2005) indica que esto se da en respuesta a la combinación de obstrucción de los vasos y la presión que ejerce la proliferación de la células parenquimatosas adyacentes por lo que tal como lo menciona Barahona y Sancho (2000) indican que en este estado la planta cierra sus estomas. Lo anterior fundamenta las observaciones en el campo donde la planta se deshidrata producto de las altas temperaturas y al no poder refrigerarse a través de la transpiración, estas hojas pierden su rigidez y se vuelven maleables al tacto, no se quiebran (Figura 10), como se quebraría una hoja sana, succulenta, producto de un adecuado contenido de humedad que vuelve turgentes a las células y hace que la pared celular le provea rigidez a toda la hoja, esta es la razón por la que las plantaciones afectadas con *F. oxysporum* muestran notable pérdida del vigor, coloración, porte y cobertura foliar, poco entrecruzamiento de hojas aún en edades iguales o superiores a los cinco meses.

En lotes de plantaciones menos infestados pero con la presencia de este patógeno los síntomas pueden demorarse hasta la 6 – 7 semanas después de la inducción de la floración, en este momento en la plantación inicia la manifestación de los síntomas. Lotes afectados pueden llegar a la cosecha de la fruta con pérdidas en rendimiento desde 2.000 a 4.000 cajas/ha. Es importante indicar que la fruta no es rechazada por problemas directos del patógeno sobre la calidad de la fruta (gomosis o pudriciones), sino por bajo peso debido a que la planta no logró la translocación de agua y nutrimentos necesarios para el llenado de la fruta, lo cual es diferente a las pérdidas en rendimientos indicadas en Brasil para la fusariosis por Py *et al.* (1987), Bartholomew *et al.* (2003), Ventura *et al.* (2008), entre otros.

En este sentido debe indicarse que las hojas y el tallo son el principal sumidero de la planta desde la siembra hasta la inducción de la floración y que adecuadas prácticas culturales de preparación de terreno y un buen manejo de la nutrición, pueden mitigar significativamente la manifestación de los síntomas en esta etapa de desarrollo vegetativo; sin embargo estos lotes al tener inóculo de *F. oxysporum*, corren el riesgo de manifestar los síntomas después de la inducción de la floración debido a que ésta práctica reduce las defensas naturales de las plantas y el patógeno puede ganar espacio. Debido a esto el uso de inductores de resistencia como el Fosetil-Al o *Trichoderma* spp, o ambos, aplicados una semana antes del “forzamiento” puede reforzar la resistencia del cultivo contra los efectos de *F. oxysporum*. Cabe recalcar que áreas que llegan en adecuadas condiciones de nutrición, peso y sanidad, a la inducción de la floración, pueden lograr adecuadas productividades aún cuando *F. oxysporum* las ataque después del “forzamiento”, esto se debe a que a partir de este momento el principal sumidero es la inflorescencia o la fruta, donde es notablemente importante la translocación de foto-asimilados acumulados en la etapa vegetativa en tallo y hojas, sin embargo el uso de estas áreas para segundas cosechas o semillero no es prudente dado que la plantación queda muy afectada e infestada después de la cosecha de la fruta.

Hernández (2008)<sup>1</sup> considera que el agente causal se ve favorecido dado que en el patosistema del cultivo de piña en términos generales no se combate a nivel de plantación ningún hongo anamorfo sino que los controles tan intensivos y específicos contra *Phytophthora* sp pueden incrementar y/o favorecer las poblaciones nativas de este patógeno (*Fusarium*), que sumado a las condiciones anteriormente descritas crean condiciones propicias para el desarrollo de la enfermedad.

Agrios (2005), indica que este patógeno se propaga rápidamente a cortas distancias a través del agua y equipo agrícola contaminado y a largas distancia principalmente en los trasplantes.

Recopilaciones de Bartholomew (2003) indican que el suelo puede permanecer infestado por varios meses y que la diseminación en campos no infectados se da principalmente por insectos, aunque también puede ser por el viento. Señalan también que los conidios libres de *Fusarium subglutinans* agente causal de la fusariosis de la piña (daño directo en la fruta, no en la planta) pueden sobrevivir de 6-13 semanas en el suelo dependiendo de la humedad y la temperatura, con supervivencias altas en suelos secos. La supervivencia en tejido infectado de piña es menor a diez meses y la temperatura óptima para el crecimiento es de 25 °C, con rangos de 5 – 35 °C (Camargo y Camargo (1974), citados por Bartholomew *et al.* (2003).

En plantaciones de piña de la Región Huetar Norte y Huetar Atlántica de Costa Rica, sin irrigación, *F. oxysporum* manifiesta rápidamente los síntomas en plantas infestadas cuando la temperatura alcanza por períodos de tiempo prolongados (un mes o más) de 28 a 35° C durante el día, con humedades relativas superiores a 80%, y suelo por debajo de la capacidad de campo; estas condiciones favorecen más al patógeno cuando las áreas afectadas salen de épocas o períodos de condiciones extremas contrarias, es decir alta precipitación, condiciones de saturación de suelos,

---

<sup>1</sup> Hernández. (2008). Programa tecnológico y Patosistema del cultivo de piña (correo electrónico). Cuba. Departamento de Ciencias Biológicas Universidad de Ciego de Ávila.

principalmente en suelos pesados (ultisoles e inceptisoles) o suelos sin estructura con altos porcentajes de limo (entisoles de Región Huetar Atlántica), mal drenados y compactos por la lluvia aún después de haber sido bien preparados (suelos sueltos) en verano, pues la textura limosa y la falta de estructura permite que la lluvia en la época de invierno filtre los finos y cree un “perfil de compactación ” en los primeros 30 cm o menos, impidiendo el buen desarrollo de la raíz y favoreciendo la muerte del mismo por falta de oxígeno.



Figura 10. Síntoma foliar típico de una planta enferma por *F. oxysporum*.

Otro aspecto importante a considerar es el síntoma de la “mancha cristalina del cultivo de la piña”, Figura 11, este síntoma es común en plantaciones de piña principalmente en la transición invierno - verano y verano – invierno (aunque también puede darse por ataque de plagas como sinfílidos, caracoles o nemátodos, entre otros), donde por sequía en el primer caso y por condiciones de anaerobiosis en el segundo se da una importante muerte de raíces laterales, que provocan problemas de translocación a nivel de haces vasculares y dejan manchas acuosas en el interior del tallo. Este síntoma no necesariamente implica que el lote, block o sección está infectado con *Fusarium oxysporum* pero si es un indicador que debe ser considerado para extremar cuidados y monitoreos frecuentes de diagnóstico de este fitopatógeno, pues este indica que las raíces que murieron son una importante y latente vía de acceso de este organismo a la planta.





Figura 11. Síntoma de la mancha cristalina del cultivo de la piña.

Cuando este síntoma aparece en la plantación es sabio considerar la aplicación de las alternativas químicas para la inducción de resistencia existentes en el mercado con registro de uso para el cultivo de la piña, por otra parte la inoculación del suelo con el antagonista *Trichoderma* spp puede evitar la incidencia de la enfermedad cuando se dan estas condiciones.

#### **4.4 Bioensayos *In vitro* de sustancias químicas contra el agente causal aislado *F. oxysporum***

Aislado y caracterizado el agente que causa la enfermedad denominada como muerte descendente en el cultivo de la piña, se establecieron bioensayos *In vitro* para evaluar la efectividad de diferentes ingredientes activos sobre el patógeno, para esto y tal como se mencionó arriba se seleccionaron fungicidas con registro y autorización para ser utilizados en el cultivo de piña en Costa Rica de los cuales únicamente el carbendazin y triadimefon, se reportan con efecto sobre *Fusarium* sp.

Otros ingredientes activos seleccionados como bitertanol, spiroxamine, pyraclostrobin, difeconazol y metil-thiophanato, son productos sin registro y autorización para ser utilizados en el cultivo de piña en Costa Rica y adicionalmente con la excepción del methil thiophanato en la etiqueta nacional no se indica que controlan a *Fusarium* sp; estos se incluyeron en el trabajo para cuantificar su eficacia

sobre *Fusarium* sp, realizar comparaciones entre el triadimefon y otros triazoles (bitertanol y difeconazol), así como generar información de eficacia biológica de otros grupos químicos existentes en el país para una eventual estrategia anti-resistencia bajo el concepto de cero residuos (spiroxamine y pyraclostrobin), el metil-thiophanato se incluyó por ser un fungicida perteneciente a un grupo químico diferente de los otros y tener indicación en la etiqueta de efecto biocida sobre *Fusarium* sp.

#### 4.4.1 Inhibición del crecimiento radial (IC) de *F. oxysporum* en la técnica de medios enmendados

Esta prueba se realizó y evaluó mediante un diseño estadístico trifactorial de subparcelas divididas, utilizando el software estadístico STATISTICA 6.0. Para el cálculo del porcentaje de inhibición del crecimiento (% IC) las mediciones se realizaron a los seis, doce y 18 días después establecidos los tratamientos.

En el Apéndice 1, se observa que estadísticamente existen diferencias altamente significativas para los tres factores evaluados (fungicidas, tiempo y dosis) y para la interacción de los mismos, con  $p < 0,05$ .

Cuadro 2. Tabla de comparación medias para la interacción A x B (fungicida y tiempo de evaluación) en el bioensayo de sustancias químicas contra *F. oxysporum* en la técnica de medios enmendados.

| Tukey HSD test; variable %IC (MEDIOS ENMENDADOS) |                   |    |          |      |      |      |      |      |      |      |
|--|-------------------|----|----------|------|------|------|------|------|------|------|
| Homogenous Groups, alpha = .05000                |                   |    |          |      |      |      |      |      |      |      |
| Error: Between MS = 63.256, df = 220.00          |                   |    |          |      |      |      |      |      |      |      |
| Cell No.   | A                 | B  | %IC Mean | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    |
| 17   | Triadimefon       | 12 | 6,3379   | **** |      |      |      |      |      |      |
| 18   | Triadimefon       | 18 | 18,4306  |      | **** |      |      |      |      |      |
| 16   | Triadimefon       | 6  | 30,2336  |      |      | **** |      |      |      |      |
| 15   | Bitertanol        | 18 | 37,5978  |      |      | **** | **** |      |      |      |
| 14   | Bitertanol        | 12 | 38,5781  |      |      | **** | **** |      |      |      |
| 11   | Pyraclostrobin    | 12 | 42,8832  |      |      |      | **** |      |      |      |
| 8  | Difenoconazole    | 12 | 54,7721  |      |      |      |      | **** |      |      |
| 12   | Pyraclostrobin    | 18 | 55,9452  |      |      |      |      | **** |      |      |
| 9  | Difenoconazole    | 18 | 56,3020  |      |      |      |      | **** |      |      |
| 3  | Spiroxamine       | 18 | 84,3742  |      |      |      |      |      | **** |      |
| 2  | Spiroxamine       | 12 | 86,6609  |      |      |      |      |      | **** |      |
| 13   | Bitertanol        | 6  | 100,0000 |      |      |      |      |      |      | **** |
| 5  | Carbendazim       | 12 | 100,0000 |      |      |      |      |      |      | **** |
| 4  | Carbendazim       | 6  | 100,0000 |      |      |      |      |      |      | **** |
| 6  | Carbendazim       | 18 | 100,0000 |      |      |      |      |      |      | **** |
| 7  | Difenoconazole    | 6  | 100,0000 |      |      |      |      |      |      | **** |
| 1  | Spiroxamine       | 6  | 100,0000 |      |      |      |      |      |      | **** |
| 10   | Pyraclostrobin    | 6  | 100,0000 |      |      |      |      |      |      | **** |
| 19   | Metil-Thiophanato | 6  | 100,0000 |      |      |      |      |      |      | **** |
| 20   | Metil-Thiophanato | 12 | 100,0000 |      |      |      |      |      |      | **** |
| 21   | Metil-Thiophanato | 18 | 100,0000 |      |      |      |      |      |      | **** |

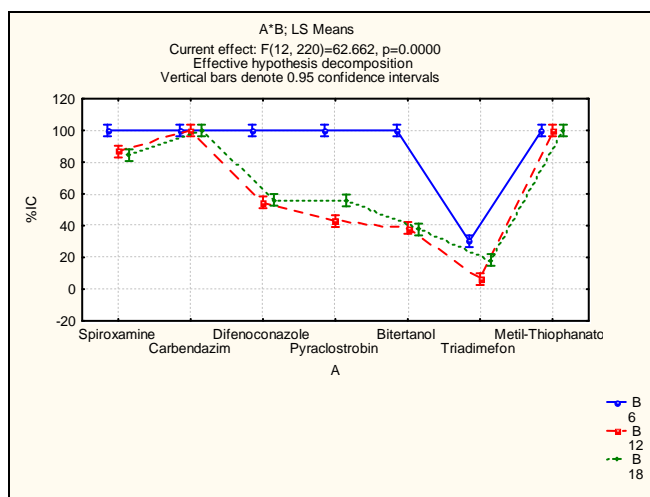


Figura 12. Comparación de medias para la interacción de los factores AxB (fungicidas y tiempos de evaluación), en el bioensayo de sustancias químicas contra *F. oxysporum* en la técnica de medios enmendados.

En el análisis de las interacciones entre los factores A x B (fungicidas con los tiempos de evaluación), Cuadro 2, se determinó en la comparación de medias que a los 6 días, todos los fungicidas evaluados mostraban 100% de IC, a excepción del triadimephon el cual mostró 40% de IC del área tratada con el ingrediente activo. Durante los doce y 18 días se determinó que el carbendazim y el metil thiophanato mostraban 100 % de IC, mientras que los fungicidas difenoconazole, pyraclostrobin y bitertanol así como el mismo triadimefon, el % IC tendió a bajar (Figura 12).

La interacción de los factores A x C (fungicidas y dosis evaluadas), las medias de los ingredientes activos carbendazim y metil-thiophanato evaluados (Cuadro 3) mantuvieron 100% de IC en las tres dosis evaluadas, este mismo comportamiento se determinó con el ingrediente activo spiroxamine a dosis medias y bajas, donde no se obtuvo diferencias significativas.

Con respecto a las dosis evaluadas no hay diferencia estadística en el % IC para ninguna de las tres dosis del ingrediente activo del bitertanol, el cual está en el orden del 55 a 60% de IC. El difenoconazole es igual estadísticamente a dosis media y dosis alta y no existe diferencia entre este fungicida y estas dosis con el pyraclostrobin a dosis alta, las cuales muestran un % IC del orden del 71 al 80%.



Para el caso del triadimefon se presenta la situación de que es el ingrediente activo con el más bajo % IC y sin diferencias entre las tres dosis evaluadas, las cuales se mantienen en el orden de 16 a 20% de IC (Cuadro 3, Figura 13).

Cuadro 3. Comparación de medias para la interacción A x C (fungicida y dosis evaluada) de medios enmendados, en el bioensayo de sustancias químicas contra *F. oxysporum* en la técnica de medios enmendados.

| Tukey HSD test; variable %IC (MEDIOS ENMENDADOS2) |                   |   |          |      |      |      |      |      |      |      |
|---|-------------------|---|----------|------|------|------|------|------|------|------|
| Homogenous Groups, alpha = .05000                 |                   |   |          |      |      |      |      |      |      |      |
| Error: Between MS = 63.256, df = 220.00           |                   |   |          |      |      |      |      |      |      |      |
| Cell No.  | A                 | C | %IC Mean | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    |
| 18  | Triadimefon       | A | 16,1316  | **** |      |      |      |      |      |      |
| 16  | Triadimefon       | B | 18,1916  | **** |      |      |      |      |      |      |
| 17  | Triadimefon       | M | 20,6789  | **** |      |      |      |      |      |      |
| 10  | Pyraclostrobin    | B | 48,1207  |      | **** |      |      |      |      |      |
| 14  | Bitertanol        | M | 55,6965  |      | **** | **** |      |      |      |      |
| 13  | Bitertanol        | B | 59,9656  |      |      | **** |      |      |      |      |
| 15  | Bitertanol        | A | 60,5138  |      |      | **** |      |      |      |      |
| 7   | Difenoconazole    | B | 60,8535  |      |      | **** | **** |      |      |      |
| 11  | Pyraclostrobin    | M | 70,1521  |      |      |      | **** | **** |      |      |
| 1   | Spiroxamine       | B | 71,0350  |      |      |      |      | **** |      |      |
| 8   | Difenoconazole    | M | 73,8449  |      |      |      |      | **** | **** |      |
| 9   | Difenoconazole    | A | 76,3757  |      |      |      |      | **** | **** |      |
| 12  | Pyraclostrobin    | A | 80,5556  |      |      |      |      |      | **** |      |
| 6   | Carbendazim       | A | 100,0000 |      |      |      |      |      |      | **** |
| 5   | Carbendazim       | M | 100,0000 |      |      |      |      |      |      | **** |
| 4   | Carbendazim       | B | 100,0000 |      |      |      |      |      |      | **** |
| 3   | Spiroxamine       | A | 100,0000 |      |      |      |      |      |      | **** |
| 2   | Spiroxamine       | M | 100,0000 |      |      |      |      |      |      | **** |
| 19  | Metil-Thiophanato | B | 100,0000 |      |      |      |      |      |      | **** |
| 20  | Metil-Thiophanato | M | 100,0000 |      |      |      |      |      |      | **** |
| 21  | Metil-Thiophanato | A | 100,0000 |      |      |      |      |      |      | **** |

Por otra parte, el análisis de la interacción B x C, (tiempo de evaluación y dosis evaluada) muestra que no existe diferencia estadística para el día seis y las tres dosis evaluadas, con 100% de IC (Cuadro 4).

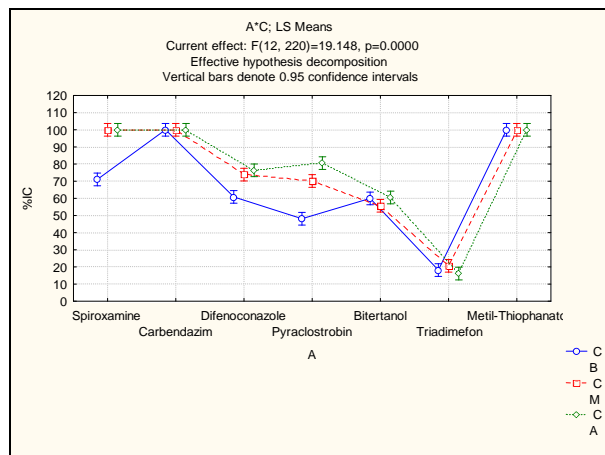


Figura 13. Comparación de medias para la interacción de los factores Ax C (fungicidas y dosis evaluadas), en el bioensayo de sustancias químicas contra *F. oxysporum* en la técnica de medios enmendados.

Entre los días doce y 18 después de establecidos los bioensayos se determinó únicamente diferencias estadísticas en la dosis media a los doce días contra la dosis alta a los 18 días, las otras comparaciones para estos eventos (doce y 18) y dosis de evaluación (media y alta) son estadísticamente iguales (Figura 14).

Cuadro 4. Comparación de medias para la interacción BxC (tiempo de evaluación y dosis evaluada) de medios enmendados, en el bioensayo de sustancias químicas contra *F. oxysporum* en la técnica de medios enmendados.

| Tukey HSD test; variable %IC (MEDIOS ENMENDADOS) |    |   |          |      |      |      |      |  |
|--|----|---|----------|------|------|------|------|--|
| Homogenous Groups, alpha = .05000                |    |   |          |      |      |      |      |  |
| Error: Between MS = 63.256, df = 220.00          |    |   |          |      |      |      |      |  |
| Cell No.   | B  | C | %IC Mean | 1    | 2    | 3    | 4    |  |
| 4  | 12 | B | 53.01023 | **** |      |      |      |  |
| 7  | 18 | B | 54.14228 | **** |      |      |      |  |
| 5  | 12 | M | 64.13317 |      | **** |      |      |  |
| 6  | 12 | A | 66.81321 |      | **** | **** |      |  |
| 8  | 18 | M | 68.02732 |      | **** | **** |      |  |
| 9  | 18 | A | 71.82315 |      |      | **** |      |  |
| 1  | 6  | B | 89.20451 |      |      |      | **** |  |
| 3  | 6  | A | 90.03936 |      |      |      | **** |  |
| 2  | 6  | M | 90.85624 |      |      |      | **** |  |

Esta situación permite afirmar que el momento para tener resultados válidos sobre efectos biocidas significativos en pruebas similares debe ser después de los doce días de efectuadas las siembra del agente causal en él o los fungicidas evaluados.

La figura 15 muestra todas las interacciones en conjunto A x B x C (fungicida, tiempos de evaluación y dosis evaluadas), en este gráfico se observa que para el día seis todos los fungicidas y dosis evaluadas presentan 100% de IC sin diferencias estadísticas entre ellos (Cuadro 5).

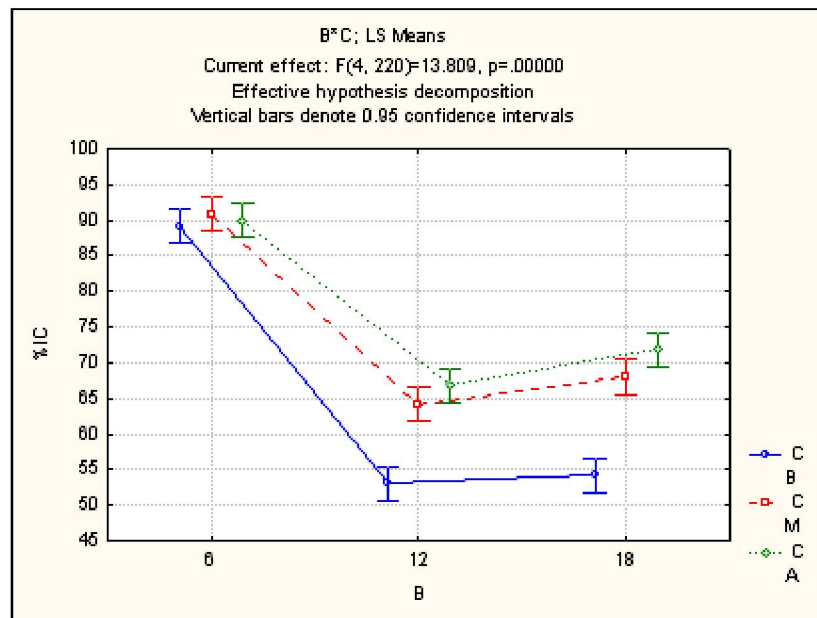


Figura 14. Comparación de medias para la interacción de los factores B x C (tiempo de evaluación y dosis evaluadas), en el bioensayo de sustancias químicas contra *F. oxysporum* en la técnica de medios enmendados.

Este mismo comportamiento se mantiene a través del tiempo para los ingredientes activos carbendazim y metil thiophanato que presentan 100% de IC en todas las dosis evaluadas mientras que en dosis medias y altas el spiroxamine tampoco muestra diferencias estadística con estos.

En los ingredientes activos difenoconazole y pyraclostrobin con rangos del 55 al 63% de IC en dosis media y del 60 al 73% de IC en dosis alta, no muestran diferencias estadística entre ellos. En tercer lugar se ubica el ingrediente activo bitertanol que mantiene para las tres dosis evaluadas y tres momentos de evaluación un % IC en rango 35 al 40% sin diferencia estadística en ningún caso, lo cual sugiere que para *F. oxysporum* el efecto biocida de este fungicida se encuentra a una dosis mayor a la evaluada.

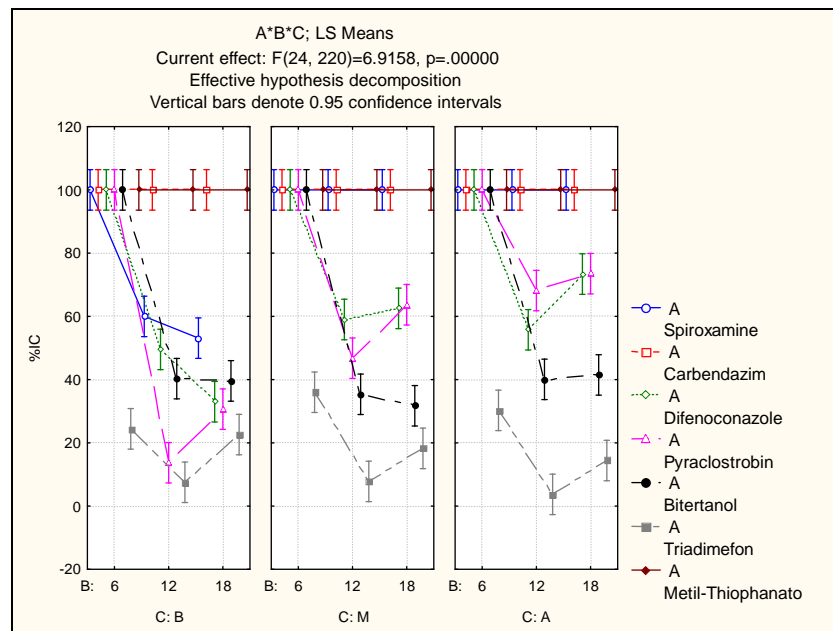


Figura 15. Comparación de medias para la interacción de los factores A x B x C (fungicidas, tiempo de evaluación y dosis evaluadas), en la técnica de medios enmendados, en el bioensayo de sustancias químicas contra *F. oxysporum* en la técnica de medios enmendados.

El triadimefón se presenta como el ingrediente activo con menor % de IC entre 7% y 30% de IC, desde dosis baja hasta dosis alta en los tres momentos de evaluación, esto sugiere al igual que para el ingrediente activo bitertanol que el efecto biocida posiblemente se encuentre en una dosis mayor a la estudiada.

Cuadro 5. Comparación de medias para interacción A x B x C (fungicida, tiempo de evaluación y dosis evaluada) en técnica de medios enmendados con fungicidas del bioensayo contra *F. oxysporum*.

| Tukey HSD test; variable %IC (MEDIOS ENMENDADOS) |                   |    |   |          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
|--|-------------------|----|---|----------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|
| Homogenous Groups, alpha = .05000                |                   |    |   |          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Error: Between MS = 63.256, df = 220.00          |                   |    |   |          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| Cell No.   | A                 | B  | C | %IC Mean | 1   | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7   | 8   | 9   | 10  | 11  | 12  | 13  | 14  | 15  | 16  | 17  |     |  |
| 51   | Triadimefon       | 12 | A | 3.7028   | *** |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 49   | Triadimefon       | 12 | B | 7.5181   | *** | *** |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 50   | Triadimefon       | 12 | M | 7.7930   | *** | *** |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 31   | Pyraclostrobin    | 12 | B | 13.7068  | *** | *** | *** |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 54   | Triadimefon       | 18 | A | 14.4167  | *** | *** | *** | *** |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 53   | Triadimefon       | 18 | M | 18.2500  | *** | *** | *** | *** | *** |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 52   | Triadimefon       | 18 | B | 22.6250  |     | *** | *** | *** | *** | *** |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 46   | Triadimefon       | 6  | B | 24.4318  |     | *** | *** | *** | *** | *** | *** |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 48   | Triadimefon       | 6  | A | 30.2755  |     |     | *** | *** | *** | *** | *** | *** |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 34   | Pyraclostrobin    | 18 | B | 30.6555  |     |     | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 44   | Bitertanol        | 18 | M | 31.7353  |     |     | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |     |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 25   | Difenoconazole    | 18 | B | 33.0077  |     |     | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 41   | Bitertanol        | 12 | M | 35.3542  |     |     |     | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |     |     |     |     |     |     |     |  |
| 47   | Triadimefon       | 6  | M | 35.9937  |     |     |     |     | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |     |     |     |     |     |     |  |
| 43   | Bitertanol        | 18 | B | 39.5853  |     |     |     |     | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |     |     |     |     |     |     |  |
| 42   | Bitertanol        | 12 | A | 40.0885  |     |     |     |     | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |     |     |     |     |     |  |
| 40   | Bitertanol        | 12 | B | 40.3118  |     |     |     |     | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |     |     |     |     |     |  |
| 45   | Bitertanol        | 18 | A | 41.4730  |     |     |     |     | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |     |     |     |     |  |
| 32   | Pyraclostrobin    | 12 | M | 46.7763  |     |     |     |     |     | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |     |     |     |  |
| 22   | Difenoconazole    | 12 | B | 49.5527  |     |     |     |     |     |     | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |     |     |  |
| 7  | Spiroxamine       | 18 | B | 53.1225  |     |     |     |     |     |     |     | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |     |     |  |
| 24   | Difenoconazole    | 12 | A | 55.7547  |     |     |     |     |     |     |     |     | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |     |  |
| 23   | Difenoconazole    | 12 | M | 59.0088  |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |     |  |
| 4  | Spiroxamine       | 12 | B | 59.9828  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** | *** | *** | *** | *** | *** | *** |     |  |
| 26   | Difenoconazole    | 18 | M | 62.5259  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** | *** | *** | *** | *** | *** |     |  |
| 35   | Pyraclostrobin    | 18 | M | 63.6801  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** | *** | *** | *** | *** |     |  |
| 33   | Pyraclostrobin    | 12 | A | 68.1667  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** | *** | *** | *** |     |  |
| 27   | Difenoconazole    | 18 | A | 73.3724  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** | *** | *** | *** |  |
| 36   | Pyraclostrobin    | 18 | A | 73.5000  |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** | *** | *** |  |
| 30   | Pyraclostrobin    | 6  | A | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 17   | Carbendazim       | 18 | M | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 1  | Spiroxamine       | 6  | B | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 29   | Pyraclostrobin    | 6  | M | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 16   | Carbendazim       | 18 | B | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 18   | Carbendazim       | 18 | A | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 19   | Difenoconazole    | 6  | B | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 37   | Bitertanol        | 6  | B | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 38   | Bitertanol        | 6  | M | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 39   | Bitertanol        | 6  | A | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 15   | Carbendazim       | 12 | A | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 14   | Carbendazim       | 12 | M | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 13   | Carbendazim       | 12 | B | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 12   | Carbendazim       | 6  | A | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 11   | Carbendazim       | 6  | M | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 10   | Carbendazim       | 6  | B | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 9  | Spiroxamine       | 18 | A | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 8  | Spiroxamine       | 18 | M | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 21   | Difenoconazole    | 6  | A | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 6  | Spiroxamine       | 12 | A | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 5  | Spiroxamine       | 12 | M | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 20   | Difenoconazole    | 6  | M | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 3  | Spiroxamine       | 6  | A | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 2  | Spiroxamine       | 6  | M | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 28   | Pyraclostrobin    | 6  | B | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 55   | Metil-Thiophanato | 6  | B | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 56   | Metil-Thiophanato | 6  | M | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 57   | Metil-Thiophanato | 6  | A | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 58   | Metil-Thiophanato | 12 | B | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 59   | Metil-Thiophanato | 12 | M | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 60   | Metil-Thiophanato | 12 | A | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 61   | Metil-Thiophanato | 18 | B | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 62   | Metil-Thiophanato | 18 | M | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |
| 63   | Metil-Thiophanato | 18 | A | 100.0000 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | *** |  |

Lo anterior sugiere la necesidad de realizar ensayos *in vitro* para encontrar las líneas base y ajustar o encontrar la mejor dosis; ya que se deduce para el caso del carbendazim que el hongo es tan sensible a esta molécula que la dosis baja

evaluada aún está por encima de la necesaria para controlar el hongo, lo cual es importante considerarlo puesto que al no conocer que tan por encima se encuentra la dosis requerida se podría estar exponiendo el patógeno a concentraciones que podrían acelerar los procesos de resistencia.

En el caso del spiroxamine se encontró que la dosis necesaria para el control del hongo se encuentra entre la dosis baja y la dosis media evaluada, esto ya es un buen adelanto para el establecimiento de nuevos ensayos para determinar las líneas base de esta molécula.

En cuanto a las otras moléculas evaluadas, es necesario realizar bioensayos con dosis superiores a las evaluadas para encontrar respuesta biológica. Sin embargo es conveniente antes de esto realizar análisis de costos y de riesgos de residuos, puesto que, para cualquier ingrediente activo de estos, la dosis en la que se encuentre eficacia biológica podría ser tan alta que no exista justificación económica para su empleo o el riesgo de residualidad sea muy alto, aunque desde ya la información generada define que las dosis a utilizar contra *F. oxysporum* están por fuera de las ofrecidas por el fabricante en la etiqueta.

La situación anterior requiere de dos procesos, por un lado existe una necesidad de extensión de uso de las moléculas para el cultivo de piña (las que no están registradas para este cultivo en Costa Rica) y por otra parte la necesidad de nuevos ensayos de campo para definir la dosis para el cultivo y el control del agente causal *Fusarium oxysporum*.

Es necesario recalcar que de las moléculas evaluadas únicamente tienen registro de uso en el cultivo de piña el carbendazim y el triadimefón, las otras moléculas no están autorizadas para su uso en este cultivo; lo cual es crítico basados en el hecho de que esta emergente enfermedad del cultivo de piña como le llama Obregón y Mata (2008), puede llegar a tener niveles de infestación muy altos, donde

el uso del carbendazim y la consecuente exposición del hongo al fungicida podría en relativamente poco tiempo adquirir resistencia, máxime que este fungicida tiene clasificación 1 en la lista de FRAC. Esto pone de manifiesto la necesidad de encontrar la línea base de eficacia biológica del carbendazim para el combate de *Fusarium oxysporum* en el cultivo de piña para garantizar el uso racional del producto y con esto evitar la aparición temprana de la resistencia. Pero por otra parte existe la necesidad de contar con más moléculas registradas y autorizadas en el cultivo para el control de la enfermedad ya que esta situación, aunado a las exigencias internacionales de certificación impiden el uso de cualquier molécula que no esté registrada en el cultivo, mediante los controles de Límites Máximos de Residuos instalados en los países destino de la fruta.

En cualquier caso mientras esto se desarrolla para beneficio de la actividad, es importante que los productores extremen el manejo del cultivo mediante la implementación de las medidas preventivas que aquí se mencionaron y por otra parte se inicien trabajos de residualidad y degradación a nivel de fruta con las moléculas que arrojaron los mejores resultados de eficacia, para una eventual necesidad de implementar estrategias anti-resistencia de cero residuos para el manejo de la enfermedad.

#### **4.4.2 Bioensayo *In vitro* Porcentaje de colonización de *F. oxysporum* en la técnica de discos impregnados.**

Para esta evaluación se empleó el cálculo del % de colonización (% Col) con mediciones realizadas a los seis, doce y 18 días después de la siembra.

Se empleó un diseño estadístico trifactorial de subparcelas divididas y el software para su análisis estadístico STATISTICA 6.0; en esta técnica discos impregnados el ANOVA solamente dio significativa la interacción A x C (fungicida y dosis evaluadas), con  $p < 0,05$ .

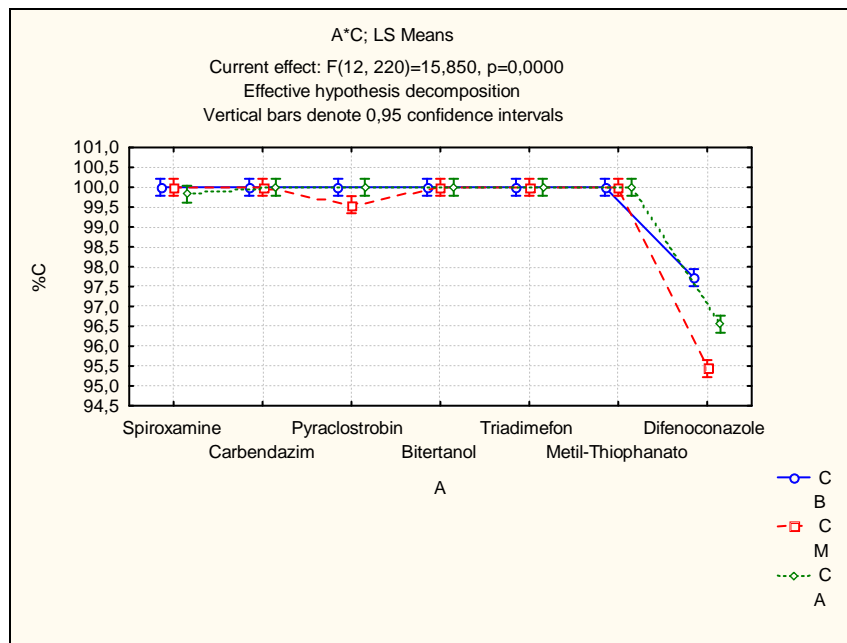


Figura 16. Comparación de medias para la interacción A x .C (fungicida y dosis evaluada) del porcentaje de colonización del agente causal en medios de cultivo con discos impregnados con los diferentes ingredientes activos.

La figura 16, indica que existe diferencia estadística entre el difenoconazole y los demás ingredientes activos (Cuadro 6). Por otra parte el eje “y” del gráfico en la Figura 16, muestra que dicha diferencia es de solo tres puntos porcentuales; es decir *F. oxysporum*, fue inhibido únicamente unos milímetros alrededor del disco por el producto difenoconazole, en ninguno de los otros casos se encontró inhibición del crecimiento del hongo alrededor del disco, aún para los productos carbendazim, metil-thiophanato y spiroxamine que en la técnica de evaluación de medios enmendados presentaron los mejores controles sobre el agente causal.



Cuadro 6. Comparación de medias para la interacción A x C (fungicida y dosis evaluada) del porcentaje de colonización del agente causal en medios de cultivo con discos impregnados con los diferentes ingredientes activos.

| Tukey HSD test; variable %C (DISCOS IMPREGNADOS)<br>Homogenous Groups, alpha = ,05000<br>Error: Between MS = ,21199, df = 220,00 |                   |   |            |      |      |      |      |
|--|-------------------|---|------------|------|------|------|------|
| Cell No.   | A                 | C | %C<br>Mean | 1    | 2    | 3    | 4    |
| 20   | Difenoconazole    | M | 95,4352    | **** |      |      |      |
| 21   | Difenoconazole    | A | 96,5534    |      | **** |      |      |
| 19   | Difenoconazole    | B | 97,7254    |      |      | **** |      |
| 8  | Pyraclostrobin    | M | 99,5611    |      |      |      | **** |
| 3  | Spiroxamine       | A | 99,8242    |      |      |      | **** |
| 6  | Carbendazim       | A | 100,0000   |      |      |      | **** |
| 7  | Pyraclostrobin    | B | 100,0000   |      |      |      | **** |
| 5  | Carbendazim       | M | 100,0000   |      |      |      | **** |
| 9  | Pyraclostrobin    | A | 100,0000   |      |      |      | **** |
| 10   | Bitertanol        | B | 100,0000   |      |      |      | **** |
| 4  | Carbendazim       | B | 100,0000   |      |      |      | **** |
| 12   | Bitertanol        | A | 100,0000   |      |      |      | **** |
| 13   | Triadimefon       | B | 100,0000   |      |      |      | **** |
| 14   | Triadimefon       | M | 100,0000   |      |      |      | **** |
| 15   | Triadimefon       | A | 100,0000   |      |      |      | **** |
| 16   | Metil-Thiophanato | B | 100,0000   |      |      |      | **** |
| 17   | Metil-Thiophanato | M | 100,0000   |      |      |      | **** |
| 18   | Metil-Thiophanato | A | 100,0000   |      |      |      | **** |
| 2  | Spiroxamine       | M | 100,0000   |      |      |      | **** |
| 11   | Bitertanol        | M | 100,0000   |      |      |      | **** |
| 1  | Spiroxamine       | B | 100,0000   |      |      |      | **** |

Los resultados obtenidos en términos generales con la técnica de discos impregnados, contradicen los resultados obtenidos con los medios enmendados, puesto que esta indica que el porcentaje de control que se obtiene con los fungicidas evaluados, porcentualmente es muy bajo y limitado solo al fungicida difenoconazole. Sin embargo al analizar los supuestos del ANOVA se encuentra que no se cumplen los supuestos de normalidad o errores normalmente distribuidos (Apéndice 4), de errores independientes (Apéndice 5), y homocedasticidad o varianzas homogéneas (Apéndice 6) por lo tanto el ANOVA generado para esta técnica no es válido desde el punto de vista estadístico, encontrándose que esta situación se propicia por la técnica empleada y no por los valores cuantitativos obtenidos en las evaluaciones, por lo que no aplica en este sentido ninguna transformación de los datos para hacer cumplir los supuestos del ANOVA y hacer válido el análisis de los resultados.

El hecho a rescatar en esta situación es que con la técnica de medios enmendados, existe un comportamiento bastante heterogéneo y con tendencias lógicas y estadísticamente válidas para la comparación y discusión de resultados para los diferentes ingredientes activos, puesto que en términos generales se encontró que a menor dosis menor control dentro de cada fungicida evaluado (Figura 13), así como su comportamiento en el tiempo, que en términos generales a mayor tiempo de exposición al fungicida mayor control (Figura 8 y Apéndice 2), y además que se encontraron diferencias estadísticas entre los ingredientes activos evaluados. Este hecho pone de manifiesto que para este tipo de pruebas la técnica de discos impregnados no es una buena herramienta para realizar evaluaciones o comparaciones de eficacia biológica *entre ingredientes activos*, no así la técnica de medios enmendados que se presenta como una buena herramienta para realizar comparaciones entre ingredientes activos de diferentes propiedades de formulación.

Lo anterior concuerda con observaciones realizadas por Dhingra y Sinclair (1986), los cuales mencionan que la técnica de discos impregnados se basa en la capacidad de difusión de la sustancia de ensayo a través de un medio de agar y es útil para comparar las diferentes concentraciones del mismo compuesto, estos investigadores afirman que este tipo de prueba no puede ser utilizada para la comparación de diferentes compuestos ya que la capacidad de difusión a través de agar puede ser diferente.

Cuadro 7. Características técnicas y fisicoquímicas de los ingredientes activos evaluados en el control de *F. oxysporum* en las pruebas de eficacia biológica con fungicidas.

| Características Técnicas |                    |                      |  | Propiedades físicas y químicas |             |                     |
|--------------------------|--------------------|----------------------|--|--------------------------------|-------------|---------------------|
| Grupo Químico            | Ingrediente Activo | Modo de acción       | Mecanismo de acción  | Estado físico                  | Formulación | Solubilidad en agua |
| Benzimidazol             | Carbendazim        | Sistémico            | Inhibe la proteína tubulina (síntesis del ergosterol) afecta permeabilidad de la pared celular | Líquido                        | SC          | Suspensión          |
| Triazol                  | Bitertanol         | Sistémico y contacto | Típico inhibidor de la síntesis del ergosterol en C14 demetilasa                               | Líquido transparente           | DC          | Emulsionable        |
| Spiroketalamina          | Spiroxamine        | Sistémico            | Inhibe la síntesis del ergosterol en $\Delta 14$ reductasa                                     | Líquido                        | EC          | Emulsionable        |
| Estrobirulina            | Pyraclostrobin     | Sistémico            | Bloquea abastecimiento de energía de la célula del hongo                                       | Líquido                        | EC          | Emulsionable        |
| Triazol                  | Difenoconazole     | Sistémico            | Inhibe síntesis ergosterol/ afecta permeabilidad membrana celular                              | Líquido                        | EC          | Miscible            |
| Triazol                  | Triadimefon        | Sistémico            | Inhibición de la biosíntesis del ergosterol  | Sólido, polvo                  | WP          | Dispersable         |
| Carbamato                | Metil-Thiophanato  | Sistémico            | Inhibe la respiración celular e impide la culminación de la mitosis en las células del hongo.  | Líquido                        | SC          | Suspensión          |

El Cuadro 7, muestra que todos los fungicidas son sistémicos, todos tienen mecanismos de acción que interfieren de diferente forma con los procesos de reproducción del hongo, existen algunos que comparten el mismo tipo de formulación (spiroxamine, pyraclostrobin, difenoconazole) como concentrado emulsionable, por otra parte de solución concentrada (carbendazim y metil thiophanato) y el triadimefon único que presenta la formulación de polvo mojable.

Pero de estas características es importante considerar quizás como una de las explicaciones del porqué el fungicida difenoconazole presentó algún control al menos mínimo contra *F. oxysporum* en la técnica de discos impregnados, está el hecho que corresponde al único ingrediente activo *miscible* en agua, lo que significa que es el único ingrediente activo con formulación más afín en términos de solubilidad al agua, y como el medio PDA usa como disolvente agua, puede ser que la poca humedad que impregna el disco de papel haya logrado difundir un poco en el medio PDA solidificado como lo mencionan Dhingra y Sinclair (1986) y por esta razón se obtuvo un halo de inhibición alrededor del disco que controló el crecimiento de *F. oxysporum* en esa pequeña área.

En cuanto a los aportes prácticos y agronómicos derivados de los resultados con todas las sustancias fungicidas se considera importante investigar dosis más elevadas para el triadimefón, ya que es un fungicida con registro en el país para el cultivo de piña, el cual junto con el carbendazim también con registro para este cultivo, representan una buena estrategia anti-resistencia, mediante la rotación de productos.

Sin embargo ambos productos requieren de mayor investigación, ya que por una parte la eficacia biológica encontrada para el triadimefón en las tres dosis evaluadas no es satisfactoria, es decir se deben realizar más estudios de este tipo con dosis más elevadas a la superior estudiada para encontrar una mayor y mejor eficacia biológica y por otra parte el carbendazim, debe ser estudiado de la misma forma pero en dosis más bajas a la inferior estudiada, ya que en todos los casos se obtuvo 100% de control sobre *F. oxysporum*, lo cual no es sano desde el punto de vista estrategia antiresistencia, pues es necesario conocer el punto de inflexión de la dosis en cuanto a la respuesta en la eficacia biológica, para poder manejar la dosis que menor impacto tenga en el aparecimiento de la resistencia del hongo al ingrediente activo. Puesto que tanto las exposiciones a dosis muy altas como la subdosificación con respecto a la dosis de eficacia biológica favorecen el aparecimiento temprano de la resistencia.

En cultivos como la piña donde existen importantes regulaciones en los mercados de destino del producto a través de los LMR es muy peligroso el uso de moléculas fitosanitarias sin registro en el cultivo, el riesgo de detección de estas moléculas en los monitoreos de residuos que se realizan en los mercados es extremadamente alto, por lo que el uso de un fungicida como lo es el caso en estudio, no aprobado o registrado en el país para el cultivo de piña y sin tolerancias en los mercados de destino, simplemente imposibilita su uso, a pesar de esto existen alternativas como el “manejo a cero residuos”, aunque para esto al menos debe existir el registro de la molécula en el país para el cultivo ya que eso hace permisivo el uso del producto en la plantación, pero en el entendido que el manejo de los residuos debe ser cero.

Los resultados muestran que existen moléculas fitosanitarias con un buen control sobre *F. oxysporum* como los fungicidas que lograron 100% de control sobre el fitopatógeno (carbendazim, methil-thiophanato y spiroxamine), donde a pesar de que el methil-thiophanato y el spiroxamine no poseen registro en Costa Rica para el cultivo de piña, son interesantes para una eventual estrategia de manejo de resistencia a cero residuos, aunque esto hace necesario de una vez, realizar pruebas de residualidad y degradación a nivel de fruta para garantizar la no detección de residuos aún mínimos, pues los mismos no poseen un Límite Máximo de Residuos (LMR) en los mercados de los Estados Unidos aunque sí en la Comunidad Europea (apéndice 9) para el cultivo de la piña (aunque en este caso en la mayoría de los siete i.a investigados la tolerancia está en el límite de detección lo cual significa que es un cero analítico), donde se exporta más del 90% de la fruta fresca del país, existiendo fuertes implicaciones legales si son encontradas fuera de los rangos permitidos en estos mercados. Claro está que este tema debe ser abordado por empresas registrantes interesadas, pues los estudios hasta finalizar con un registro de uso para el cultivo son tediosos y significativamente costosos.

En todo caso a pesar que el methil-thiophanato y spiroxamine ofrecen buenos resultados de control sobre *F. oxysporum*, en las dosis evaluadas, no deben ser utilizados en el cultivo de la piña, pues no tienen ni registro en el país para este cultivo ni tolerancias en los mercados de los Estados Unidos donde se exporta 50% o más de la fruta costarricense.

#### **4.5 Bioensayos *In vitro* de enfrentamientos de *Trichoderma* spp contra *F. oxysporum***

Se evaluó la capacidad de colonización y potencial fungistático de diez cepas de microorganismos antagonistas del género *Trichoderma* sp mediante la técnica de cultivos duales y potencial fungistático, enfrentados con el agente causal aislado *F. oxysporum*. Los resultados obtenidos se evaluaron a las 48, 96 y 120 horas después de establecido el bioensayos, mediante un diseño estadístico bifactorial en bloques, y se expresan como porcentaje de colonización (%Col) en ambas técnicas.

#### 4.5.1 Bioensayos de antagonismo de *Trichoderma* spp contra *F. oxysporum* en cultivos duales

EL ANOVA generado muestra que el efecto de bloque no es significativo (Apéndice 7), por el contrario los factores Cepa y tiempo o momento de las evaluaciones expresadas como HDS (horas después de la siembra) si son altamente significativas, no obstante la interacción entre ellas también es altamente significativa.

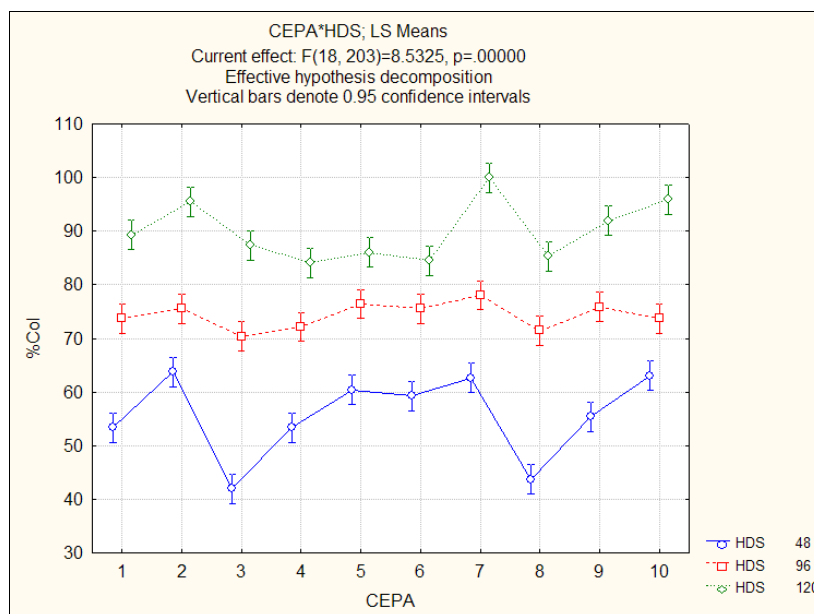


Figura 17. Comparación del porcentaje de colonización en la interacción CEPA x HDS del enfrentamiento de *Trichoderma* sp contra *F. oxysporum* en la técnica de cultivos duales.

La figura 17 muestra que existe una diferencia en el %Col entre las cepas, las cuales guardan una tendencia similar a lo largo de los tres momentos de evaluación, de acuerdo a esta Figura y al Cuadro 8 las diferencias más sobresalientes entre las cepas son las siguientes:

Para las 48 horas: C2, C10, C7 > C5, C6, C9, C4, C1 > C8, C3

Para las 96 horas: C7, C5 > C9, C6, C2, C10, C1, C4, C8 > C3

Para las 120 horas: C7, 10, C2 > C9, C1, C3, C5, C8 > C6, C4

Lo anterior muestra que a pesar de que al inicio (48 y 96 horas) la Cepa 3 y Cepa 8 presentan el menor %Col, finalizan en una fase intermedia del %Col general del grupo de cepas evaluado. De la misma forma las Cepas con el %Col más

elevado C7, C10 y C2, finalizan en este orden de %Col a pesar de que iniciaron ellas mismas pero en orden invertido C2, C10, C7, en cuanto al valor de sus medias, ratificando con esto la ausencia de diferencias estadísticas entre ellas.

Cuadro 8. Comparación de medias para la interacción CEPA x HDS en la variable porcentaje de colonización del enfrentamiento de *Trichoderma* sp contra *F. oxysporum* en la técnica de cultivos duales.

| Tukey HSD test; variable %Col (CULTIVO DUAL) |      |     |           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
|--|------|-----|-----------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Homogenous Groups, alpha = .05000            |      |     |           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Error: Between MS = 15.413, df = 203.00      |      |     |           |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| Cell No.                                     | CEPA | HDS | %Col Mean | 1    | 2    | 3    | 4    | 5    | 6    | 7    | 8    | 9    | 10   | 11   | 12   |
| 7  | 3    | 48  | 41.9643   | **** |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 22   | 8    | 48  | 43.7500   | **** |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 1  | 1    | 48  | 53.3929   |      | **** |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 10   | 4    | 48  | 53.3929   |      | **** |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 25   | 9    | 48  | 55.3571   |      | **** | **** |      |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 16   | 6    | 48  | 59.2857   |      | **** | **** | **** |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 13   | 5    | 48  | 60.3571   |      | **** | **** | **** |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 19   | 7    | 48  | 62.6786   |      |      | **** | **** |      |      |      |      |      |      |      |      |
| 28   | 10   | 48  | 63.0357   |      |      |      | **** | **** |      |      |      |      |      |      |      |
| 4  | 2    | 48  | 63.7500   |      |      |      | **** | **** |      |      |      |      |      |      |      |
| 8  | 3    | 96  | 70.3571   |      |      |      |      | **** | **** |      |      |      |      |      |      |
| 23   | 8    | 96  | 71.4286   |      |      |      |      |      | **** | **** |      |      |      |      |      |
| 11   | 4    | 96  | 72.1429   |      |      |      |      |      | **** | **** |      |      |      |      |      |
| 2  | 1    | 96  | 73.7500   |      |      |      |      |      | **** | **** |      |      |      |      |      |
| 29   | 10   | 96  | 73.7500   |      |      |      |      |      | **** | **** |      |      |      |      |      |
| 5  | 2    | 96  | 75.5357   |      |      |      |      |      | **** | **** |      |      |      |      |      |
| 17   | 6    | 96  | 75.5357   |      |      |      |      |      | **** | **** |      |      |      |      |      |
| 26   | 9    | 96  | 75.8929   |      |      |      |      |      | **** | **** |      |      |      |      |      |
| 14   | 5    | 96  | 76.4286   |      |      |      |      |      | **** | **** |      |      |      |      |      |
| 20   | 7    | 96  | 78.0357   |      |      |      |      |      |      | **** | **** |      |      |      |      |
| 12   | 4    | 120 | 84.1071   |      |      |      |      |      |      |      | **** | **** |      |      |      |
| 18   | 6    | 120 | 84.4643   |      |      |      |      |      |      |      | **** | **** |      |      |      |
| 24   | 8    | 120 | 85.3571   |      |      |      |      |      |      |      | **** | **** | **** |      |      |
| 15   | 5    | 120 | 86.0714   |      |      |      |      |      |      |      |      | **** | **** |      |      |
| 9  | 3    | 120 | 87.3214   |      |      |      |      |      |      |      |      |      | **** | **** |      |
| 3  | 1    | 120 | 89.2857   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | **** | **** |
| 27   | 9    | 120 | 91.9643   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | **** |
| 6  | 2    | 120 | 95.5357   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | **** |
| 30   | 10   | 120 | 95.8929   |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | **** |
| 21   | 7    | 120 | 100.0000  |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      |      | **** |

En general el análisis indica que efectivamente existe diferencias significativas entre las cepas en presencia de *F. oxysporum*, aunque el comportamiento de todas las cepas es satisfactorio ante este agente causal, dado que todas las cepas lograron porcentajes de colonización superiores a 85%, sin embargo debe resaltarse el hecho de que la Cepa 7 fue la única que logró 100% de colonización al finalizar las 120 horas de evaluación (Figura 17).

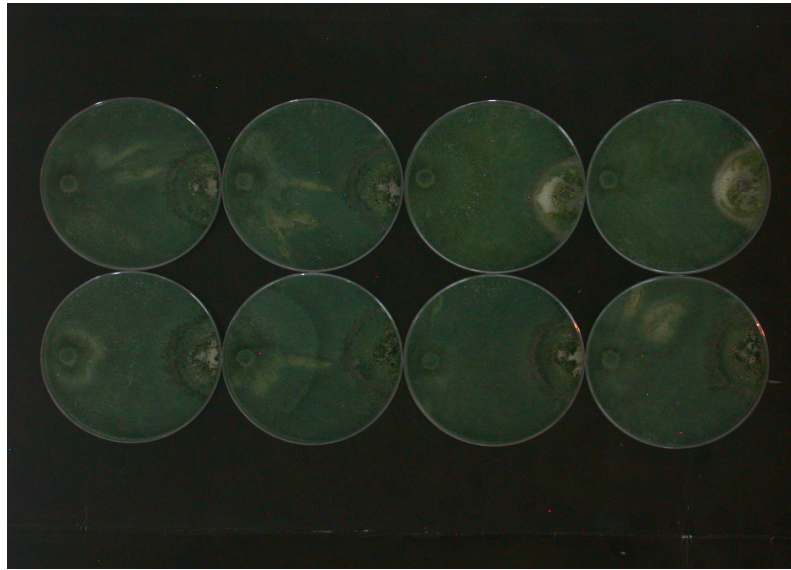


Figura 18. Fotografía de *Trichoderma* spp Cepa 7 en enfrentamiento dual contra *F. oxysporum* en la evaluación de las 120 horas.

Al comparar y analizar mediante un ANOVA similar al efectuado para los cultivos duales entre *Trichoderma* spp y *F. oxysporum*, pero en este caso para los testigos de *Trichoderma* spp, los cuales crecieron en placas de petri en medio PDA sin presencia de otro microorganismo se obtiene también que la interacción CEPA x HDS es estadísticamente significativa (apéndice 7).

En este caso se observa en la Figura 19, que el gráfico de interacción CEPA x HDS de *Trichoderma* spp creciendo solo, es bastante distinto del anterior, es decir *Trichoderma* spp creciendo en presencia de *F. oxysporum*, en términos prácticos a las 48 horas ya todas las cepas de *Trichoderma* spp habían logrado 100% de colonización del medio de cultivo, con la excepción de la Cepa 3 que solamente ha logrado en este tiempo 75% de colonización; lo cual concuerda con los resultados que se obtuvo de esta misma cepa en el cultivo dual y permite inferir que esta cepa es más lenta que las otras en la colonización inicial, pero que una vez establecida ejerce un buen antagonismo contra *F. oxysporum*, ya que en la comparación de medias la C7 al finalizar las 120 horas no es la que tiene menor % Col, sino que son otras cepas como la C6 y C4 que a pesar de colonizar rápidamente la placa petri, al final son las que obtienen los menores porcentajes de colonización en el enfrentamiento dual contra *F. oxysporum*.



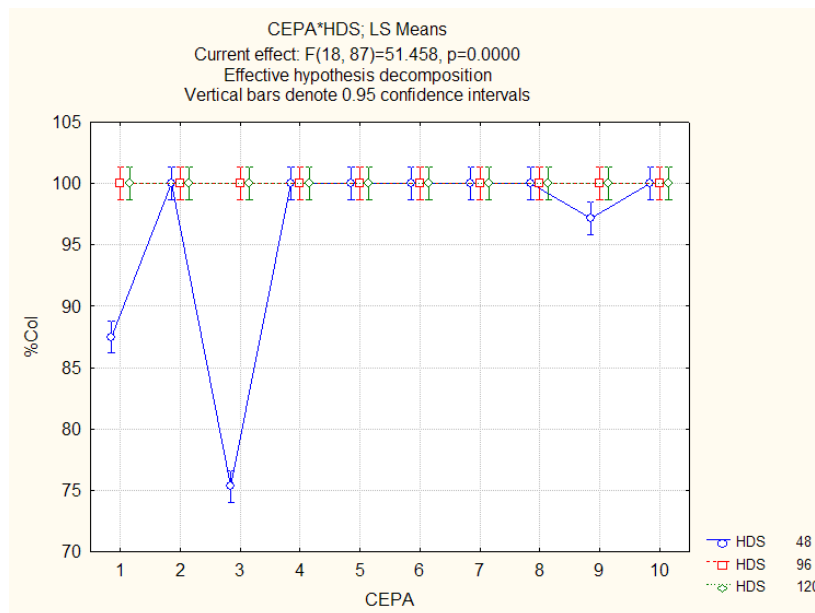


Figura 19. Comparación de medias para la interacción CEPAXHDS de cepas de *Trichoderma* spp que crecieron en medio agar dextrosa sin presencia de otro organismo.

Rifai (1996) citado por Mata (2005), señala que algunas especies del género *Trichoderma*, tienen tasas de crecimiento muy aceleradas lo cual es una característica deseada en los agentes biológicos, por lo que tienen la capacidad de colonizar en un menor tiempo el sustrato y ejercer una fuerte competencia por espacio y nutrientes frente a otros organismos en este caso *F. oxysporum* en los cultivo duales, por su parte Harman (2000), indica que los microorganismos antagonistas pueden producir enzimas líticas, metabolitos secundarios, para degradar las paredes celulares de los hongos con los que compite y de estar forma crear hiperparasitismo.

De conformidad con lo que indica Johnson *et al.* (1960) citado por Mata (2005), se observó en los cultivos duales no sólo zonas de inhibición de crecimiento micelial producto de metabolitos secundarios expresados por la cepa (Figuras 20 y 22) sino también con un intervalo de 95% de confianza que a las 60 HDS (Figura 21), *Trichoderma* spp inicia la colonización del medio de cultivo sobre áreas previamente colonizadas por *F. oxysporum*, pues el antagonista en ese momento mantiene un crecimiento lineal, mientras que *F. oxysporum* inicia su decrecimiento.

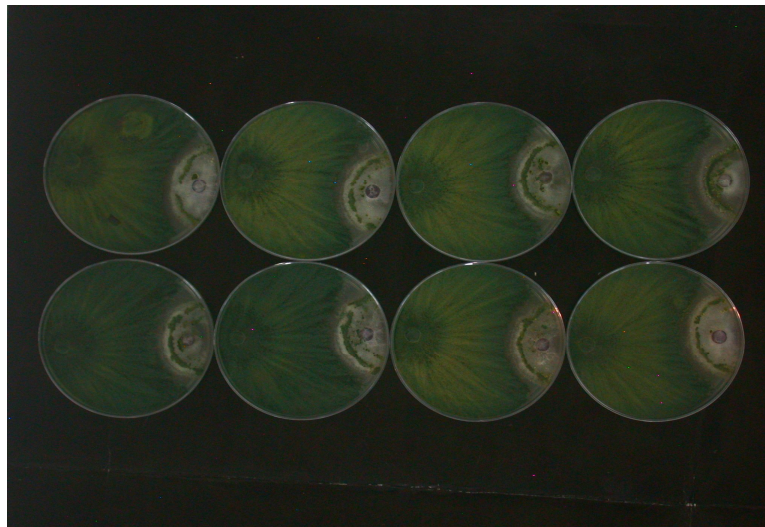


Figura 20. Inicio de la colonización de *Trichoderma* spp Ceba 5 de áreas previamente colonizadas por *F. oxysporum*, evaluación de las 60 HDS.

Es decir se desencadena una serie de mecanismos de acción tales como el micoparasitismo, donde básicamente en este caso *Trichoderma* ataca las hifas y estructuras reproductivas, además también puede atacar estructuras de resistencia (clamidosporas), de acuerdo a Lorito *et al.* (1998) esto se debe a enzimas como quitinasa y glucanas, de tal manera que se reduce el nivel de inóculo.

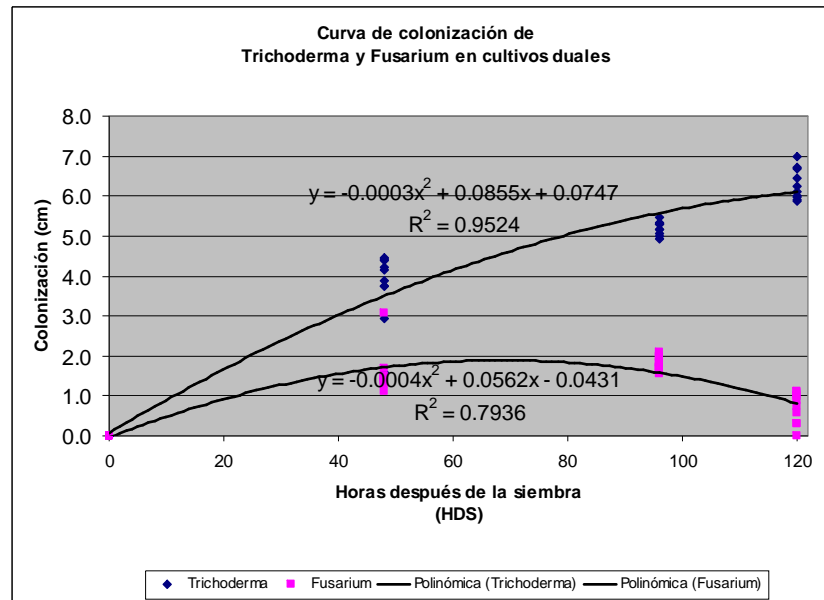


Figura 21. Curva de crecimiento general (cm/hora) de *Trichoderma* sp y *F. oxysporum* enfrentados bajo la técnica de cultivos duales.

Adicionalmente en la Figura 23 se muestra las ecuaciones polinomiales que explican con más de 95% de confianza el crecimiento en función del tiempo de cada

cepa de *Trichoderma* sp enfrentada en cultivo dual contra *F. oxysporum*, pues  $r^2 > 0.95$  en todos los casos. Si estas ecuaciones son utilizadas para proyectar los porcentajes de colonización por hora, en función de las 120 horas de medición finales, permite hacer la comparación gráfica (Figura 24) del comportamiento de cada cepa en la variable %Col/hra.

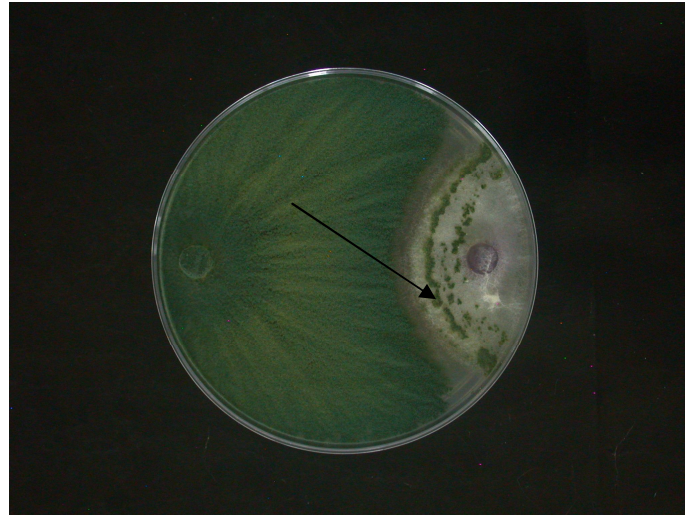


Figura 22. Colonización de *Trichoderma* spp Cepa 6 de áreas previamente colonizadas por *F. oxysporum*, evaluación de las 60 HDS.

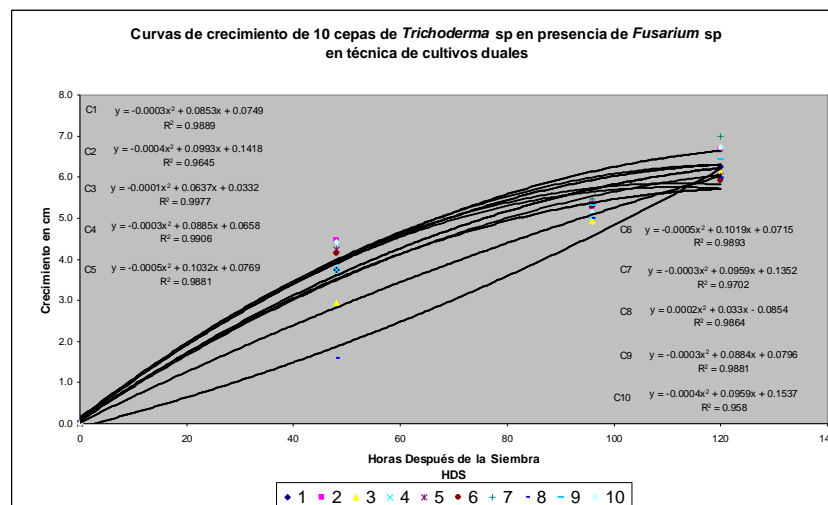


Figura 23. Curvas y ecuaciones de crecimiento polinomial para cada cepa de *Trichoderma* sp en presencia de *F. oxysporum*, enfrentados bajo la técnica de cultivos duales.

Lo anterior significa que las cepas de *Trichoderma* spp evaluadas en términos de medias generales colonizan una placa petri a razón de 0,67% por hora en presencia de *F. oxysporum*, logrando al final de 120 horas 100% de colonización, por

su parte *F. oxysporum*, lo hace a razón de 0,09%/hora, más de 86% más lento que *Trichoderma* spp, sin lograr colonizar toda la placa petri y por el contrario perdiendo toda su área colonizada durante las primeras 60 horas después del establecimiento del cultivo dual.

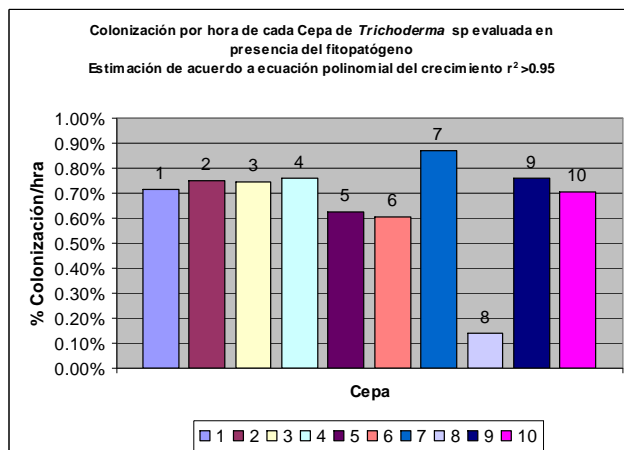


Figura 24. Porcentaje de colonización por hora de cada cepa de *Trichoderma* spp en presencia de *F. oxysporum*, enfrentados bajo la técnica de cultivos duales.

#### 4.5.2 Potencial fungistático de *Trichoderma* spp contra *F. oxysporum*

EL ANOVA generado muestra que el efecto de bloque es significativo (apéndice 8), mientras que el factor Cepa es altamente significativo, pero el segundo factor (tiempo expresado como DDS (días después de la siembra)) no es significativo, como tampoco la interacción de los factores, por lo que la comparación es válida desde el punto de vista estadístico únicamente para el factor Cepa.

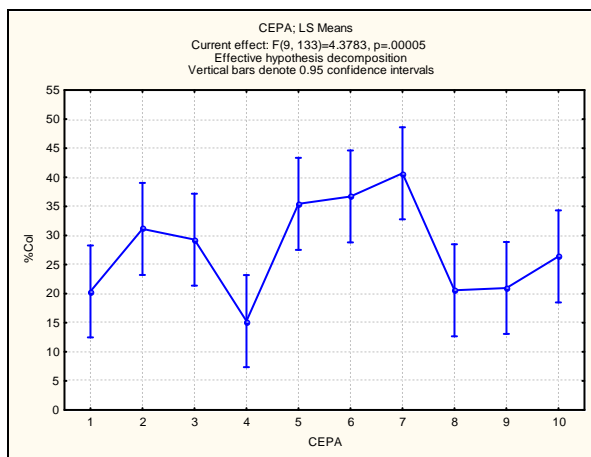


Figura 25. Comparación de medias en la variable porcentaje de colonización para el factor Cepa en la técnica de potencial fungistático de *Trichoderma* spp contra *F. oxysporum*.

La Figura 25 indica que existen diferencias entre las Cepas para la prueba de potencia fungistático, la comparación de medias (Cuadro 9) indica que el orden de mayor a menor inhibición del crecimiento en función de las cepas, es la siguiente:

$$C7 > C6, C5 > C2, C3, C10 > C9, C8, C1 > C4$$

Cuadro 9. Comparación de medias en la variable porcentaje de colonización para el factor Cepa en la técnica de potencia fungistático de *Trichoderma* spp contra *F. oxysporum*.

| Tukey HSD test; variable %Col (POTENCIAL FUNGISTATICO) |      |           |      |      |      |  |
|--|------|-----------|------|------|------|--|
| Homogenous Groups, alpha = .05000                      |      |           |      |      |      |  |
| Error: Between MS = 255.58, df = 133.00                |      |           |      |      |      |  |
| Cell No.   | CEPA | %Col Mean | 1    | 2    | 3    |  |
| 4  | 4    | 15.28407  | **** |      |      |  |
| 1  | 1    | 20.39737  | **** | **** |      |  |
| 8  | 8    | 20.58488  | **** | **** |      |  |
| 9  | 9    | 20.98560  | **** | **** |      |  |
| 10   | 10   | 26.41306  | **** | **** | **** |  |
| 3  | 3    | 29.29117  | **** | **** | **** |  |
| 2  | 2    | 31.13927  | **** | **** | **** |  |
| 5  | 5    | 35.45050  |      | **** | **** |  |
| 6  | 6    | 36.71458  |      | **** | **** |  |
| 7  | 7    | 40.69618  |      |      | **** |  |

De acuerdo a lo anterior se determinó que el comportamiento de las diferentes cepas para esta prueba también varía, es decir el porcentaje de inhibición de *F. oxysporum*, lo cual es debido a la producción de metabolitos secundarios volátiles que cada cepa tiene y que pueden provocar alteraciones en las hifas, formación de estructuras de resistencia así como en la patogenicidad del mismo (Manaco *et al.* 1997).

Los resultados obtenidos demuestran que los aislados nativos evaluados de *Trichoderma* spp ejerce una alta competencia y antagonismo contra el *F. oxysporum* aislado de plantas de piña provenientes de un lote infectado con el agente causal en la zona norte del país. De la misma forma se han descrito las condiciones que favorecen o propician el desarrollo de la enfermedad en campo, y derivadas de estas; existen varias estrategias o prácticas culturales que pueden ser empleadas para mitigar la aparición de brotes que se conviertan en fuentes de inóculo para el resto de

áreas de una finca, a saber; elección de suelos con buena estructura, adecuada preparación de terreno, buen manejo del drenaje, uso de semilla vigorosa y proveniente de lotes sanos, tratamiento de la semilla, uso de estimulantes de sistema radicular, buena fertilización, y cualquier otra práctica o tratamiento paliativo que favorezca un buen desarrollo radicular y plantación sana. Como complemento a esto se tiene que el uso de *Trichoderma* spp en inoculaciones al suelo durante la etapa de preparación de terreno y la etapa de plantación, podría ser una importante estrategia complementaria para la mitigación de esta enfermedad emergente como le llaman Obregón y Mata (2008).

Además del efecto biológico que tienen los dos únicos fungicidas registrados en el país para el cultivo de piña con efecto sobre *Fusarium* sp, así como algunos otros sin registro para el cultivo.

Lo anterior indica que es importante iniciar proyectos o actividades de transferencia de conocimiento sobre esta nueva enfermedad emergente del cultivo de la piña en Costa Rica, para evitar la contaminación de fincas sanas, mediante las distintas prácticas comunes que la pueden favorecer, como lo son el trasiego de semilla entre fincas y entre zonas del país. Así mismo evitar pérdidas de producción que afecte a los productores y la seguridad fitosanitaria general de la actividad en el país.

Como fase de campo podría iniciarse con el monitoreo de poblaciones nativas de microorganismos, mediante la implementación de monitoreos microbiológicos. Esta práctica trae implícitos dos objetivos. Por una parte conocer y mapear por lote la microbiología del suelo, de forma que permita inferir los posibles problemas fitopatológicos o bien fisiológicos que se pueden presentar en el cultivo y la definición de las posibles estrategias de mitigación; por ejemplo, suelos con altos contenidos de bacterias anaeróbicas (Cuadro 10), es necesario implementar prácticas culturales orientadas a favorecer la aireación del suelo, como lo son mejorar el drenaje, reducir la compactación mediante subsolado y otros.

Cuadro10. Niveles óptimos de ufc/gr de suelo.

| <b>Microorganismo</b> | <b>Ufc/gr de suelo</b>     |
|-----------------------|----------------------------|
| Bacterias aerobias    | 1 x 10 <sup>6</sup> mínimo |
| Bacterias anaerobias  | 1 x 10 <sup>4</sup> máximo |
| Actinomicetes         | 1 x 10 <sup>4</sup> mínimo |
| Levaduras             | 1 x 10 <sup>4</sup> máximo |
| Hongos                | 1 x 10 <sup>3</sup> mínimo |

Fuente: Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica.

Para suelos con altos contenidos de hongos fitopatógenos (>1x10<sup>3</sup> ufc/gr de suelo), implementar aplicaciones de organismos antagonistas como *Trichoderma* spp, teniendo como meta llegar a tener en estos suelos contenidos mínimos de 1 x 10<sup>3</sup> ufc/gr de suelo del antagonista.

Para conseguir lo anterior es importante conocer la población inicial de este hongo en el suelo, así como el de los fitopatógenos, ya que con esta herramienta se puede monitorear por una parte el aumento de las poblaciones del antagonista a través del tiempo y favorecido por las aplicaciones y por otra parte la reducción de los fitopatógenos producto de los procesos de competencia y micoparasitismo que ejerce el antagonista sobre ellos y que fueron descritos en este documento.

Conocer los contenidos iniciales de este tipo de microorganismos en el suelo previo a aplicaciones o inoculaciones sin duda ayuda a la toma de decisiones a cerca de la eficacia de los productos utilizados o bien a realizar pruebas de eficacia biológica a nivel de laboratorio contra aislados específicos de fitopatógenos de la finca, para determinar si existe una adecuada competencia del antagonista utilizado, o en su defecto tomar decisiones de sustitución del producto o cambiar de cepa.

La información suministrada de cada cepa sirve de base para realizar comparaciones objetivas de otras cepas de *Trichoderma* spp, que desee implementar el productor en su agroecosistema. Trabajos similares a éste, pueden desarrollarse para otros fitopatógenos de interés del cultivo de la piña o bien para otros cultivos y con esto hacer un aporte de conocimiento que sirva de base para la comparación de los diferentes productos que ofrece el mercado de insumos biológicos y también estimular la implementación de este tipo de alternativas limpias de producción.

## 5. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones en que se realizó esta investigación se concluye qué:

1. Se caracterizó morfológicamente *Fusarium* sp, agente causal de la muerte descendente del cultivo de la piña.
2. Molecularmente el diagnóstico de especie recibido por parte del laboratorio de la Universidad de Costa Rica fue *Fusarium oxysporum*.
3. Las pruebas de eficacia biológica realizadas con ingredientes activos diferentes, muestran que la técnica de discos impregnados no es recomendable para este tipo de ensayos, como sí lo es la técnica de medios enmendados.
4. Se considera que la información generada con cada molécula fitosanitaria es útil para definir los rangos de concentraciones a utilizar en nuevas investigaciones de eficacia biológica contra *F. oxysporum*.
5. Se encontró que el *F. oxysporum* para las dosis evaluadas estadísticamente es altamente sensible a los ingredientes activos carbendazim, methil thiophanato y spiroxamine, medianamente sensible para el difeconazol y pyraclostrobin y de baja sensibilidad para el bitertanol y el triadimefon.
6. Se encontró que aislados nativos del género *Trichoderma* spp controlan eficientemente a *F. oxysporum*, en los ensayos *In vitro* obteniendo resultados similares para ambas pruebas realizadas, cultivos duales y potencial fungistático.
7. Los resultados indican que de las diez cepas evaluadas estadísticamente la cepa 7 presenta los mejores resultados en cuanto a las características de buen biocontrolador porcentaje y velocidad de colonización y micoparasitismolas, las demás se ubican en posiciones intermedias, sin embargo en todas fue evidente la inhibición de *F. oxysporum*.
8. Se determinó que de acuerdo a la cepa es probable que se produzcan diferentes metabolitos secundarios volátiles que proveen diferencias en el control o inhibición del crecimiento de *F. oxysporum*.



## 6. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos se generan las siguientes recomendaciones:

1. Investigar las líneas base de los fungicidas evaluados carbendazim, methyl-thiophanato y spiroxamine, los cuales obtuvieron los mejores resultados de eficacia biológica.
2. Investigar dosis más bajas para el carbedazim, ya que la inferior estudiada aún ofrece 100% de control de *F. oxysporum* y el riesgo de resistencia temprana por sobre exposición al i. a es alta.
3. Realizar pruebas de residualidad y degradación a nivel de fruta con los mejores fungicidas evaluados, para una eventual necesidad de manejo de la resistencia a cero residuos.
4. Realizar investigaciones de eficacia biológica a nivel de campo con los fungicidas carbendazim, methyl-thiophanato y spiroxamine (estos dos últimos sin registro en Costa Rica para el cultivo de piña), pero todos con excelentes resultados de eficacia biológica a nivel de laboratorio, lo cual les confiere importancia en estrategias de manejo de resistencia a cero residuos.
5. Capacitar a los productores de piña del país en el conocimiento de esta nueva enfermedad emergente y todas las prácticas que pueden emplear para su mitigación.
6. Iniciar trabajos de monitoreos microbiológicos del suelo en fincas productoras de piña, orientadas a definir los contenidos naturales de los diferentes microorganismos de interés, tanto fitopatógenos como antagonistas.
7. Que las empresas del sector piñero establezcan monitoreos para cuantificar poblaciones nativas de *Trichoderma* spp en el suelo de su finca como herramienta para el seguimiento de la eficacia y establecimiento de este tipo de organismos en el suelo en caso de implementar aplicaciones de este tipo en su sistemas de producción.
8. Repetir los resultados obtenidos con la técnica de discos impregnados.

## 7. LITERATURA CONSULTADA

- Agrios, G.N. 2005. Plant pathology. 5<sup>a</sup>. British library cataloguing in publication data. 952 p.
- Azcón-Bieto, J; Talón, M. 2000. Fundamentos de fisiología vegetal. Barcelona, ES, McGraw-Hill Interamericana. 522 p.
- Bartholomew, DP; Paull, RE; Rohrbach, KG. eds. 2003. The pineapple: botany, production and uses. New York, US, CAB International. 301 p.
- Booth, C. 1977. *Fusarium*: laboratory guide to the identification of the major species. Surrey, Inglaterra. 57 p.
- Barahona, M; Sancho, E. 2000. Piña y papaya 3: fruticultura especial. San José, CR, UNED. 72 p.
- Carballo, M; Guharay, F. 2004. Control biológico de plagas agrícolas. Managua, NI, CATIE. 232 p.
- CNP (Consejo Nacional de Producción, CR). 2009. Análisis de mercado de pina. SIIM (Servicio de información e inteligencia de mercados). Mar.2009:14,30: 1-3.
- CNP (Consejo Nacional de Producción, CR). 2008. Subgerencia de desarrollo agropecuario. Sistema de información e inteligencia de mercados. 2008. Boletín 1, año 13. Piña fresca. San José, CR. 6 p.
- Dhingra, D; Sinclair, J. 1986. Basic Plant Pathology Methods. Boca Raton, Florida, United States, CRC Press, Inc. 354 p.
- FRAC, 2007. FRAC Code List: Fungicides sorted by mode of action (including FRAC Code numbering). FRAC. Florida, US. 10 p.
- International pineapple symposium. (6, 2007, Joao Pessoa, BR). 2007. Pineapple in Brazil: characteristics, research and perspectives. Matos Pires de, A; Haroldo, D; Reinhardt, C. Embrapa Cassava & Tropical Fruit. Joao Pessoa, BR. International society of horticultural sciences. 300 p.
- Haroldo, D; Silva, L da; Santos, J. 2000. Abacaxi produção: aspectos técnicos. Cruz das Almas, BR, EMBRAPA.77 p.

- Hernandez, A. 1999. Determinación, epidemiología y control de los patógenos fúngicos que afectan la fase de vivero en el cultivo de la piña. Tesis MSc. La Habana, CU, Universidad de la Habana. 54 p.
- Hernandez, A; Muiño, B; Martín, A. 2000. Epifitología de las enfermedades fúngicas presentes en la fase de viveros en el cultivo de la piña en Cuba. *Fitosanidad*. 4(1-2): 33-37.
- Hernandez, A; Sierra, A; Carr, A. 2006. Evaluación *in vitro* del antagonismo de especies de *Trichoderma* sobre hongos fitopatógenos que afectan las vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr)). *Fitosanidad* 10 (2): 104-108.
- International *Fusarium* and *Fusarium* genomics workshop (10, 2008, Alghero, IT). 2008. The causal agent of fusariosis on pineapple is genetically diverse in Brazil. Crespo, N; Ventura, J; Pfenning, L. *Journal of Plant Pathology*. 90 (3, supl.): S3.20. Solo resumen.
- International *Fusarium* and *Fusarium* genomics workshop (10, 2008, Alghero, IT). 2008. Pineapple fusariosis research in Brazil: Progress update. Ventura, J; Costa, H; Culik, M; Machado, P. *Journal of Plant Pathology*. 90 (3, supl.): S3.76. Solo resumen.
- International *Fusarium* and *Fusarium* genomics workshop (10, 2008, Alghero, IT). 2008. *Fusarium* identification databases, present and future. 2008. Geiser, S; Kang, S; O'Donnell, K. *Journal of Plant Pathology*. 90 (3, supl.): S3.12. Solo resumen.
- Harman, G. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. *Plant diseases*. 84: 377-393.
- Jiménez, JA. 1999. Cultivo de la piña: Manual práctico para el cultivo de la piña de exportación. San José, CR, Editorial Tecnológica de Costa Rica. 224 p.
- Johnson, L; Curl, E; Bond, J; Fribourg, H. 1960. Methods for studying soil microflora plant disease relationships. 2 ed. Minneapolis. Burgess Publishing Company. P 54 – 64.
- Lorito, M. 1998. Chitinolytic enzymes and their genes. In. *Trichoderma* and *Gliocladium*, Eds Kubicek, CP. And Harman, GE. London, Taylor and Francis. 2v, 392 p.
- Mata, X. 2005. Combate biológico de la pudrición acuosa blanda *Sclerotinia sclerotium* (Lib de Bary) en lechuga (*Lactuca sativa* L.) mediante el uso del hongo antagónico *Trichoderma viride* Pers ex SF Gray. Tesis Lic. Turrialba, CR. Universidad de Costa Rica. 81 p.
- Malézieux, E; Cote, F; Bartholomew, DP. 2003. Crop environment, plant growth and physiology. In Bartholomew, D.P; Paull, R.E; Rohrbach, K.G. eds. The pineapple: botany, production and uses. New York, US, CAB International. 301 p.

- Moreno T, H. 1991. El Agua en las planta: relaciones hídricas. Heredia, CR, EUNA. 99 p.
- Muiño, B; Hernandez, A; Porras, A. 2000. Sensibilidad de especies de hongos fitopatógenos a los inhibidores de la biosíntesis de ergosterol (IBE). Fitosanidad. 4(3-4): 45-48.
- Congreso Mundial de Trichoderma (10, 2008, San José, CR). 2008. Enfermedades emergentes en el cultivo de la piña. 2008. Obregón, M; Mata, X. Memoria. 86 p. Solo resumen.
- Páez, M; Alcano, M; Albarracin, N de; Arcia, As. 2001. Memoria XVII Congreso Venezolano de Fitopatología (en línea). Maracay, Venezuela. Consultado 19 oct. 2008. Disponible en <http://www.fundacite.org.gov.ve/proyectos/proyecto2.shtml?codigo=1054>
- Pires, A; Fritsons, N; Silva, LF da; Teixeira, FA; Júnior, JE. 2007. Manual de identificação de pragas, doenças e deficiências nutricionais na cultura do abacaxi. Cruz das Almas, BR, EMBRAPA. 41 p.
- Ploetz, RC; Zentmyer, GA; Nishijima, WT; Rohrbach, KG; Ohr, HD. eds. 1998. Compendium of tropical fruit diseases. Minnesota, US, The American Phythological Society. p 47-50.
- Py, C; Lacoeyulhe, J; Teisson, C. 1987. The pineapple: cultivation and uses. Trad. D Goodfellow. Paris, FR, Editions G.-P. Maisonneuve and Larose. 568 p.
- Rifai, M. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. Mycological papers, Nº 116.
- Rivera, C. 1999. Conceptos introductorias a la fitopatología. San José, C.R. EUNED. 336 p.
- Salisbury, FB; Parke, RV. 1968. Las plantas vasculares: forma y función. Trad. R Riba; N Esparza. Mexico, DF, Herrero Hermanos Sucesores. 198 p. (Serie Fundamentos de la Botánica).
- Simpósio Internacional do abacaxi. (6, 2007, João Pessoa, Paraíba). 2007. Controle alternativo da fusariose do abacaxi. Carballo, R; Oliveira, E de; Lacerda, J de; Neto, M; Araújo, J de: memórias. Paraíba, BR, EMBRAPA. sp. Solo resumen.
- Summerell, B; Salleh, B; Leslie, J. 2003. A utilitarian approach to *Fusarium* identification. Plant disease. 87 (2): 117-128.

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

Taiz, L; Zeiger, E. 2006. Fisiología Vegetal. 3ra ed. Universidad Jaume. Valencia, ES. 1907 p.

Valerín, M. 1994. Lista de enfermedades de los cultivos agrícolas de Costa Rica. San José, CR. MAG. 80 p.

VII Congreso Nacional de Fitopatología. (2008, San José, CR). Enfermedades emergentes en el cultivo de la piña. Obregón, M; Mata, X. 1 disco compacto, 8mm.

## 8. APENDICE

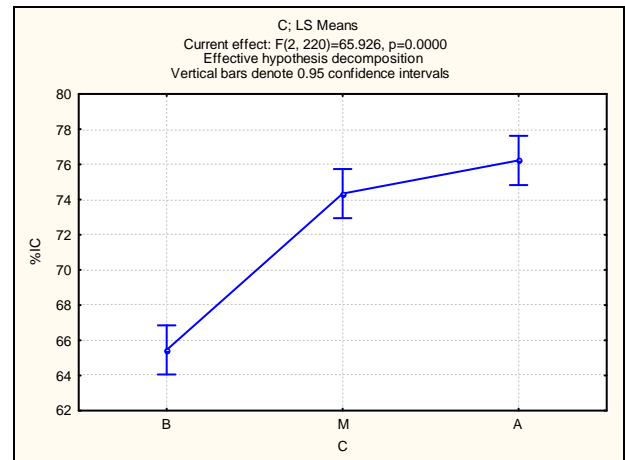
Apéndice 1. ANOVA trifactorial con subparcelas divididas en bloques, para la técnica de médios enmendados.

| Custom Univariate Tests of Significance for %IC (MEDIOS ENMENDADOS) |          |                  |          |          |      |
|---|----------|------------------|----------|----------|------|
| Error based on: R*A*B   |          |                  |          |          |      |
| Effective hypothesis decomposition                                  |          |                  |          |          |      |
| Effect  | SS       | Degr. of Freedom | MS       | F        | p    |
| B   | 62130.87 | 2                | 31065.44 | 653.6537 | 0.00 |
| A*B   | 47565.42 | 12               | 3963.78  | 83.4027  | 0.00 |
| R*A*B   | 2851.55  | 60               | 47.53    |          |      |

| Custom Univariate Tests of Significance for %IC (MEDIOS ENMENDADOS) |          |                  |          |          |          |
|---|----------|------------------|----------|----------|----------|
| Error based on: R*A   |          |                  |          |          |          |
| Effective hypothesis decomposition                                  |          |                  |          |          |          |
| Effect  | SS       | Degr. of Freedom | MS       | F        | p        |
| R   | 171.7    | 5                | 34.33    | 0.3536   | 0.875836 |
| A   | 269797.7 | 6                | 44966.28 | 463.1437 | 0.000000 |
| R*A   | 2912.7   | 30               | 97.09    |          |          |

| Univariate Results for Each DV (MEDIOS ENMENDADOS) |                  |         |         |          |          |
|--|------------------|---------|---------|----------|----------|
| Sigma-restricted parameterization                  |                  |         |         |          |          |
| Effective hypothesis decomposition                 |                  |         |         |          |          |
| GENERAL Effect                                     | Degr. of Freedom | %IC SS  | %IC MS  | %IC F    | %IC p    |
| Intercept  | 1                | 1959851 | 1959851 | 30982.61 | 0.000000 |
| R  | 5                | 172     | 34      | 0.54     | 0.743765 |
| A  | 6                | 269798  | 44966   | 710.86   | 0.000000 |
| R*A  | 30               | 2913    | 97      | 1.53     | 0.043883 |
| B  | 2                | 62131   | 31065   | 491.10   | 0.000000 |
| A*B  | 12               | 47565   | 3964    | 62.66    | 0.000000 |
| R*A*B  | 60               | 2852    | 48      | 0.75     | 0.904524 |
| C  | 2                | 8341    | 4170    | 65.93    | 0.000000 |
| A*C  | 12               | 14535   | 1211    | 19.15    | 0.000000 |
| B*C  | 4                | 3494    | 874     | 13.81    | 0.000000 |
| A*B*C  | 24               | 10499   | 437     | 6.92     | 0.000000 |
| Error  | 220              | 13916   | 63      |          |          |
| Total  | 377              | 436215  |         |          |          |

| Tukey HSD test; variable %IC (MEDIOS ENMENDADOS) |   |          |      |      |      |
|--|---|----------|------|------|------|
| Homogenous Groups, alpha = .05000                |   |          |      |      |      |
| Error: Between MS = 63.256, df = 220.00          |   |          |      |      |      |
| Cell No.   | C | %IC Mean | 1    | 2    |      |
| 1  | B | 65.45234 | **** |      |      |
| 2  | M | 74.33891 |      | **** |      |
| 3  | A | 76.22524 |      |      | **** |



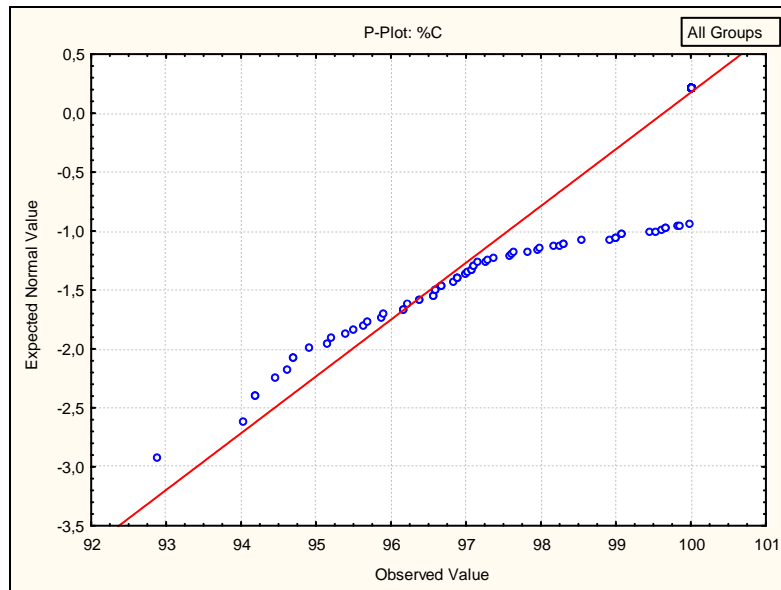
Apéndice 2. Comparación de medias para el factor C (dosis evaluada) de medios enmendados.

Apéndice 3. ANOVA trifactorial con subparcelas divididas en bloques, para la técnica de discos impregnados con los fungicidas evaluados para el control de *F. oxysporum*.

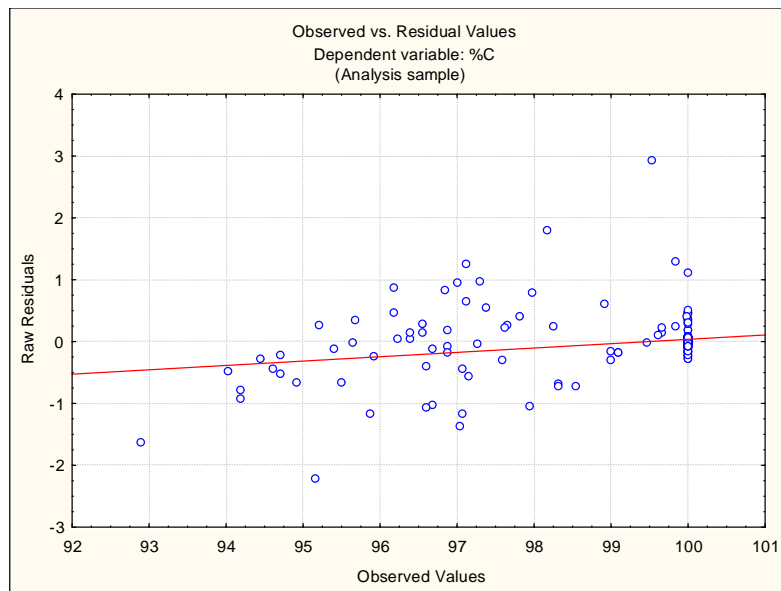
| Custom Univariate Tests of Significance for %C (DISCOS IMPREGNADOS)<br>Error based on: R*A<br>Effective hypothesis decomposition |          |                  |          |          |          |
|--|----------|------------------|----------|----------|----------|
| Effect   | SS       | Degr. of Freedom | MS       | F        | p        |
| R  | 3,8500   | 5                | 0,76999  | 1,4818   | 0,225108 |
| A  | 534,3124 | 6                | 89,05206 | 171,3795 | 0,000000 |
| R*A  | 15,5886  | 30               | 0,51962  |          |          |

| Custom Univariate Tests of Significance for %C (DISCOS IMPREGNADOS)<br>Error based on: R*A*B<br>Effective hypothesis decomposition |          |                  |          |          |          |
|--|----------|------------------|----------|----------|----------|
| Effect   | SS       | Degr. of Freedom | MS       | F        | p        |
| B  | 0,751683 | 2                | 0,375841 | 4,492575 | 0,015201 |
| A*B  | 2,031165 | 12               | 0,169264 | 2,023275 | 0,037432 |
| R*A*B  | 5,019499 | 60               | 0,083658 |          |          |

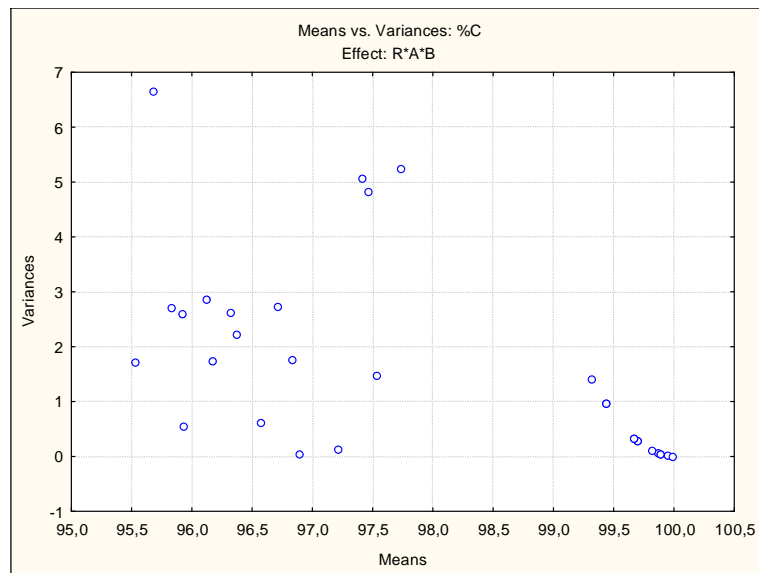
| Univariate Results for Each DV (DISCOS IMPREGNADOS)<br>Sigma-restricted parameterization<br>Effective hypothesis decomposition |                  |         |         |          |          |
|--|------------------|---------|---------|----------|----------|
| GENERAL Effect   | Degr. of Freedom | %C SS   | %C MS   | %C F     | %C p     |
| Intercept  | 1                | 3740859 | 3740859 | 17646537 | 0,000000 |
| R  | 5                | 4       | 1       | 4        | 0,003539 |
| A  | 6                | 534     | 89      | 420      | 0,000000 |
| R*A  | 30               | 16      | 1       | 2        | 0,000109 |
| B  | 2                | 1       | 0       | 2        | 0,172252 |
| A*B  | 12               | 2       | 0       | 1        | 0,651880 |
| R*A*B  | 60               | 5       | 0       | 0        | 0,999976 |
| C  | 2                | 10      | 5       | 23       | 0,000000 |
| A*C  | 12               | 40      | 3       | 16       | 0,000000 |
| B*C  | 4                | 0       | 0       | 0        | 0,776256 |
| A*B*C  | 24               | 4       | 0       | 1        | 0,719018 |
| Error  | 220              | 47      | 0       |          |          |
| Total  | 377              | 663     |         |          |          |



Apéndice 4. Gráfico de calificaciones normales que evalúa el supuesto de normalidad para del ANOVA trifactorial con subparcelas divididas en bloques, en la técnica de discos impregnados. No se cumple el supuesto de normalidad ya que la línea de puntos no es paralela a la línea de normalidad.



Apéndice 5. Gráfico de residuos contra los valores observados que evalúa el supuesto de errores independientes para el ANOVA trifactorial con subparcelas divididas en bloques, en la técnica de discos impregnados. No se cumple el supuesto de errores independientes ya que la nube de puntos si tiene un patrón definido y tiende a crecer.



Apéndice 6. Gráfico de la varianza contra los valores observados que evalúa el supuesto de homocedasticidad o varianzas homogéneas para el ANOVA trifactorial con subparcelas divididas en bloques, en la técnica de discos impregnados. No se cumple el supuesto de homocedasticidad ya que se observa que hay bastante diferencia en la magnitud de las varianzas.



Apéndice 7. ANOVA bifactorial en bloques, comparando el % de colonización de cepas de *Trichoderma* sp, en enfrentamiento dual con *Fusarium oxysporum*.

| GENERAL Effect | Univariate Results for Each DV (CULTIVO DUAL CT)<br>Sigma-restricted parameterization<br>Effective hypothesis decomposition |         |         |          |          |
|----------------|---|---------|---------|----------|----------|
|                | Degr. of Freedom  | %Col SS | %Col MS | %Col F   | %Col p   |
| Intercept      | 1   | 1168213 | 1168213 | 661261.8 | 0.000000 |
| BLOQUE         | 3   | 2       | 1       | 0.3      | 0.800687 |
| CEPA           | 9   | 818     | 91      | 51.5     | 0.000000 |
| HDS            | 2   | 427     | 213     | 120.8    | 0.000000 |
| CEPA*HDS       | 18  | 1636    | 91      | 51.5     | 0.000000 |
| Error          | 87  | 154     | 2       |          |          |
| Total          | 119   | 3037    |         |          |          |

Apéndice 8. ANOVA bifactorial en bloques, comparando el % de inhibición del crecimiento que cepas de *Trichoderma* sp, ejercen contra *F. oxysporum* en la técnica de potencial fungistático.

| GENERAL Effect | Univariate Results for Each DV (POTENCIAL FUNGISTATICO)<br>Sigma-restricted parameterization<br>Effective hypothesis decomposition |          |          |          |          |
|----------------|--|----------|----------|----------|----------|
|                | Degr. of Freedom   | %Col SS  | %Col MS  | %Col F   | %Col p   |
| Intercept      | 1  | 122728.0 | 122728.0 | 480.1928 | 0.000000 |
| BLOQUE         | 7  | 4357.8   | 622.5    | 2.4358   | 0.022186 |
| CEPA           | 9  | 10071.1  | 1119.0   | 4.3783   | 0.000051 |
| DDS            | 1  | 279.6    | 279.6    | 1.0939   | 0.297497 |
| CEPA*DDS       | 9  | 1890.4   | 210.0    | 0.8218   | 0.597075 |
| Error          | 133  | 33992.2  | 255.6    |          |          |
| Total          | 159  | 50591.1  |          |          |          |



Apéndice 9. Condiciones de compactación de suelo que favorecen la incidencia de *F. oxysporum*.



Apéndice 10. Condiciones de oxidación – reducción del suelo debido a niveles freáticos altos e inadecuada preparación del terreno que favorecen la incidencia de *F. oxysporum*.



Apéndice 11. Condición de nivel freático alto que favorece la incidencia de *F. oxysporum*.

Apéndice 12. Límites máximos de residuos (LMR) en el cultivo de piña para los ingredientes activos investigados en los mercados de Estados Unidos, Comunidad Europea y Reino Unido.

| INGREDIENTES ACTIVOS |                    | TOLERANCIAS (LMR) ppm |     |       |       |       |
|----------------------|--------------------|-----------------------|-----|-------|-------|-------|
| Grupo Químico        | Ingrediente Activo | CODEX                 | USA | UK    | CE    | Anexo |
| Benzimidazol         | Carbendazim        | 5.0                   | -   | 0.1*  | 0.1*  | 2     |
| Triazol              | Bitertanol         | -                     | -   | 0.05* | 0.05* | 2     |
| Spiroketalamina      | Spiroxamine        | -                     | -   | 0.05* | 0.05* | 2     |
| Estrobirulina        | Pyraclostrobin     | -                     | -   | 0.02* | 0.02* | 2     |
| Triazol              | Difenoconazole     | -                     | -   | 0.1   | 0.1   | 3a    |
| Triazol              | Triadimefon        | 2.0                   | 2.0 | 3.0   | 3.0   | 2     |
| Carbamato            | Metil-Thiophanato  | 5.0                   | -   | 0.1*  | 0.1*  | 2     |

\*Límite de detección

Fuente:

PSD database

- Base de datos de la PSD (Pesticide Safety Directorate)
- <https://secure.pesticides.gov.uk/MRLs>

USDA MRL database

- International Maximum Residue Limit Database (FAS online)
- <http://www.mrldatabase.com/>

European Commission

- Maximum pesticide levels for food products for human consumption and animal feedingstuffs
- [http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/index\\_en.htm](http://ec.europa.eu/food/plant/protection/pesticides/index_en.htm)