

**ESTUDIO DE LA ETIOLOGÍA DE LA NECROSIS FOLIAR
(CHASPARRIA) EN *Cycas revoluta* Thunb. Y EVALUACIÓN DE
ESTRATEGIAS PARA EL MANEJO DE LA ENFERMEDAD**

MARYLIN SÁNCHEZ VALVERDE

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**

2015

**ESTUDIO DE LA ETIOLOGÍA DE LA NECROSIS FOLIAR
(CHASPARRIA) EN *Cycas revoluta* Thunb. Y EVALUACIÓN DE
ESTRATEGIAS PARA EL MANEJO DE LA ENFERMEDAD**

MARYLIN SÁNCHEZ VALVERDE

Aprobado por los miembros del Tribunal Evaluador:

Ing. Agr. Zulay Castro Jiménez, MGA.

Asesor

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

Asesor

Ing. Agr. Parménides Furcal Beriguete, M.Sc.

Jurado

Ing. Agr. Oscar Arias Moreira, Ph.D.

Jurado

Ing. Agr. Carlos Ramírez Vargas, Ph.D.

Coordinador
Trabajos Finales de Graduación

Ing. Agr. Alberto Camero Rey, MSc.

Director
Escuela de Agronomía
Tecnológico de Costa Rica

2015

DEDICATORIA

A Dios y a la Virgen, que me refugiaron en los momentos más difíciles durante mis años de carrera.

A mis padres y hermanos porque nunca dejaron de creer en mi capacidad y siempre me apoyaron para seguir adelante.

A mi asesor externo Mauricio Guzmán quien me brindó ayuda, conocimiento y motivación para la realización de la presente investigación.

A todos los que creyeron en mí...

*“Nunca es tarde para comenzar de nuevo...
sólo hace falta un cambio de actitud”*

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres Marta Valverde y Pedro Sánchez, por haberme dado una segunda oportunidad y ayuda económica suficiente para concluir mi carrera y dejar que cumpliera mis metas.

A mi asesor externo, el Ingeniero Mauricio Guzmán Quesada que es un ejemplo de profesional dedicado, le doy gracias por motivarme siempre para seguir adelante y despertar en mí la pasión por la investigación.

A don Oscar Arias Moreira, quien financió la mayor parte de la investigación, por el apoyo y el interés mostrado; al personal de campo en la finca Hacienda R y R, así como a don Armando Bonilla, administrador de la finca, de quien aprendí mucho sobre la producción de *Cycas revoluta* y siempre estuvo atento con una gran sonrisa para ayudarme en lo que necesitara.

Al personal de Corbana S.A, por la ayuda brindada en el Laboratorio de Fitopatología y Biología Molecular en la etapa de laboratorio y estudios moleculares.

A los profesores de la Escuela de Agronomía del TEC: Zulay Castro y Parménides Furcal, por la ayuda durante el proceso. A Xiomara Mata e Ingrid Varela por el préstamo de equipo en laboratorios de Fitopatología y Nematología respectivamente, así como del invernadero a cargo del laboratorio de Biotecnología del TEC San Carlos dirigido por Wyner Montero.

A mis excelentes amigos que ya son ingenieros, Generación 2003: Claudiana Carr, Jennifer Monge, Keiner Araya, Alex Ramírez y Pablo Zúñiga; que han sido mis hermanos durante más de once años, siempre me apoyaron y creyeron en mí cuando regresé al TEC.

A mis siete queridos amigos de la Generación 2009: Alfredo Zamora, Fernán Paniagua, José Javier Rojas, Johan Murillo, Karla Chacón, Gustavo Pereira y Oscar Castro; por estar siempre disponibles y brindarme su amistad.

A todos los demás amigos y profesores del TEC San Carlos.

Gracias...

TABLA DE CONTENIDOS

| | |
|---|----------|
| TABLA DE CONTENIDOS..... | ii |
| LISTA DE CUADROS | v |
| LISTA DE FIGURAS | vii |
| LISTA DE CUADROS ANEXO | xii |
| RESUMEN..... | xiv |
| ABSTRACT..... | xv |
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 1.1 Antecedentes | 1 |
| 1.2 Justificación..... | 3 |
| 1.3 Objetivo General | 4 |
| 1.4 Objetivos Específicos | 4 |
| 1.5 Hipótesis de investigación..... | 5 |
| 2. REVISIÓN DE LITERATURA | 6 |
| 2.1 Generalidades de las cicas | 6 |
| 2.3 Principales problemas que afectan al cultivo de <i>Cycas revoluta</i> | 7 |
| 2.3.1 Necrosis foliar o chasparria..... | 7 |
| 2.3.1.1 <i>Colletotrichum</i> sp. | 8 |
| 2.3.1.2 <i>Fusarium</i> sp. | 10 |
| 2.3.1.3 <i>Pestalotiopsis</i> sp. | 11 |
| 2.3.2 Escama <i>Aulacaspis yasumatsui</i> | 12 |
| 2.3.3 Deficiencia de Manganeso (Mn) - desbalance Fe:Mn | 12 |
| 2.3.4 Nematodos..... | 13 |
| 2.4 Estrategias de manejo agronómico..... | 13 |
| 2.4.1 Control químico - fungicidas..... | 13 |

| | | |
|-----------|---|-----------|
| 2.4.2 | Control cultural – fertilización | 15 |
| 2.4.2.1 | Calcio (Ca) | 15 |
| 2.4.2.2 | Magnesio (Mg) | 16 |
| 2.4.2.3 | Silicio (Si) | 17 |
| 2.4.3 | Control físico | 18 |
| 2.5.3.1 | Poda sanitaria | 18 |
| 2.5.3.2 | Aplicación de ácido acético como anti-esporulante | 19 |
| 3. | MATERIALES Y MÉTODOS..... | 20 |
| 3.1 | Localización | 20 |
| 3.2 | Etapas de la investigación..... | 20 |
| 3.2.1 | Etapa I. Determinación del ritmo de emisión foliar de <i>C. revoluta</i> en invernadero y elaboración de escala fotográfica de principales fases de desarrollo de la hoja. | 21 |
| | I A. Ritmo de emisión foliar | 21 |
| | I B. Escala fotográfica de las principales fases de desarrollo de la hoja..... | 22 |
| 3.2.2 | Etapa II. Identificación del agente causal de la chasparria en <i>Cycas revoluta</i> y la fase de desarrollo de la hoja más susceptible a la infección por patógenos..... | 22 |
| | II A. Identificación del agente causal..... | 22 |
| | II B. Fase de desarrollo de la hoja más susceptible a la infección por patógenos y lesiones más frecuentes en cada fase | 26 |
| | II C. Análisis de sensibilidad in vitro a fungicidas..... | 26 |
| 3.2.3 | Etapa III. Elaboración de escala de severidad de la enfermedad y evaluación en campo del efecto de estrategias para el manejo de la chasparria en <i>Cycas revoluta</i> | 29 |
| | III A. Escala de severidad de la enfermedad | 29 |
| | III B. Evaluación de ácido acético como antiesporulante y programa de rotación de fungicidas convencionales - no convencionales..... | 29 |
| | III C. Evaluación de la nutrición foliar..... | 31 |

3.2.4 Elaboración de manual informativo referente al cultivo de *C. revoluta*. 32

| | |
|---|-----------|
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 33 |
| 4.1 Etapa I. Determinación del ritmo de emisión foliar en <i>Cycas revoluta</i> y elaboración de escala fotográfica de principales fases de desarrollo de la hoja. | 33 |
| I A. Ritmo de emisión foliar | 33 |
| I B. Escala fotográfica de las principales fases de desarrollo de la hoja..... | 37 |
| 4.2 Etapa II. Identificación del agente causal de la chasparria en <i>Cycas revoluta</i> y la fase de desarrollo de la hoja más susceptible a la infección por patógenos..... | 40 |
| II A. Identificación del agente causal..... | 40 |
| II B. Fase de desarrollo de la hoja más susceptible a la infección..... | 53 |
| II C. Análisis de sensibilidad <i>in vitro</i> a fungicidas..... | 57 |
| 4.3 Etapa III. Elaboración de escala diagramática de severidad de la enfermedad y evaluación de estrategias para el manejo de la chasparria en <i>Cycas revoluta</i> | 66 |
| III A. Escala diagramática de la enfermedad | 66 |
| III B. Evaluación de la rotación convencional y no convencional de fungicidas con aplicaciones de ácido acético extra como anti-esporulante. | 68 |
| III C. Evaluación de la nutrición foliar..... | 70 |
| 4.4 Manual informativo sobre <i>Cycas revoluta</i> | 73 |
| 5. CONCLUSIONES | 75 |
| 6. RECOMENDACIONES | 77 |
| 7. BIBLIOGRAFÍA | 78 |
| ANEXOS | 86 |

LISTA DE CUADROS

| Cuadro | Título | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Clasificación de los grupos químicos según riesgo de desarrollar resistencia. | 15 |
| 2 | Variaciones en la metodología utilizada en las inoculaciones para determinar un protocolo para <i>C. proteae</i> en <i>Cycas revoluta</i> . Etapa II, ITCR 2014. | 24 |
| 3 | Productos utilizados para las pruebas de sensibilidad <i>in vitro</i> a fungicidas protectantes y sistémicos. Etapa II, ITCR 2014. | 26 |
| 4 | Preparación de cuatro soluciones madre en agua, a diferentes concentraciones (1 - 1000 mg L ⁻¹). Etapa II, CORBANA S.A 2014. | 27 |
| 5 | Preparación de cinco concentraciones de fungicida a partir de las soluciones madre obtenidas. Etapa II, CORBANA S.A 2014. | 28 |
| 6 | Descripción de los tratamientos aplicados para la evaluación del efecto del ácido acético y dos programas de rotación de fungicidas como estrategia para el manejo de la chasparria en <i>C. revoluta</i> . Etapa III, Los Chiles 2014. | 30 |
| 7 | Tratamientos del experimento efecto de la fertilización foliar en la severidad de la chasparria en <i>C. revoluta</i> en condiciones de campo. Etapa III, Los Chiles 2014. | 32 |
| 8 | Resultado de la Prueba de Medias LSD Fisher (5%), de las variables Longitud y Ancho de la hoja comparando dos grupos de plantas de <i>C. revoluta</i> . Etapa I, ITCR 2014. | 34 |

| | | |
|----|--|----|
| 9 | Variables obtenidas a partir de las observaciones de emisión foliar durante 10 meses. Etapa I, ITCR 2014. | 36 |
| 10 | Identificación taxonómica ¹ de hongos aislados de las lesiones categorizadas como A, B, C, D y E-F y el % de confiabilidad. Etapa II, CORBANA S.A 2014. | 43 |
| 11 | Resultados de la prueba de medias LSD Fisher (5%) del diámetro de crecimiento micelial para los fungicidas protectantes evaluados a nivel <i>in vitro</i> . Etapa II, ITCR 2014. | 58 |
| 12 | Porcentaje de inhibición en el crecimiento de la colonia de <i>C. proteae</i> según pruebas de sensibilidad in vitro a ingredientes activos de fungicidas protectantes. Etapa II, ITCR 2014. | 59 |
| 13 | Resultados provenientes de la Prueba de Medias LSD Fisher 5% para el diámetro de la colonia de <i>C. proteae</i> según Ingredientes activos sistémicos en diferentes concentraciones. Etapa II, ITCR 2014. | 62 |
| 14 | Porcentaje de inhibición en el crecimiento de la colonia de <i>C. proteae</i> en pruebas de sensibilidad in vitro a fungicidas sistémicos. Etapa II, ITCR 2014. | 63 |
| 15 | Resultados del cálculo de la Concentración Efectiva para inhibir el 50% (EC ⁵⁰) crecimiento micelial, categorizados según Edgington <i>et al.</i> (1971). | 64 |
| 16 | Tabla de medias Índice de Severidad calculada en cada muestreo. Etapa IIIB, Los Chiles 2014. | 69 |
| 17 | Valores índice de severidad obtenida en los muestreos realizados en campo para el experimento IIIC. | 71 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Título | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | A. Planta de <i>C. revoluta</i> . B. Ilustración de la forma del margen revoluta de las hojas. C. Hoja nueva con margen revoluta. | 7 |
| 2 | Chasparria en <i>C. revoluta</i> ; lesiones comunes en campo. Alajuela, Los Chiles 2014. | 8 |
| 3 | Estructuras asexuales reproductivas del hongo. A. Acérvulo de <i>Colletotrichum</i> sp. Formado por conidióforos que forman conidios. B. Conidióforo y conidio. C. Conidios al microscopio 40x. | 10 |
| 4 | A. Micelio de fusarium compuesto por conidióforos y conidios en conjunto. B. Tipos de macro y microconidios presentes en <i>Fusarium</i> sp. C. Conidios de <i>Fusarium</i> sp | 10 |
| 5 | A. Estructuras sexuales y asexuales reproductivas de <i>Pestalotiopsis</i> sp. B. Conidios flagelados de <i>Pestalotiopsis foedans</i> . | 11 |
| 6 | Plantas de <i>C. revoluta</i> infectadas por escamas <i>Aulacaspis yasumatsui</i> , vista desde distintas perspectivas, nótese como envuelve el pedúnculo y los foliolos de la hoja hasta dejarlo color blanco. | 12 |
| 7 | Efecto de la poda sanitaria sobre plantas de <i>C. revoluta</i> . A. Planta afectada por la chasparria. B. Planta después de realizada la poda sanitaria. C. Recolección del inóculo en sacos para no distribuir el patógeno en el campo. Alajuela, Los Chiles 2013. | 19 |
| 8 | A. Cámara de humedad, tamaño 70 x 40 x 40 cm. B. Cuatro plantas inoculadas y humedecidas por medio de aspersión de agua con atomizador manual. Etapa II, ITCR 2014. | 25 |

| | | |
|----|--|----|
| 9 | A. Cámara de humedad mejorada con microaspersores. B. con un sensor de humedad relativa- temperatura. C. Cámara húmeda con dimensiones de 120 x 70 x 70 cm. Etapa II, ITCR 2014. | 25 |
| 10 | Longitud de la hoja (cm) de <i>Cycas revoluta</i> Grupo A y B, según días después de emergida DDE en condiciones de invernadero. Etapa I, ITCR 2014. | 34 |
| 11 | Ancho de la hoja (cm) de <i>Cycas revoluta</i> según días después de emergida DDE en condiciones de invernadero. Etapa I, ITCR 2014. | 35 |
| 12 | A Planta del Grupo A, proveniente de plantación que presentaba la enfermedad. B. Plantas del Grupo B proveniente de una plantación con ausencia de la enfermedad. Etapa I, ITCR 2014. | 37 |
| 13 | Escala fotográfica de las principales etapas y sus respectivas fases de emisión foliar en <i>C. revoluta</i> en condiciones de invernadero. Sánchez, M. ITCR 2014. | 39 |
| 14 | Categorización de los daños por chasparria en campo, lesiones aisladas en Laboratorio de Fitopatología de CORBANA S.A. Etapa II, Guápiles 2014. | 41 |
| 15 | Sintomatología presentada en las plantas que fueron inoculadas con <i>C. proteae</i> transcurridos desde tres a cinco días. Síntomas semejantes a los encontrados en campo. Etapa II, ITCR 2014. | 46 |
| 16 | Contraste de la sintomatología presentada por las inoculaciones (A, B, C, D, E, F) con <i>C. proteae</i> a 1×10^5 conidios ml^{-1} de concentración y los presentados en la plantación enferma. Etapa II, ITCR 2014. | 47 |
| 17 | Contraste de la sintomatología presentada por las inoculaciones con <i>C. proteae</i> a 2×10^4 conidios ml^{-1} de | |

| | | |
|----|---|----|
| | concentración y los presentados en la plantación enferma (A, B, C, D). Etapa II, ITCR 2014. | 48 |
| 18 | Contraste de los conidios y la colonia de <i>C. proteae</i> , durante comprobación de los postulados de Koch. Etapa II, ITCR 2014. | 49 |
| 19 | Comparación de los conidióforos, conidios y acérvulos de la colonia de <i>C. proteae</i> aislada de <i>C. revoluta</i> , Etapa II ITCR 2014, con respecto a la especie proveniente de <i>Protea</i> sp identificada por Lui <i>et al.</i> , en el 2013. | 50 |
| 20 | Estructuras observadas al estereoscopio en aislamientos de <i>C. proteae</i> . Etapa II, ITCR 2014. | 51 |
| 21 | Orden cronológico del proceso de desarrollo de la enfermedad que presentaron las inoculaciones con <i>C. proteae</i> en plantas de <i>Cycas revoluta</i> etapa V3, desde el segundo día post inoculación (DPI), hasta los 15 DPI. Etapa II, ITCR 2014. | 52 |
| 22 | Fase de desarrollo más susceptible al ataque de patógenos en <i>Cycas revoluta</i> . Inoculaciones en: Etapa V1 Infantil, V2 Formación, V3 Juvenil y V4 Madurez. Etapa II, ITCR 2014. Foto tomada 15 - 24 días después de haber inoculado. | 54 |
| 23 | Distribución de las frecuencias de aparición en campo de síntomas de chasparria caracterizados en Anexo 6, en hojas de <i>C. revoluta</i> en estado V3. Etapa II, Los Chiles 2014. | 55 |
| 24 | Distribución de las frecuencias de aparición en campo de síntomas de chasparria caracterizados en Anexo 4, en hojas de <i>C. revoluta</i> en estado V4. Etapa II, Los Chiles 2014. | 56 |

| | | |
|----|---|----|
| 25 | Resultados del porcentaje de inhibición del crecimiento de la colonia del patógeno <i>C. proteae</i> ante seis concentraciones de cinco ingredientes activos que funcionan como fungicidas protectantes. | 60 |
| 26 | Porcentaje de inhibición del crecimiento de la colonia del patógeno <i>C. proteae</i> ante seis concentraciones de cinco ingredientes activos de fungicidas sistémicos. | 64 |
| 27 | Análisis de regresión lineal del porcentaje de inhibición de la colonia de <i>C. proteae</i> ante cinco ingredientes activos protectantes en diferentes concentraciones evaluadas en el análisis de sensibilidad <i>in vitro</i> . Etapa II, ITCR 2014. | 65 |
| 28 | Análisis de regresión lineal del porcentaje de inhibición de la colonia de <i>C. proteae</i> ante cinco ingredientes activos sistémicos en diferentes concentraciones evaluadas en el análisis de sensibilidad <i>in vitro</i> . Etapa II, ITCR 2014. | 65 |
| 29 | Escala de severidad para la evaluación en campo de la chasparria en <i>Cycas revoluta</i> . Etapa III, ITCR 2014. | 67 |
| 30 | Índice de severidad en seis muestreos mensuales en campo, para la evaluación de rotación de fungicidas convencionales - no convencionales y el ácido acético como antiesporulante. Etapa III Los Chiles 2014. | 69 |
| 31 | Parcelas en campo con los tratamientos evaluados en experimento sobre la rotación de fungicidas y la adición de ácido acético como anti-esporulante. Etapa III, Los Chiles 2014. | 70 |
| 32 | Índice de severidad mensual de chasparria en <i>C. revoluta</i> en condiciones de campo según muestreos mensuales. Etapa III, Los Chiles 2014. | 72 |

Parcelas en campo con los tratamientos evaluados en experimento sobre el efecto de la nutrición foliar con fertilizantes a base de Ca, Mg y Si. Etapa III, Los Chiles 2014.

LISTA DE CUADROS ANEXO

| Anexo | Título | Página |
|-------|---|--------|
| 1 | Resultados de análisis de suelo de sustrato utilizado para las plantas en invernadero. Etapa I, CORBANA S.A, 2013 | 86 |
| 2 | Tratamientos aplicados a plantas en el campo, para determinar la dosis óptima a utilizar en las pruebas en campo con ácido acético. | 86 |
| 3 | Resultados de la identificación a nivel molecular de las muestras de patógenos aislados de <i>C. revoluta</i> obtenidas del campo. | 87 |
| 4 | Sintomatología correspondiente a la “chasparria” en <i>Cycas revoluta</i> , presentados a nivel de campo. | 88 |
| 5 | Análisis de muestra de suelo obtenida del área experimental en campo. Etapa III, Los Chiles 2014. | 90 |
| 6 | Programa de Rotación de fungicidas Convencionales y No convencionales en la plantación de <i>Cycas revoluta</i> para el manejo de la chasparria. Etapa III, Los Chiles, 2014. | 91 |
| 7 | Rotación de fungicidas no convencionales, dosis y preparación. | 91 |
| 8 | Resumen informativo sobre fungicidas utilizados en la rotación convencional en el experimento IIIB. (Fuente: Elaboración propia, tomado de fichas técnicas del producto comercial). | 92 |
| 9 | Análisis foliares obtenidos de muestras en el área de experimento IIIC en Alajuela, Los Chiles 2014. | 94 |

| | | |
|----|---|-----|
| 10 | Análisis de Varianza incluidos en resultados. | 94 |
| 11 | Cálculo de la concentración efectiva del ingredient active del fungicida evaluado a nivel <i>in vitro</i> . | 108 |
| 12 | Manual informativo sobre <i>Cycas revoluta</i> . | 109 |

RESUMEN

La siguiente investigación se planteó, con el objetivo de desarrollar estrategias para el manejo de la chasparria que afecta cicas, por medio del conocimiento de la planta y el estudio de la etiología de la enfermedad. La metodología se dividió en tres etapas. En la etapa I, se determinaron las principales etapas de emisión foliar de *C. revoluta*, las cuales fueron descritas como Infantil (V1), Formación (V2), Juvenil (V3) y Madurez (V4). Se elaboró una escala fotográfica representando cada fase junto a la descripción de la misma. En la etapa II se aislaron e inocularon hongos provenientes del tejido infectado, se compararon con las de la fuente de inóculo. Se determinó que el agente causal de chasparria es *Colletotrichum proteae*, el cual presentó un periodo de incubación (PI) de tres a cinco días en V1, V2, V3 y un periodo de latencia (PL) de seis días; mientras que para V4, el PI fue de siete días y el PL fue de nueve días. Las hojas se afectaron con mayor severidad fueron etapas V2 y V3 de emisión foliar. Por otra parte, se realizaron análisis de sensibilidad *in vitro* de *C. proteae* a diez fungicidas (protectantes y sistémicos) en seis diferentes concentraciones del ingrediente activo (0,01 - 0,1 - 1 - 10 - 100 mg L⁻¹). Entre los protectantes que ejercieron un mayor porcentaje de inhibición mayor al 50% de la colonia fueron: propineb, metiram y clorotalonil; mientras que los sistémicos fueron prochloraz, difenoconazole y pyrimethanil. Los ingredientes activos fueron categorizados en Alta sensibilidad (prochloraz, difenoconazole y propineb), Media Sensibilidad (pyrimethanil), Baja Sensibilidad (metiram) e Insensibilidad (clorotalonil, azoxistrobin, boscalid, mancozeb y mancozeb + oxiclورو de Cobre). Durante la etapa III, se establecieron dos experimentos en Bloques Completos al Azar, con 20 unidades experimentales, distribuidos en cinco bloques y cuatro tratamientos. Uno de los experimentos fue la evaluación de la rotación de fungicidas: Convencionales (T1) y No convencionales (T2), además a cada tratamiento la aplicación extra (no mezclados) de ácido acético a una concentración de 50 mL⁻¹ (T3-T4). Se determinó que el control convencional sigue siendo la mejor estrategia para combatir la enfermedad. La adición de ácido acético como dosis extra al programa convencional de fungicidas, presentó una disminución en la severidad respecto a los tratamientos T2 y T3 pero mayor ante el tratamiento convencional T1. El otro experimento en la Etapa III consistió en la evaluación de la aplicación de fertilización foliar a base de Ca (T1), Mg (T2), Si (T3) y un Testigo (T4), como estrategia para el manejo de la chasparria. En este experimento no hubo efecto de tratamiento. El instrumento de evaluación de los experimentos en campo, fue una escala diagramática de severidad de 0 – 7, diseñada y validada anticipadamente al inicio de los experimentos. Paralelo a este estudio, se redactó un manual informativo que se encuentra adjunto, el cual abarca temas sobre generalidades y manejo del cultivo *C. revoluta*.

Palabras clave: *Colletotrichum proteae*, antiesporulante, Ácido acético, Postulados de Koch, emisión foliar.

ABSTRACT

The following investigation was conducted with the objective of developing strategies to manage the foliar necrosis of cycas with plan knowledge and the study of the etiology of the disease. The investigation was divided in three stages. In the first stage the various phases of leaf development were determined. These were designated as: Infant (V1), Formation (V2), Juvenile (V3) and Mature (V4). Furthermore a photographic scale represented 12 phases of these foliar development was designed. In the second stage, it was determined that the causal agent of chasparria was *Colletotrichum proteae*. The fungus was isolated from diseased tissues and inoculations to healthy plants were made. The disease symptoms were reproduced and the same fungus was isolated from infected tissues of all inoculated plants. Furthermore, the symptoms caused by *C. proteae* under experimental conditions were similar to those observed for chasparria in commercial farms. The disease presented an incubation period (IP) of three to five days on phases V1, V2, V3 and a latent period (LP) of six days; for phase V4 the IP was seven days and LP nine days. The leaves that were affected with more severity were those of phases V2 and V3. In another experiment the sensitivity in vitro of *C. proteae* to fungicides (protectant and systemic) was tested. Six concentrations of the active ingredient (0.01, 0, 0.1, 1, 10, 100 ppm) of each fungicide were tested. The active ingredient were categorized as high sensitivity $<1 \text{ mgL}^{-1}$ (prochloraz, difenoconazole y propineb), medium sensitivity $1 - 10 \text{ mgL}^{-1}$ (pyrimethanil), low sensitivity $10 - 50 \text{ mgL}^{-1}$ (metiram) and insensitivity y $>50 \text{ mgL}^{-1}$ (clorotalonil, azoxistrobin, boscalid, mancozeb and mancozeb + oxicloruro de Cobre. Protectant fungicides, metiram, propineb and clorotalonil resulted in a highly percent of inhibition of the mycelial development. Prochloraz, difenoconazole and pyrimethanil were the best of the systemic fungicides tested. During the field trials, two experiments with experimental designs that consisted of five blocks and four treatments were conducted. One of them consisted in the evaluation of the rotation of conventional (T1) and non-conventional fungicides (T4) and the addition of acetic acid (50 ml L^{-1}) (T2-T3). It was determined that the conventional treatment is the best to manage chasparria in field conditions. The acetic acid decreased the severity of the disease in the T2 and T3 but increase it in T1 treatment. In the other field experiment of phase three foliar fertilization using (Ca, Mg and Si as a management strategy for chasparria was tested). Results of this experiment indicate that the treatments did not have an effect in the severity of the symptoms of chasparria. To evaluate the severity of the symptoms in the two field experiments, a scale of 0-7 (0=no symptoms and 7=severe symptoms) was developed and validated at the beginning of the experiments. Simultaneously with this study, an informative manual for the management and culture of cycas was developed.

Key words: *Colletotrichum proteae*, antisporulant, acetic acid, foliar development, Koch's postulates.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Antecedentes

Cycas revoluta, del orden Cicadales, es originaria de una isla en Japón llamada Ryukyu, la cual fue reportada en 1782 (Osborne *et al.* 2012) y pertenece a las zonas tropical y subtropical del mundo (Stevenson 2001; Whitelock 2002); es también llamada “King Sago Palm”. Se considera una planta ornamental utilizada para decoración de jardines en muchas partes del mundo, es producida en escala masiva para la comercialización del bulbo (semilla vegetativa) y el follaje, cultivada en grandes extensiones de terreno en lugares como China, la India, Sri Lanka; es considerada la especie de cicas más popular en la industria hortícola internacional (Marler *et al.* 2005), se ha reportado también que es comercializada como bonsái, debido a que son de lento crecimiento (Marler y Moore 2010). A pesar de la explotación comercial que tiene dicha especie, existe falta de conocimiento y estudios agronómicos enfocados a las etapas fenológicas y manejo de enfermedades que afectan la producción.

Es relevante destacar que Costa Rica se posiciona como uno de los mayores productores exportadores de plantas ornamentales a nivel mundial, abasteciendo mercados de Estados Unidos y la Unión Europea (PROCOMER 2012). Según lo indicado por el MAG (2007), el área aproximada en la zona norte del país dedicada al cultivo de *C. revoluta* era de 114,50 hectáreas cultivada por 16 productores, sin embargo esto puede haber cambiado con los años. Es una especie protegida que genera un ingreso considerablemente mayor al de las demás especies exportadas en igual condición (CCAD 2010). Las semillas son provenientes de Japón, quien a nivel mundial lidera la exportación de semillas de *C. revoluta* (90%) y plantas (65%) (IUCN/SSC 2003); se importan en mallas de mil cuatrocientas a mil seiscientas semillas, las cuales tienen un costo por unidad, de manera que cada planta tiene un costo considerable. Es necesaria la importación, debido a que no existe producción para venta de semilla sexual en Costa Rica.

En zonas donde se cultivan cicas en para exportación del bulbo desde Costa Rica, se han observado síntomas de necrosis y clorosis en el tejido foliar, esto retarda el llenado del bulbo, hay heterogeneidad en el crecimiento de plantas en un mismo lote, alarga el ciclo de producción, aumenta el tiempo de permanencia de la planta en el campo hasta dos años más del tiempo estimado y puede provocar la muerte de esta, dejando pérdidas económicas importantes al productor. Este problema no ha sido metódicamente estudiado, además no se había logrado encontrar alguna respuesta relacionada a los posibles agentes causales de dicha muerte necrótica o “Foliar necrotic dieback” como la llamaron Deghan y sus compañeros investigadores en 1994. Además, los productores de follaje abastecen un mercado que prefiere la hoja firme y de una coloración intensa, libre de patógenos y manchas, por lo que estas características funcionan como parámetros importantes para la exportación de ornamentales desde Costa Rica, esto aumenta la necesidad de combatir enfermedades foliares (MAG 2007)

En el 2006 aparece un brote de la enfermedad conocida como chasparria, en la zona Atlántica de Costa Rica, la cual es controlada con la aplicación de fungicidas convencionales; para el 2009 la enfermedad llega a la zona Norte del país y alcanza niveles incontrolables. Guzmán (2012), visita una finca productora de cicas, ubicada en el cantón de Los Chiles, Alajuela; caracterizó a la enfermedad como un complejo de patógenos, de manera que unos actúan como patógenos primarios y otros como secundarios; indicó que se podía presentar la infección en plantas de cualquier edad, tanto en campo como en camas de germinación. Se tomaron muestras y a su vez en el laboratorio de fitopatología de CORBANA S.A. se realizaron aislamientos de las lesiones en hojas de cicas, en donde se encontraron patógenos como: *Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Nigrospora* sp. y *Sclerotium* sp., por ello el mismo autor recomendó realizar inoculaciones controladas con los organismos aislados de las lesiones, para aclarar la etiología de la enfermedad y reproducir los síntomas para caracterizarlos e identificarlos, de manera que se pudiera reconocer la enfermedad a tiempo para aplicar estrategias de combate químico, nutrición y manejo de inóculo, debido a que la mayoría de productores se ven en la necesidad de utilizar fungicidas sin saber

cuál es realmente el origen de la enfermedad, esto más bien puede conferir resistencia a fungicidas por los patógenos que estén involucrados, de acuerdo a los ingredientes activos aplicados para el manejo.

1.2 Justificación

La siguiente investigación generará conocimientos de importancia para la producción y manejo integrado de la chasparria en *C. revoluta*, enfermedad que actualmente afecta a los productores de cicas en Costa Rica; por ello se evaluarán estrategias para el manejo de esta enfermedad; esto evitará que se den pérdidas de área foliar a causa de la chasparria y una reducción en los costos de producción al utilizar estrategias distintas al manejo convencional con fungicidas de alto costo; por otra parte, la fotosíntesis realizada por las hojas sanas ayudará al desarrollo del calibre del bulbo que se comercializa en el exterior. Además, se definirán las etapas fenológicas de la hoja *C. revoluta*, de esta manera se podrá determinar la etapa de la hoja en la que es más susceptible a la infección por patógenos asociados a la chasparria, así como las principales características de la sintomatología inicial presentada por las plantas, esto permitirá que la enfermedad pueda ser detectada a tiempo, por medio de monitoreos periódicos en campo con la escala fotográfica de severidad que será propuesta en la presente investigación y poder así combatir la chasparria con una serie de estrategias acertadas aplicando principios del manejo integrado de plagas.

1.3 Objetivo General

- Desarrollar estrategias para el combate de la necrosis foliar (chasparria) en *Cycas revoluta* a partir del conocimiento de la planta y el estudio de la etiología de la enfermedad.

1.4 Objetivos Específicos

- Determinar el ritmo de emisión foliar en *C. revoluta* bajo condiciones de invernadero.
- Elaborar una escala fotográfica de las principales fases de emisión foliar de *C. revoluta* en condiciones de invernadero.
- Identificar el agente(es) causal de chasparria en *C. revoluta*, así como la descripción de la sintomatología asociada.
- Determinar la etapa de emisión foliar de *C. revoluta* más susceptible a la infección por chasparria.
- Realizar análisis de sensibilidad *in vitro* a fungicidas al agente causal de chasparria en *C. revoluta*.
- Elaborar una escala diagramática para la evaluación de la severidad de la chasparria en *C. revoluta*.
- Evaluar el efecto en campo de la aplicación de ácido acético como anti-esporulante y dos programas de rotación de fungicidas para el manejo de la chasparria en *C. revoluta*.
- Evaluar el efecto en campo de la nutrición foliar con fuentes fertilizantes a base de Ca, Mg y Si para el manejo de la chasparria en *C. revoluta*.
- Elaborar un manual informativo referente al cultivo de *C. revoluta*.

1.5 Hipótesis de investigación

- **Etapa IIC.** Existen diferencias significativas entre fungicidas sistémicos en la evaluación a nivel *in vitro*.
- **Etapa IIC.** Existen diferencias significativas entre fungicidas protectantes en la evaluación a nivel *in vitro*.
- **Etapa IIIB.** La aplicación de ácido acético en las lesiones causadas por la chasparria en condiciones de campo, disminuyen la severidad de la enfermedad.
- **Etapa IIIB.** Existen diferencias significativas entre la aplicación de fungicidas convencionales y no convencionales en condiciones de campo.
- **Etapa IIIC.** La aplicación de fertilizantes foliares a base de Ca, Si y Mg disminuye la severidad de la lesión causada por chasparria en *C. revoluta* en condiciones de campo.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades de las cicas

Las especies del orden de las Cycadales se encuentran en el grupo de plantas vasculares más antiguas del mundo, desde hace 300 millones de años (Pérez y Vovides 1997); se encuentran principalmente en los trópicos y subtrópicos, en América, África, Asia y Australia. Actualmente este orden está conformado por tres familias: Cycadaceae, Stangeriaceae y Zamiaceae (Stevenson 2001; Whitelock 2002). En la familia Cycadaceae se encuentra el género *Cycas* que comprende 98 especies distintas (Janick y Paull 2008).

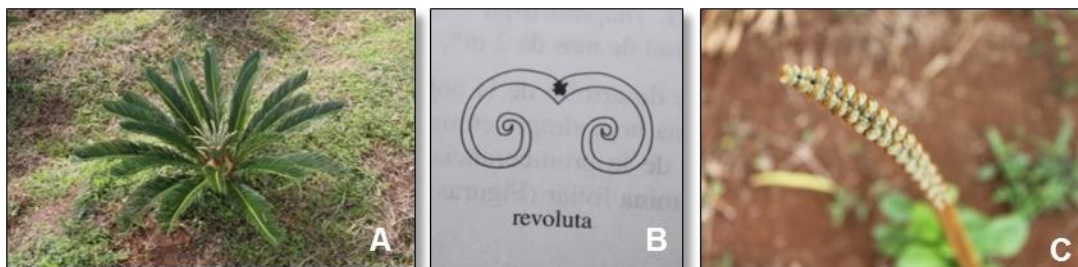
La especie *C. revoluta* es originaria de una isla en el sur de Japón llamada Ryukyu, se reportó en 1782 según Osborne *et al.* (2012). En 1993 se reportaron 182 toneladas de semillas y tres millones de hojas fueron exportadas desde Ryukyu hacia Estados Unidos (Whitelock 2002).

Son plantas dioicas, con tallos subterráneos arborescentes generalmente cubiertos por la base de las hojas, las cuales son pinnaticompuestas, característica que distingue a las cicas del resto de las gimnospermas (Flores 1999). Dicha planta se caracteriza por un lento crecimiento, es considerada una especie perenne, las hojas se agrupan a manera de roseta en los extremos del tallo, opuestas o subopuestas, pubescentes cuando son jóvenes y glabras al madurar (Stevenson 2001). Al ser una planta arborescente, es muy común que se les confunda con palmas, pero sin embargo, no existe ninguna relación entre sí (Pérez y Vovides 1997).

La cica (Figura 1) es una planta simétrica que soporta una corona de hojas sobre un tronco grueso, puede alcanzar 20-90 cm de diámetro, algunas veces más amplio, puede crecer hasta ocho metros de altura en especímenes muy viejos; sin embargo, esta planta tiene un crecimiento muy lento por lo que se requieren entre 50 a 100 años para alcanzar dicha altura ((Whitelock 2002; MobileReference 2009).

Presenta hojas color verde oscuro brillante y se disponen a manera de corona, con una longitud de 0,6 hasta 1,50 metros, posee una vernación revoluta, que se

entiende como márgenes foliares curvados abaxialmente (Flores 1999; Whitelock 2002).



Fuente A y C: Sánchez 2014 y B: Flores 1999.

Figura 1. **A.** Planta de *C. revoluta*. **B.** Ilustración de la forma del margen revoluta de las hojas. **C.** Hoja nueva de *Cycas* sp. con margen revoluta.

Por otro lado cabe mencionar que las raíces de las cicas presentan asociación simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno como *Anabaena cycadae* (Banerjee *et al.* 2005) y *Nostoc* (Seckbach 2002; Vessey *et al.* 2004; Rinaldi *et al.* 2005; Vessey *et al.* 2004).

2.3 Principales problemas que afectan al cultivo de *Cycas revoluta*.

Según el Ministerio de Agricultura y Ganadería en Costa Rica (2009), existen patógenos reportados para *C. revoluta*: *Alternaria* sp., *Fusarium oxysporum*, *Pestalotia* sp., *Gloeosporium*, *Cercospora* sp., *Rhizoctonia* sp.; otras como *Chaetomella cycadina*, *Sphaeropsis* sp., *Ascochyta* sp., *Cladosporium* sp. (Rao y Baheker 1964); se han encontrado además otros como *Cylindrocladium* en plantaciones de cicas en la zona de Jabillos en San Carlos.

2.3.1 Necrosis foliar o chasparria

La chasparria en cicas es posible que sea un patosistema, de manera que actúen patógenos primarios y secundarios, se puede presentar la infección en plantas de cualquier edad (Guzmán 2012), en la Figura 2 se observa que la enfermedad afecta la parte media o extrema de los foliolos y si el ataque es muy severo afecta la totalidad de la hoja, nótese que las planta no tiene un balance fuente – sumidero y por lo tanto no puede realizar la fotosíntesis que requiere para

suministrar la energía para crecer y que el bulbo alcance el calibre deseado. (Ver imágenes de los principales síntomas relacionados con chasparria en Anexo 4).



Fuente: Sánchez 2014.

Figura 2. Chasparria en *C. revoluta*; lesiones comunes en campo. Alajuela, Los Chiles 2014.

En el laboratorio de Fitopatología de CORBANA S. A., se realizaron aislamientos de las lesiones en hojas de cicas y se encontraron hongos (*Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Sclerotium* sp., *Pestalotiopsis* sp., *Nigrospora* sp.); Guzmán (2012) menciona que estos pueden estar asociados a la enfermedad como un patosistema o bien, puede existir un único patógeno y los demás ser oportunistas que atacan después de haberse provocado el daño.

2.3.1.1 *Colletotrichum* sp.

Pertenece al reino Ascomycota, a la clase Hymenoascomycetes del orden Diaporthales y proviene de la familia Glomerellaceae. Uno de los rasgos característicos de la enfermedad es que forman acérvulos en las zonas necrosadas, en donde exhiben estructuras como setas, conidios y conidióforos, esto se muestra en la Figura 3-A; estas estructuras son fácilmente visibles por medio de una lupa y tienen apariencia de una mancha seca con puntos negros en la parte central de la lesión; las hojas pueden sufrir muerte descendente, se vuelven amarillas, se marchitan y en algunos casos se desprenden hasta producir una defoliación severa (Agrios 2005). Su estado perfecto es llamado *Glomerella* sp. y es poco común encontrarlo, está formado por ascosporas dentro de peritecios; se caracteriza por encontrarse en tejido necrótico u hospederos muertos tal como lo menciona Sutton (1992) en Cannon *et al.* (2012).

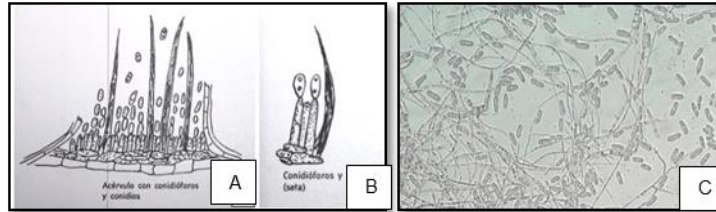
El primer reporte de este género de hongos fue descrito por Tode en 1790, como *Vermicularia*, pero luego fue identificado como *Colletotrichum* en 1837 por Corda, según lo indica Phoulivong (2011); se encuentra dentro de los géneros más importantes de hongos patogénicos en el mundo, basado en la importancia científica y económica (Lubbe *et al.* 2006; Abang *et al.* 2009; Crouch y Beirn 2009; Phoulivong 2011; Dean *et al.* 2012). Agrios (2005) indica que la enfermedad puede ser dispersada fácilmente por agua (conidios) o aire (ascosporas).

Especies de *Colletotrichum* son cosmopolitas, es decir que varias especies pueden afectar a un mismo hospedero y una misma especie puede tener varios hospederos (Cai *et al.* 2009; Hyde *et al.* 2009). Este hongo, es favorecido por altas temperaturas y humedad, de manera que libera los conidios solo cuando los acérvulos se encuentran húmedos, los conidios germinan en presencia de agua y forman un apresorio, de esta manera invade el tejido del hospedante (Agrios 2005).

La infección ocurre por medio del apresorio que sale de una espora germinada sobre la superficie de la hoja el cual penetra la cutícula, este es inducido por el hospedero (Deising *et al.* 2000; citador por Cannon *et al.* 2012) , puede incluso afectar las células de la epidermis por medio de hifas infectivas (Bailey *et al.* 1992, citado por Cannon *et al.* 2012).

Este hongo tiene una fase biotrófica (puede durar poco tiempo o entrar en un periodo de dormancia) en la cual los síntomas no son evidentes y una planta aparenta estar sana. También tiene una fase necrotrófica que produce muerte celular, la cual da inicio a la lesión visible sobre tejido, es muy común encontrar este problema en frutos postcosecha, según afirman Prusky y Plumbley 1992; citado por Cannon *et al.* 2012).

Alarcón (2009), menciona que Aranzazu y Rondón(1999), han demostrado que *Colletotrichum* puede atacar en conjunto con la bacteria *Pseudomonas*, que le brinda una facilidad para el establecimiento y la formación de estructuras del hongo; mientras que el hongo le brinda a la bacteria elementos nutritivos como el hierro para la formación de sideróforos (metabolitos).



Fuente: Finch 1990

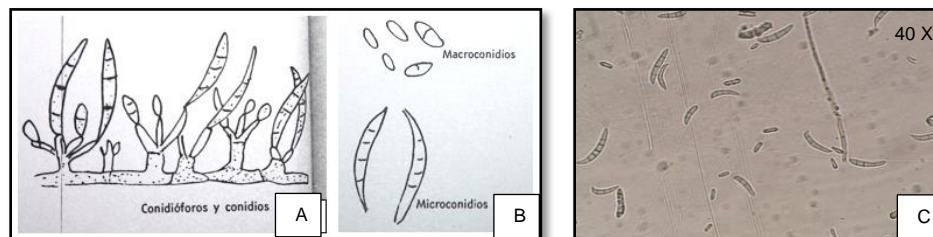
Sánchez 2014.

Figura 3. Estructuras asexuales reproductivas del hongo. **A.** Acérvulo de *Colletotrichum* sp. Formado por conidióforos que forman conidios. **B.** Conidióforo y conidio. **C.** Conidios al microscopio 40x.

2.3.1.2 *Fusarium* sp.

Pertenece al reino Ascomycota a la clase de los Hymenoascomycetes, Subclase Pyrenomycetes y al orden Hypocreales; se encuentra entre los hongos más problemáticos de la agricultura, es un organismo de suelo y sobrevive en restos de cosecha, por medio de estructuras de resistencia como las clamidiosporas; se propaga con ayuda del agua y en restos de suelo de transplantes infectados (Agrios 2005).

Sus estructuras reproductivas están conformadas por conidios (Figura 4), de manera que su reproducción es asexual debido a la presencia de este tipo de signos de la enfermedad. Los macroconidios (Figura 4-B), son típicos de *Fusarium*, están constituidos por tres a cinco células, encorvados hacia los extremos.



Fuente: Finch 1990

Sánchez 2014

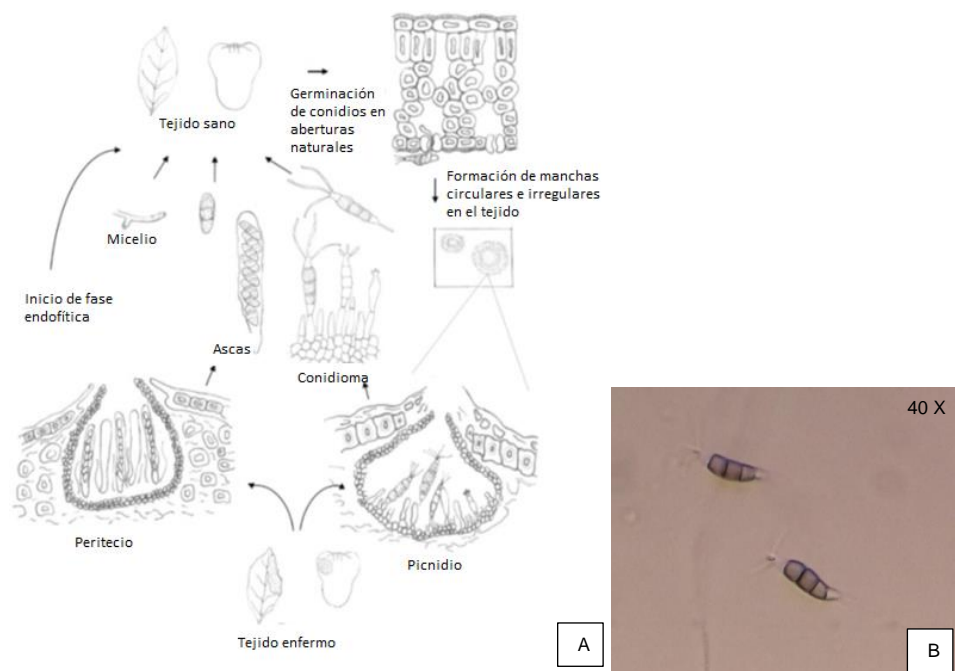
Figura 4. **A.** Micelio de fusarium compuesto por conidióforos y conidios en conjunto. **B.** Tipos de macro y microconidios presentes en *Fusarium* sp. **C.** Conidios de *Fusarium* sp

Entre los síntomas característicos producidos por *Fusarium*, está el aclaramiento de las nervaduras de los folíolos jóvenes; en el caso de que la enfermedad ataque en estado de plántula, pueden marchitarse y morir fácilmente después de haber mostrado los primeros síntomas (Agrios 2005). Además, Leyva

et al. (2004), indican que también se dan manchas cloróticas en las hojas que posteriormente se necrosan y forman puntos negros, los cuales originan las estructuras reproductivas.

2.3.1.3 *Pestalotiopsis* sp.

Pertenece al reino Ascomycota, a la clase Hymenoascomycetes - subclase Pyrenomicetes, del orden Xylariales (Figura 5) (Maharachchikumbura *et al.* 2011).



Fuente: Maharachchikumbura *et al.* 2011;

Sánchez, 2014.

Figura 5. A. Estructuras sexuales y asexuales reproductivas de *Pestalotiopsis* sp. **B.** Conidios flagelados de *Pestalotiopsis foedans*.

Se requiere prestar atención a los patógenos mencionados anteriormente y realizar inoculaciones controladas con estos organismos para tratar de determinar los síntomas y aclarar la etiología de la enfermedad presentada (Guzmán 2012).

Los productores de follaje, abastecen un mercado que prefieren la hoja con un color firme, libre de patógenos y manchas; por lo que éstas características funcionan como los parámetros más importantes para la exportación de ornamentales (MAG 2007), esto aumenta la necesidad de combatir enfermedades que afecten la

aparición de las hojas del cultivo de *C. revoluta* y detectar un adecuado manejo de la enfermedad; de esta manera se debe tratar de mejorar la producción para dar máximos rendimientos.

2.3.2 Escama *Aulacaspis yasumatsui*

Es una escama, perteneciente al orden Hemiptera: Diaspididae, es una plaga específica de las cicas a nivel mundial (Whitelock 2002), es conocida como Cycad Aulacaspis Scale CAS, los daños inician con puntos cloróticos sobre las hojas (Figura 6) (Marler y Moore 2010). Esta escama se encuentra cubierta por una armadura cerosa, la cual eventualmente cubrirá la planta incluyendo las raíces. Las hojas se muestran desecadas y se tornan color café, eventualmente la cica muere.



Fuente: Sánchez 2014.

Figura 6. Plantas de *C. revoluta* infectadas por escamas *Aulacaspis yasumatsui*, vista desde distintas perspectivas, nótese como envuelve el pedúnculo y los folíolos de la hoja hasta dejarlo color blanco.

El Servicio Fitosanitario del Estado en Costa Rica (SFE 2009), además de *A. yasumatsui*, reporta la escama *Chrysomphalus aonidum* (Hemiptera: Diaspididae) como plaga en *C. revoluta*.

2.3.3 Deficiencia de Manganeso (Mn) - desbalance Fe:Mn

Es muy común que se presenten manchas cloróticas y necróticas a nivel foliar en plantas de *C. revoluta* en regiones tropicales del mundo, Deghan y otros investigadores en 1994, estudiaron la posible relación existente entre los síntomas presentados a nivel foliar y las deficiencias o desbalances nutricionales en el suelo debido a relación Fe:Mn ($r^2= 0,61$); determinaron que en suelos deficientes en Mn, es necesaria la aplicación de micronutrientes para suplir las necesidades de la

planta, debido a que el Mn es un elemento de poca movilidad; además indicaron que la sintomatología de la clorosis puede variar debido a la variación genética de plantas. Generalmente se da un cambio en la coloración que va desde amarillo hasta café, incluso en casos severos más de la mitad o la planta entera se decolora y muere (Popenoe 2005).

2.3.4 Nematodos

En un manual técnico, elaborado por Fernández y Quesada (2009), en el Laboratorio Central de Diagnóstico de Plagas del Servicio Fitosanitario del Estado en Costa Rica, se indica la presencia de nematodos de los géneros *Helicotylenchus* spp., *Meloidogyne* spp. y *Pratylenchus* spp. en plantaciones comerciales de *C. revoluta*.

2.4 Estrategias de manejo agronómico

Agrios (2005), recomienda una integración de tácticas de manejo de enfermedades en donde se aplique control químico, cultural y físico, para una disminución del inóculo de enfermedades fungosas. Así mismo es importante el monitoreo, debido a que puede existir variabilidad entre los patógenos presentes, por ello es necesario el conocimiento del ciclo de vida y el comportamiento del agente causal, así como la capacidad de respuesta del patógeno ante las condiciones del medio en el que se desarrolla, es decir la biología, etiología y epidemiología del patógeno.

2.4.1 Control químico - fungicidas

La pared celular de los hongos está compuesta por polisacáridos (quitina, glucano y manano) y proteínas (unidas a polisacáridos, formando glicoproteínas); es una capa que protege la integridad de la membrana celular y genera resistencia mecánica, además es la primera estructura que entra en contacto con el hospedero; se considera el “*talón de Aquiles*” de los hongos, debido a que un daño causado en la pared celular puede causar la muerte del hongo (Pontón 2008).

Los fungicidas son sustancias que inhiben el crecimiento de los hongos con diferentes mecanismos de acción según ingredientes activos, entre ellos los que atacan la pared celular del hongo. También se pueden generar problemas como la pérdida de sensibilidad del hongo ante el fungicida, por ello es importante alternar los ingredientes activos en cada aplicación para evitar la aparición de resistencia del hongo ante un determinado fungicida (Agrios 2005).

Los fungicidas sistémicos se absorben a través del follaje o raíces y son traslocados en sentido ascendente, algunas veces se dirigen a nuevas zonas de crecimiento, pero en la mayoría de los casos son localmente sistémicos en hojas que han sido rociadas (Agrios 2005).

Entre los fungicidas utilizados para el control de chasparria en cítricos, se pueden clasificar por su mecanismo de acción, entre ellos los inhibidores de procesos enzimáticos relacionados con la biosíntesis del esterol, el cual brinda estabilidad y permeabilidad a la pared de la membrana del hongo, entre ellos están los grupos químicos: triazoles e imidazoles, los cuales son inhibidores de la dimetilación (DMI) (C14- demethylasa) (Orozco 2008).

Los ditiocarbamatos y triazoles son organosintéticos si son clasificados por su naturaleza química. Los triazoles son curativos pero no eliminan las lesiones ya visibles. Fungicidas como el clorotalonil y mancozeb son multisitio, es más difícil crear una resistencia ante este tipo de moléculas (FRAC 2014).

Los fungicidas cúpricos, contienen iones Cu^{2+} que son fijados por grupos químicos como imidazoles, carboxilos, fosfatos, sulfhidrilos, aminas o hidroxilos; la acción del cobre provoca una acumulación letal para las células presentes en bacterias y hongos, entre los principales procesos que afecta se identifican: el bloqueo del proceso respiratorio, inhibición de síntesis de proteínas, disminución en actividades de transporte de membrana (IQV AGRO 2011).

Cada clase química se caracteriza por tener un patrón de comportamiento de la resistencia (Cuadro 1). Clases de fungicidas como cobres, ftalamidas y ditiocarbamatos nunca se ha encontrado resistencia práctica. En cambio clases como benzimidazoles, fenilamidas y dicarboxiamidas, han mostrado problemas de resistencia transcurridos desde dos a tres años de su introducción; en caso de

fungicida de nuevo grupos que no han sido investigados se puede basar en la especificidad de su acción (Orozco 2008).

Cuadro 1. Clasificación de los grupos químicos según riesgo de desarrollar resistencia.

| Riesgo de resistencia | Clase química |
|-----------------------|---|
| Alto | Benzimidazoles Phenylamidas Dicarboxiamidas Estrobilurinas |
| Moderado | 2-Aminopyrimidinas Triazoles Carboxianilides Anilopyrimidinas Cymoxanil Dimethomorph Hidrocarbonos aromáticos Fentins Phenylpyrroles Phosphorotiolates Pyrimidinas Carbinols |
| Bajo | Acibenzolar-S-metyl Quinoxyfen Fluazinam Clorotalonil Dithiocarbamatos Cobres Phtalimides Azufres Probenazole Tricyclazote |

Fuente: Orozco 2008

2.4.2 Control cultural – fertilización

Los métodos de control cultural ayudan a mejorar la resistencia del hospedante por medio de prácticas que generen un buen funcionamiento del sistema de la planta. La nutrición mineral de la planta juega un papel muy importante en la resistencia ante enfermedades fúngicas; una adecuada fertilización, puede tener efectos sobre la pared celular, producción de sustancias de defensa, enzimas y energía para el funcionamiento de los procesos celulares que son afectados durante el desarrollo de una enfermedad (Agrios 2005).

2.4.2.1 Calcio (Ca)

Se ha demostrado que el Calcio brinda dureza y estabilidad a la membrana, además genera un aumento en la rigidez del tejido, de manera que se hace más resistente ante la degradación y entrada de estructuras por parte del hongo, como los apresorios (Delgado *et al.* 2006).

Uno de los aspectos importantes que provoca una adecuada nutrición con calcio, es que se activa la división y elongación celular con paredes fuertes y rígidas. Se debe recalcar que el calcio es un elemento poco móvil dentro de la planta, por ello es necesario prestar atención a las deficiencias presentadas, para suplir las necesidades con anticipación para que esté disponible para la planta cuando lo necesite (Wild 1992).

La presencia de compuestos que no son fácilmente degradados por la acción enzimática del hongo hace que la planta adquiera un tipo de resistencia ante la enfermedad. Entre los compuestos complejos mencionados están los cationes monovalentes como el calcio o magnesio así como pectinas y proteínas (Agrios 2005).

2.4.2.2 Magnesio (Mg)

Es un elemento de importancia en regiones húmedas debido a que tiende a lixiviarse; en suelos ácidos es el segundo en importancia en cuanto a cantidad presente en la materia seca después del calcio. Es importante recordar que elementos como el Ca, Mg y K deben estar balanceados en el suelo debido a que es posible que se presente el bloqueo de posiciones de intercambio catiónico, debido a que tienen un efecto antagónico si existe abundancia de uno respecto a otro; así mismo el exceso de K puede ocasionar carencias de Mg, debido a la competencia entre cationes por acaparar las posiciones de intercambio para entrar a la raíz de la planta (Wild 1992).

El magnesio juega un papel importante en reacciones enzimáticas y de transferencia de energía, es el elemento central de la molécula de clorofila, además dentro de la célula tiende a unirse con moléculas orgánicas para formar compuestos importantes como el ácido málico. Entre los síntomas más comunes de la deficiencia de magnesio está la clorosis intervenal en hojas viejas inicialmente y luego se da un descenso en la fotosíntesis (Wild 1992).

La deficiencia de Mg es muy común en suelos Ultisoles; esto se debe principalmente a la escasa aplicación de fertilizantes que contienen Magnesio y la alta utilización de fertilizantes altos en Potasio y Nitrogenados (Molina 1998).

2.4.2.3 Silicio (Si)

Es un elemento abundante en la litosfera (27,7%) y suelo (60%), en forma soluble como ácido silícico (Epstein 1999; Fauteux *et al.* 2005). Epstein (1999), indica que el Silicio no es clasificado como un elemento esencial, no se incluye en la formulación de dosis de fertilizantes; sin embargo, se ha confirmado la importancia a través de numerosos estudios; es absorbido como ácido silícico (H_2SiO_3), es almacenado dentro del tejido de la planta, se aplica como fertilizante en la forma oxidada SiO_2 ; de manera, que se da la siguiente reacción al entrar en contacto con el agua: $\text{SiO}_2 + \text{H}_2\text{O} = \text{H}_2\text{SiO}_3$ (Wild 1992); sin embargo Jones y Handreck (1976) citados por Kordorferr y Datnoff (1996), afirman que el Si es absorbido como ácido monosilícico $\text{Si}(\text{OH})_4$. Se ha comprobado que la falta de Silicio hace más propensas a las plantas ante el ataque de patógenos, por la debilidad en la pared celular (Epstein 1999; Hodson *et al.* 2005, citados por Aguirre *et al.* 2007). Es bien sabido que el espesor de la pared celular en una planta es fundamental para prevenir ataques de patógenos ya que interfiere en la penetración del hongo, hace que esta sea difícil o imposible (Agrios 2005).

Ha sido demostrado que la fertilización con Silicio, hace que la planta aumente la acumulación de fitoalexinas, compuestos fenólicos y lignina (Chérif y Belánger 1992, citado por Aguirre *et al.* 2007), esto genera una mayor resistencia ante el ataque de patógenos. Fauteux *et al.* (2005), defienden la propiedad bioactivadora del Silicio, afirman que dicha propiedad se debe a que se forman enlaces proteínicos que interfieren con cofactores catiónicos de enzimas que se relacionan con la patogenicidad.

El Silicio es depositado en el retículo endoplasmático de las células y espacios intercelulares en la forma hidratada $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, aunque también es depositado en células especializadas llamadas células silíceas, las cuales forman una capa gruesa bajo la cutícula de la hoja (Wild 1992; Fihlo *et al.* 2000).

Por otro lado el Silicio y el Calcio, actúan en conjunto favoreciendo la rigidez de las paredes celulares y brindan resistencia ante ciertos patógenos (Delgado 2006). Ha sido demostrado que el Silicio incrementa la tolerancia ante suelos ácidos y con altos contenidos de Al, Fe y Mn; esto se debe a que aumenta el intercambio

catiónico y torna ligeramente básico el pH (Chérif y Belángel, 1992, citado por Delgado *et al.* 2006), además Kordorferr y Datnoff (1996) mencionan que el Si actúa reduciendo los niveles de Fe y Mn en suelos con niveles altos en estos elementos.

2.4.3 Control físico

Este tipo de manejo se refiere a actividades como la poda sanitaria que ayuda a proteger a las plantas del inóculo del secundario de la enfermedad que se encuentra en el campo; se considera como una actividad de saneamiento, la cual es capaz de disminuir la cantidad de inóculo presente y el grado de la enfermedad en la plantación afectada (Agrios 2005).

2.5.3.1 Poda sanitaria

Es recomendable realizar este tipo de práctica, debido a que es importante extraer el inóculo de las zonas cercanas a la plantación, para evitar que se infecten hojas sanas y se siga propagando la enfermedad (Agrios 2005).

El hecho de excluir el inóculo primario o secundario presente en el campo hace que disminuya la presión de la enfermedad y lo convierte en una práctica eficaz para patógenos monocíclicos y policíclicos. Además Agrios (2005), menciona que es importante que éste método se acompañe del control químico y que ayude a la disminución de la infección. En la Figura 7 se muestra la poda sanitaria realizada a una planta de *Cycas revoluta* como recomendación de Guzmán (2012) en una plantación afectada en Alajuela, Los Chiles; uno de los inconvenientes es la mano de obra requerida para realizar esta labor.



Fuente: Sánchez 2013.

Figura 7. Efecto de la poda sanitaria sobre plantas de *C. revoluta*. **A.** Planta afectada por la chasparria. **B.** Planta después de realizada la poda sanitaria. **C.** Recolección del inóculo en sacos para no distribuir el patógeno en el campo. Alajuela, Los Chiles 2013.

2.5.3.2 Aplicación de ácido acético como anti-esporulante

Es posible disminuir el inóculo secundario por medio de aplicaciones de sustancias con poder anti-esporulante como el ácido acético, esto genera un efecto similar a la poda ya que elimina la fuente de inóculo y es de bajo costo comparado con la mano de obra requerida para realizar la poda de hojas enfermas (Guzmán 2013).

Se ha demostrado el efecto fungicida sobre los esclerocios de *Phymatotrichopsis omnívora* en concentraciones de 8,3 y 83,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido acético y concentraciones de 1,7 a 8,3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido acético tienen un efecto fungistático; el mismo autor afirma que el ácido acético induce a la muerte apoptótica de las células, es decir, una muerte celular programada y focalizada en el punto donde sufre lesiones a causa del patógeno; y además afecta la permeabilidad de la membrana cuando se asocia a las histonas (Samaniego *et al.* 2008).

En un estudio realizado evaluando ácido acético como antiesporulante en lesiones de *Micosphaerella fijiensis* en banano (*Musa sp.*). Gómez (2013), publicó que este compuesto inhibió la esporulación en más de 85% incluso hasta nueve días después de la aplicación. Este mismo compuesto logró reducir los peritecios en *Giberella zea* (98% - 100%). Según indican Samaniego *et al.* (2008), se da una disminución en la permeabilidad de la pared celular del hongo, induce la apoptosis (Peñalva y Arst 2002; Ribeiro *et al.* 2006). El ácido acético pertenece a los Ácidos Grasos Volátiles (AGV) de cadena corta y algunas veces en cantidades pequeñas pueden servir más bien como nutrimento, pero también es capaz de penetrar y acidificar el citosol de las células de la membrana (Uhre y Arneborg 1988).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localización

Se realizaron observaciones en el periodo octubre 2013 – octubre 2014, como parte de la investigación, en un invernadero de 120 m² ubicado en el Instituto Tecnológico de Costa Rica, Sede San Carlos (ITCR SSC), en las coordenadas 10°21'52.6" Latitud Norte y 84°30'31.2" Longitud Oeste, a una altitud de 169 m.s.n.m., las condiciones climáticas predominantes son 26°C de temperatura y humedad relativa de 87%. Para una de las etapas de la investigación, se utilizó el laboratorio de fitopatología del ITCR con condiciones controladas y equipo necesario durante el periodo comprendido entre febrero-noviembre 2014.

La experimentación a nivel de campo se realizó en una plantación de *C. revoluta* de dos años de edad, en el cantón de Los Chiles, Alajuela en Costa Rica, a una altitud de 68 m.s.n.m., radiación 178 W/m², temperatura promedio de 25,2 °C, con humedad relativa de 84,9%; cuenta con suelos “rojos” del orden Ultisol, los cuales contienen altos contenidos de Fe y pH ácido. La toma de datos y experimentación en finca se llevó a cabo durante seis meses (abril – septiembre 2014).

3.2 Etapas de la investigación

La presente investigación es de carácter experimental, se dividió en Etapas I, II, III y al final se confeccionó un manual informativo referente al cultivo; cada una de estas etapas se encuentra conformada por experimentos y actividades requeridas para cumplir los objetivos propuestos, a continuación se describe la metodología empleada en cada etapa.

3.2.1 Etapa I. Determinación del ritmo de emisión foliar de *C. revoluta* en invernadero y elaboración de escala fotográfica de principales fases emisión foliar.

I A. Ritmo de emisión foliar

Se evaluó el ritmo de emisión foliar en plantas de *C. revoluta* en invernadero; se dividieron en dos grupos (por tamaño) Grupo A, entre seis - siete centímetros de diámetro y Grupo B entre diez y doce centímetros de diámetro. Se utilizó como sustrato para la maceta, suelo tratado con materia orgánica (Anexo 1); además fertilizó con fórmula completa (12-24-12) a la siembra, y durante el desarrollo de las coronas de hojas (26-0-26, 18-5-15) junto a aplicaciones foliares cada quince días con la fórmula 20-20-20; el riego se realizó según condiciones climáticas, se aplicó insecticida (Terbufós) en presencia de plaga.

Transcurridos diez meses de la siembra, en el Grupo A, se observó un estancamiento del crecimiento, coloración anormal, bulbos livianos, casi huecos por dentro, su apariencia era de plantas enfermas, por ello se procedió a realizar transplante a raíz desnuda y un cambio de sustrato (suelo de montaña + piedra roja, 80:20) además de un tratamiento con fungicida (Clortosip[®] 4 ml L⁻¹ + Sportak[®] 1,33 ml L⁻¹).

I A.1 Diseño experimental

El experimento fue de carácter observacional, el diseño que se utilizó fue Completamente al Azar, unifactor, se trabajó con 22 plantas (unidades estadísticas) para realizar el estudio. No se aplicaron tratamientos, se realizaron doce observaciones a cada planta, cada dos días desde los cero días hasta los 22 después de emergida (DDE), esto se determinó de acuerdo a pruebas preliminares, en donde se midieron las primeras plantas por 32 días y no se presentaron cambios después de los 22 días.

I A 2. Variables evaluadas

Con ayuda de una cinta métrica se midió la longitud desde la base hasta el último foliolo de la hoja imparipinada; el ancho de la hoja se midió de la parte

media, debido a que por lo general es el ancho máximo; esto se hizo para cada corona de hojas que brotó en el transcurso de un año. El diámetro del bulbo se midió mensualmente por medio de un vernier, esto para monitorear la velocidad con la que este lograba adquirir un calibre determinado. Se registró la cantidad de días que tardó la planta en emerger un brote de hojas desde la siembra, además se realizó una poda total de hojas para observar el periodo requerido de emergencia de la próxima corona.

I B. Escala fotográfica de las principales etapas de emisión foliar

Se tomaron fotografías cada dos días (desde 0 – 22 DDE) a las plantas de *Cycas revoluta* en invernadero para el estudio de emisión foliar, lo que permitió realizar una comparación visual del crecimiento y desarrollo de las hojas, se realizó desde el momento en que la primera planta produjo un brote de hojas, se llevó un registro cronológico de cada planta. Luego se escogieron las plantas con las mejores fotografías y se elaboró una escala de emisión foliar en invernadero; conforme aumenta la edad de la planta, de esta manera se definieron etapas de desarrollo foliar más importantes según las fotografías obtenidas y se realizó una descripción de cada fase de desarrollo de acuerdo a lo observado.

3.2.2 Etapa II. Identificación del agente causal de la chasparria en *Cycas revoluta* y la etapa de emisión foliar más susceptible a la infección por patógenos.

II A. Identificación del agente causal

Para esta parte se procedió con la aplicación de los postulados de Koch. En campo, se colectaron muestras de hojas con síntomas de infección provenientes de la plantación de cicas en estudio, se llevaron al laboratorio, se identificaron las principales lesiones y se categorizaron en seis tipos; fueron aislados en el laboratorio con PDA como medio de cultivo; los aislamientos purificados fueron sometidos a análisis moleculares que permitieran relacionar síntomas con el hongo identificado.

II A 1. Cultivo de hongos

Semanalmente en el laboratorio se mantuvieron cultivos puros de los hongos aislados en incubadora a 27°C y 50% HR, esto para asegurar la disponibilidad del material para inocular; se conservaron los hongos en aceite mineral (discos de micelio y en tubos de ensayo inclinado). También se prepararon suspensiones de conidios concentradas con agua desionizada estéril y se realizaron los conteos por medio de la cámara de Neubauer.

II A 2. Preparación de la suspensión

Se tomaron conidios de cultivos puros de cada hongo aislado en PDA, se preparó una suspensión agregando agua desionizada estéril al plato Petri donde se encontraba el cultivo, se raspó la superficie del medio de cultivo con una haza de vidrio para que se desprendieran los conidios, seguidamente se mezcló ese raspado en 100 ml de agua desionizada, se tomó con una micropipeta 10 μL de la suspensión obtenida, por medio de una cámara de Neubauer se realizó el conteo de conidios al microscopio, mediante cinco lecturas de la parte central de la cámara, según la metodología para el uso del hematocitómetro indicada por Bastidas (s.f.); para las inoculaciones, se utilizaron dos concentraciones: 2×10^4 conidios ml^{-1} y 1×10^5 conidios ml^{-1} en agua desionizada estéril.

II A 3. Inoculaciones

Se utilizaron dos metodologías para las inoculaciones, la primera fue realizada en cicas provenientes de la plantación en estudio, y con cuatro hongos previamente aislados, no identificados a nivel de especie (*Fusarium* sp., *Colletotrichum* sp., *Sclerotium* sp. y *Nigrospora* sp.). Se inocularon cuatro plantas por cada hongo, para un total de 16 plantas inoculadas en distintas fases (Infantil, Formación, Juvenil y Madurez) y cuatro plantas que funcionaron como testigo absoluto.

Debido a los resultados negativos que dieron las primeras inoculaciones, se propusieron cambios en la metodología para realizar las inoculaciones, estos cambios se presentan comparados en el Cuadro 2, en donde se muestran las variaciones aplicadas para lograr síntomas en las inoculaciones realizadas; todas fueron realizadas en horas de la tarde, entre las 4:00 pm y 5:00 pm.

Se inocularon ocho plantas en las mismas fases de emisión foliar con *Colletotrichum proteae*, cepa aislada de la plantación de cicas en estudio e identificado molecularmente. Se realizó la inoculación en el segundo brote de cicas sanas (provenientes de una finca que no tenía la enfermedad), se asperjó con la suspensión de conidios en el haz y envés de las hojas en desarrollo.

Cuadro 2. Variaciones en la metodología utilizada en las inoculaciones para determinar un protocolo para *C. proteae* en *Cycas revoluta*. Etapa II, ITCR 2014.

| Variaciones en la metodología de inoculaciones | | | | | | | |
|--|-------------------|------------------------|--|------------------|-------------------------|-------------------|----------|
| Patógeno | Bulbos utilizados | Cámara de humedad (cm) | Concentración de inóculo (conidios/ml) | Tipo de riego | Equipo para inoculación | Agua suministrada | Tween 20 |
| <i>Fusarium</i> sp., <i>Colletotrichum</i> sp., <i>Sclerotium</i> sp. y <i>Nigrospora</i> sp. | Grupo A | 70x40x40 | 2 x10 ⁴ | Manual | aerógrafo | desionizada | X |
| <i>Fusarium</i> sp., <i>Colletotrichum</i> sp. | Grupo B | 70x40x40 | 2 x10 ⁴ | Manual | atomizador manual | Clorada | X |
| <i>Colletotrichum</i> sp. | Grupo B | 70x40x40 | 1 x10 ⁵ | Manual | atomizador manual | desionizada | X |
| <i>Colletotrichum proteae</i> | Grupo B | 120x70x70 | 2 x10 ⁴ | Micro-aspersores | atomizador manual | Clorada | |
| <i>Colletotrichum proteae</i> | Grupo B | 120x70x70 | 1 x10 ⁵ | Micro-aspersores | aerógrafo | Clorada | |
| <i>Pestalotiopsis foedans</i> | Grupo B | 120x70x70 | 2 x10 ⁴ | Micro-aspersores | aerógrafo | Clorada | |
| <i>Colletotrichum proteae</i> | Grupo B | 120x70x70 | 2 x10 ⁴ | Micro-aspersores | Atomizador manual | Clorada | |
| <i>Colletotrichum proteae</i> | Grupo B | 120x70x70 | 2 x10 ⁴ | Micro-aspersores | Atomizador manual | Clorada | X |

II A 4. Cámara de humedad

Durante las primera inoculación, se diseñó una caja de madera 70 x 40 x 40 cm forrada con plástico grueso transparente (Figura 8) para conservar la humedad relativa de manera que genera un microclima adecuado para el desarrollo del hongo; una vez dentro de la cámara de humedad las plantas fueron atomizadas con agua tres veces al día, hasta el punto de saturación del aire o al menos que se mantuviera entre 85% y 99% HR.

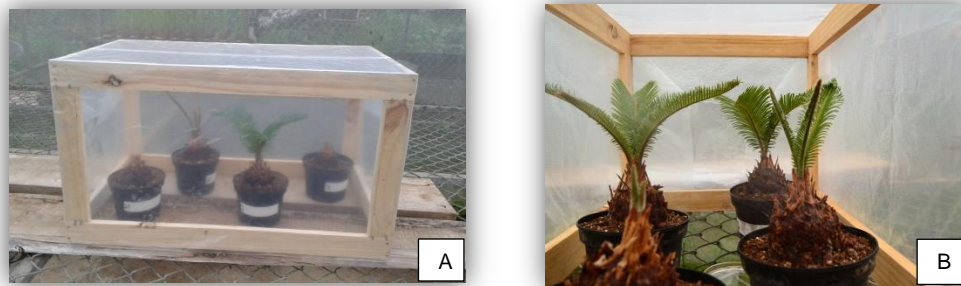


Figura 8. A. Cámara de humedad, tamaño 70 x 40 x 40 cm. **B.** Cuatro plantas inoculadas y humedecidas por medio de aspersión de agua con atomizador manual. Etapa II, ITCR 2014.

Durante las posteriores inoculaciones, la cámara de humedad fue mejorada (Figura 9), se utilizó una caja de mayor dimensión 120 x 70 x 70 cm y ayuda de dos microaspersores-nebulizadores en la parte superior, se simulaba el efecto de la lluvia; esto fue efectivo para que se presentaran los síntomas esperados.

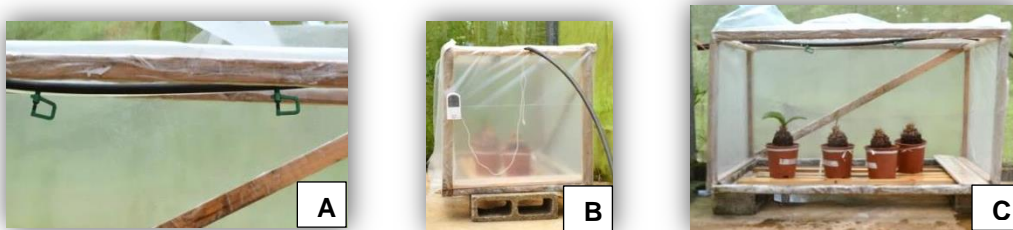


Figura 9. A. Cámara de humedad mejorada con microaspersores. **B.** con un sensor de humedad relativa- temperatura. **C.** Cámara húmeda con dimensiones de 120 x 70 x 70 cm. Etapa II, ITCR 2014.

Después de tomar el dato de periodo de incubación y fotografías para comparar la sintomatología, se mantuvo la observación hasta verificar un avance de la enfermedad; en el laboratorio, se realizaron aislados en PDA + Agrimicyn® 46 WP de cada hongo encontrado en las lesiones de las plantas del invernadero, se purificaron a los cinco días. Se analizaron las muestras al microscopio y se procedió a caracterizar el organismo encontrado, comparar los signos obtenidos con los que fueron inoculados tal como lo indica Gilchrist *et al.* (2005) para la aplicación de los postulados de Koch.

II B. Fase de desarrollo de la hoja más susceptible a la infección por patógenos y lesiones más frecuentes en cada fase

En invernadero, se determinó la fase de las plantas inoculadas que el patógeno atacó con mayor severidad. En campo, se hizo una categorización de los síntomas más comunes encontrados en la plantación (Anexo 4). Se realizó un muestreo en hojas fase V3 y V4 en campo, en donde se anotó la frecuencia con la que presentaron los síntomas de la chasparria según la categoría descrita; esto para identificar las lesiones más comunes en hojas jóvenes y maduras. Los principales síntomas encontrados fueron aislados en medio de cultivo PDA enmendado con antibiótico (Agrimicyn® 46 WP).

II C. Análisis de sensibilidad *in vitro* a fungicidas

Se procedió a realizar las pruebas de sensibilidad *in vitro* de *C. proteae* (cepas B2 y A2) a diez fungicidas (protectantes y sistémicos), a cinco concentraciones diferentes en el medio de cultivo (0.01, 0.1, 1.0, 10 y 100 mg L⁻¹), con tres repeticiones cada tratamiento y un testigo en cada caso (0 mg L⁻¹) (Cuadro 3). El experimento se realizó dos veces y se variaron los fungicidas según al experimento al que pertenecían.

Cuadro 3. Productos utilizados para las pruebas de sensibilidad *in vitro* a fungicidas protectantes y sistémicos. Etapa II, ITCR 2014.

| Nombre comercial | Ingrediente activo | Grupo químico |
|------------------|---|-----------------------------|
| Clortosip® 72 SC | Clorotalonil | Cloronitrilos |
| Dithane® 80 WP | Mancozeb | Ditiocarbamato |
| Cobrethane® | Mancozeb (50%) + Oxicloruro de Cu (19%) | Ditiocarbamato + inorgánico |
| Antracol® 70 WP | Propineb | Ditiocarbamato |
| Polyram® 70 WP | Metiram | Ditiocarbamato |
| Sportak® 45 EC | Prochloraz | Imidazol |
| Score® 25 EC | Difenoconazole | Triazol |
| Amistar® 50 WG | Azoxistrobin | Estrobilurina |
| Siganex® 60 SC | Pyrimethanil | Anilino pirimidinas |
| Cumora® 50 SC | Boscalid | Anilida |

III C 1. Cultivos monoconidiales

Para obtener los discos de micelio que fueron utilizados para los tratamientos, debían ser procedentes de cultivos monoconidiales y para esto se realizó una suspensión de conidios con factor de dilución 1×10^{-7} y por medio del aza bacteriológica se distribuyó la suspensión por la superficie del medio de cultivo; se observó al microscopio y una vez que aparecieron las primeras colonias formadas por una espora, se procedió a sembrarla en nuevo medio de cultivo para tener material disponible.

III C 2. Preparación del medio de cultivo enmendado

Se prepararon soluciones madre con agua destilada y la cantidad de fungicida necesario según la concentración del ingrediente activo del producto comercial para obtener una solución a una concentración de 1000 mg L^{-1} , una vez obtenida la primera solución madre o SM1, se tomó una alícuota y se fue diluyendo hasta obtener cuatro soluciones madre en agua destilada (Cuadro 4).

Cuadro 4. Preparación de cuatro soluciones madre en agua, a diferentes concentraciones ($1 - 1000 \text{ mg L}^{-1}$). Etapa II, CORBANA S.A 2014.

| En agua destilada | | | |
|-------------------|--------------------|------------|--------------|
| Soluciones madre | mg L ⁻¹ | Agregar a: | Balon 100 ml |
| SM1 | 1000 | Cobrethane | 0,144 ml |
| SM2 | 100 | SM1 | 10 ml |
| SM3 | 10 | SM2 | 10 ml |
| SM4 | 1 | SM3 | 10 ml |

Seguidamente se prepararon cinco balones con PDA y se le adicionó una alícuota de la solución madre, luego se aforo a 100 ml, según las concentraciones requeridas (Cuadro 5), se colocó en el agitador magnético por 30 segundos y luego se prepararon los platos Petri (90 x 15 mm), seis por cada balón, aproximadamente 15 ml de solución para cada plato. La metodología fue la misma para todos los fungicidas una vez obtenida SM1, que se preparó de la concentración del producto comercial.

Cuadro 5. Preparación de cinco concentraciones de fungicida a partir de las soluciones madre obtenidas. Etapa II, CORBANA S.A 2014.

| En PDA | | |
|-------------------------|-------------|-------------------------|
| Concentración requerida | Agregar de: | Balón de 100 ml con PDA |
| 0,01 | SM4 | 1 ml |
| 0,1 | SM3 | 1 ml |
| 1 | SM2 | 1 ml |
| 10 | SM1 | 1 ml |
| 100 | SM1 | 10 ml |

III C 3. Siembra y evaluaciones

Por medio de un saca bocados se obtuvieron discos de micelio de cultivos monoconidiales (0,68 cm de diámetro) y se sembraron en el medio de cultivo con el fungicida correspondiente, se colocaron en la incubadora a 27°C y 50% HR. A los 15 días, cuando el testigo cubrió la totalidad del medio de cultivo, se realizaron las evaluaciones por medio de la medición del diámetro del área delimitada por el crecimiento de micelio en las cajas Petri, se utilizó un vernier. Se realizaron cálculos del porcentaje de inhibición provocado por el fungicida sobre la colonia del hongo por medio de la fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \left[\left(\frac{\text{Diam. testigo} - \text{Diam. tratamiento}}{\text{Diam. testigo}} \right) \times 100 \right]$$

Se realizaron análisis de regresión en base a las concentraciones evaluadas en mg L^{-1} para todos los fungicidas que fueron testados para calcular la concentración efectiva EC_{50} . Se categorizaron los resultados según el cálculo de ED^{50} (Concentración de ingredientes activos capaz de inhibir el 50% del crecimiento micelial), propuesto por Edgington *et al.* (1971).

- $\text{ED}^{50} < 1 \text{ mg L}^{-1}$: alta sensibilidad (AS)
- $\text{ED}^{50} 1\text{-}10 \text{ mg L}^{-1}$: moderada sensibilidad (MS)
- $\text{ED}^{50} 10\text{-}50 \text{ mg L}^{-1}$: baja sensibilidad (BS)
- $\text{ED}^{50} > 50 \text{ mg L}^{-1}$: insensibilidad (I)

Las dos cepas de *C. proteae* (B2 y A2) que fueron utilizadas, mostraron un comportamiento similar en las pruebas de sensibilidad a fungicidas, por ello se

analizaron de manera conjunta, promediando los datos para obtener una mayor precisión de los resultados.

3.2.3 Etapa III. Elaboración de escala de severidad de la enfermedad y evaluación en campo del efecto de estrategias para el manejo de la chasparria en *Cycas revoluta*.

III A. Escala de severidad de la enfermedad

Mediante visitas y muestreos a la plantación enferma por la chasparria, se elaboró una escala diagramática para evaluar la enfermedad. Se procedió a seccionar la hoja en porcentajes, en donde cada parte correspondió a un porcentaje de la hoja afectado con su respectiva fotografía y se calificó con valores de cero a siete (0 – 7) el nivel de daño causado; se tomaron cinco plantas por unidad experimental, se obtuvo un promedio de todas las hojas calificadas con la escala, se determinó la severidad en porcentaje y se determinó el índice de severidad, el cual se calculó de la siguiente manera:

$$\text{Índice severidad} = \sum_{n=0-7}^{i=0-20} = \left[\frac{(n \times i) + (n \times i) \dots}{8 - 1 (TH)} \right] \times 100$$

En donde:

n: Grado de severidad de cada hoja de las plantas evaluadas en campo por medio de la escala diseñada

i: Número de hojas muestreadas

TH: Número de hojas totales por cada planta evaluada.

III B. Evaluación de ácido acético como antiesporulante y programa de rotación de fungicidas convencionales - no convencionales.

Para este experimento, se incluyó un programa de rotación de fungicidas convencionales y no convencionales como estrategia para el manejo integrado de la chasparria en *C. revoluta*; además se evaluó la aplicación extra de ácido acético a 50 ml L⁻¹), sobre las lesiones de la necrosis, con el fin de reducir el inóculo secundario (concentración determinada en pruebas preliminares en Anexo 2).

III B 1. Diseño experimental

Se utilizó un diseño en Bloques Completos al Azar. Los tratamientos se distribuyeron en cinco bloques con cuatro parcelas experimentales de 150 plantas aproximadamente para un total de 20 unidades experimentales.

III B 2. Tratamientos

Los tratamientos que se describen en el Cuadro 6, fueron aplicados semanalmente para un total de 21 aplicaciones y seis fechas de muestreo mensual (abril – septiembre 2014).

Cuadro 6. Descripción de los tratamientos aplicados para la evaluación del efecto del ácido acético y dos programas de rotación de fungicidas como estrategia para el manejo de la chasparria en *C. revoluta*. Etapa III, Los Chiles 2014.

| Cód. | Tratamiento | |
|------|----------------------------|--------------------------------|
| | Factor A (antiesporulante) | Factor B (Rotación fungicidas) |
| T1 | Sin ácido acético | Programa convencional |
| T2 | Sin ácido acético | Programa No convencional |
| T3 | Ácido acético | Programa convencional |
| T4 | Ácido acético | Programa No convencional |

Era de importancia determinar cuál sería la concentración adecuada de ácido acético a utilizar sin que ejerciera un efecto fitotóxico en las plantas. Para esto se hizo necesario aplicar distintas concentraciones a un grupo de plantas en campo, cada concentración se definió como tratamientos y se indican en el Anexo 2. Al final se realizó una prueba con ácido acético a una concentración de 50 ml L⁻¹ y tampoco hubo toxicidad de parte de las plantas, de manera que se decidió aplicar dicha concentración en los experimentos que se realizaron.

La aplicación de antiesporulantes como el ácido acético y fungicidas del programa de rotación en campo, se realizó por medio de una bomba pulverizadora manual marca Carpi[®] de 18 L de capacidad y una boquilla Teljet 8002. Para la aplicación de los tratamientos en la totalidad del área experimental, se utilizaron 18 L de volumen de disolución para cada producto aplicado (fungicida convencional, no convencional y ácido acético).

Los tratamientos que indican la aplicación de un programa convencional se refieren al ejecutado en la finca actualmente, sin alteraciones (Anexo 6). El programa no convencional de fungicidas (Anexo 7) se refiere a una rotación con productos de bajo costo, fácil disponibilidad y que pueden ser formulados en la finca productora (Caldo bordelés, Protector Zn y ácido acético + Clorotalonil).

III B 3. Variables evaluadas

Para este experimento se tomó en cuenta la medición de la severidad de la enfermedad en cada una de las cinco plantas identificadas con una cinta de color dentro de cada parcela; estas mediciones se realizaron cada cuatro semanas por medio de la escala de severidad que fue desarrollada en etapa III A; se clasificó en la escala y se tomó un promedio de los puntajes obtenidos para cada hoja de una misma planta y luego se calculó el índice de severidad.

III C. Evaluación de la nutrición foliar

Este experimento se realizó a nivel de campo, consistió en aplicar y evaluar distintas fuentes fertilizantes que proporcionan Si, Ca y Mg, como alternativas para el manejo de la chasparria en *C. revoluta*. Para esto se utilizaron parcelas 150 plantas aproximadamente.

III C. 1 Diseño experimental

Se utilizó un diseño en Bloques Completos al Azar. Los tratamientos se distribuyeron en cinco bloques con cuatro parcelas experimentales de 150 plantas aproximadamente para un total de 20 unidades experimentales, con 12 GL para el error experimental y 19 GL totales.

III C. 2 Tratamientos

En cuanto a los tratamientos (Cuadro 7), cada uno obedeció a una fuente de fertilización foliar determinada y un testigo, para un total de cuatro tratamientos y 20 unidades experimentales; todas las unidades experimentales recibieron aplicaciones rotacionales de fungicidas convencionales con bomba pulverizadora de motor. Los fertilizantes foliares fueron aplicados por medio de una bomba

pulverizadora manual marca Carpi® de 18L de capacidad y una boquilla Teljet 8002 (para la aplicación de cada tratamiento en el área experimental, se utilizaron diez litros de disolución).

Cuadro 7. Tratamientos del experimento efecto de la fertilización foliar en la severidad de la chasparria en *C. revoluta* en condiciones de campo. Etapa III, Los Chiles 2014.

| Trat. | Fuente Fertilizante | | Composición química | |
|-------|-------------------------------------|--------------------------|------------------------|-------------------------|
| T1 | Ca(NO ₃) ₂ | Nitrato de Calcio | CaO: 26% | NO ₃ : 14.2% |
| T2 | SiO ₂ /K ₂ O | Silicato de Potasio | SiO ₂ : 20% | K ₂ O: 18% |
| T3 | MgSO ₄ 5H ₂ O | Sulfato de Magnesio | MgO: 16,7% | S: 13% |
| T4 | ----- | Sin fertilización foliar | ----- | ----- |

III C. 3 Variables evaluadas

Las aplicaciones se realizaron cada dos semanas durante seis meses y la frecuencia de medición de variables fue cada cuatro semanas, se evaluó la severidad del ataque del hongo para cada tratamiento y se calculó el índice de severidad; además se tomaron análisis foliares al final del experimento para analizar los nutrientes presentes en el tejido foliar y las diferencias que existían entre los tratamientos y estos con respecto a otros análisis obtenidos anteriormente, para un total de cuatro análisis foliares. Se tomaron ocho hojas de la segunda corona de arriba hacia abajo, según el método de muestreo utilizado en plantaciones comerciales.

3.2.4 Elaboración de manual informativo referente al cultivo de *C. revoluta*.

Durante el transcurso de la investigación se consultaron fuentes bibliográficas, periódicos, revistas especializadas, comunicaciones personales con productores expertos en el cultivo de cicas; se tomaron fotografías que fueron incluidas para ilustrar y confeccionar un manual con información sobre historia, biología, estudios científicos y manejo agronómico del cultivo de *C. revoluta*. El manual descrito cuenta con varias partes, entre ellas las generalidades del cultivo, historia, manejo agronómico en plantaciones extensivas y plagas más comunes en Costa Rica.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Etapa I. Determinación del ritmo de emisión foliar en *Cycas revoluta* y elaboración de escala fotográfica de principales fases.

I A. Ritmo de emisión foliar

Se analizaron plantas provenientes del Grupo A y Grupo B. En el Cuadro 8, se muestra el resultado de la prueba LSD Fisher al 5% de las variables Longitud y Ancho de la hoja en centímetros.

- **Longitud de hoja**

Según Cuadro 8, al transcurrir dos días después de la emergencia del brote (2 DDE), las plantas presentaron diferencias significativas respecto a la longitud de la hoja, hasta transcurridos doce días (12 DDE), en el Grupo A pasó de 2,95 cm a 14,75 cm mientras que para el Grupo B el crecimiento fue de 4,02 cm – 22,29 cm; a partir de los doce días en adelante, incluso hasta 22 días (22 DDE), las diferencias en la longitud no fueron significativas (Grupo A: 14,75 cm a 16,54 cm y Grupo B: 22,29 a 24,58 cm), periodo durante el cual se diferenciaron principalmente de manera visual, la tonalidad del color de las hojas, estas se tornaron más oscuras y el tejido fue adquiriendo dureza conforme fueron pasando los días.

La media de la longitud de las hojas del Grupo A fue 8,04 cm menor que la media de las plantas del Grupo B, las cuales eran de mayor tamaño (entre 10 - 12 cm de diámetro) en comparación con las del Grupo A (entre 6-7 cm de diámetro).

- **Ancho de la hoja**

En el caso de la variable Ancho de la hoja (Cuadro 8), se observó un comportamiento similar en ambos grupos, en el Grupo A la apertura pasó de 0,25 cm a 7,72 cm, mientras que para el Grupo B alcanzaron un mayor tamaño pasando de 0,56 cm a 8,49 cm; a partir de 18 días (18DDE) el ancho de la hoja aumentó levemente (Grupo A: de 7,45 cm a 7,72 cm y Grupo B: 8,45 cm a 8,49 cm), no mostraron diferencias significativas entre las observaciones.

Cuadro 8. Resultado de la Prueba de Medias LSD Fisher (5%), de las variables Longitud y Ancho de la hoja comparando dos grupos de plantas de *C. revoluta*. Etapa I, ITCR 2014.

| ETAPA | DDE | Longitud de la hoja (cm) | | Ancho de la hoja (cm) | |
|-------|-----|--------------------------|---------------------|-----------------------|-------------------|
| | | Grupo A | Grupo B | Grupo A | Grupo B |
| V1 | 0 | 2,95 ^a | 4,02 ^a | 0,25 ^a | 0,56 ^a |
| | 2 | 4,33 ^a | 6,29 ^b | 0,36 ^a | 0,83 ^a |
| | 4 | 6,37 ^b | 10,08 ^c | 0,52 ^a | 1,67 ^b |
| V2 | 6 | 8,62 ^c | 13,61 ^d | 0,86 ^a | 2,62 ^c |
| | 8 | 11,01 ^d | 17,72 ^e | 2,19 ^b | 4,07 ^d |
| | 10 | 12,93 ^e | 20,58 ^f | 3,59 ^c | 5,62 ^e |
| V3 | 12 | 14,75 ^f | 22,29 ^g | 5,3 ^d | 7,04 ^f |
| | 14 | 15,55 ^{fg} | 23,44 ^{gh} | 6,72 ^e | 8,12 ^g |
| | 16 | 16,13 ^{fg} | 23,92 ^{gh} | 7,45 ^f | 8,45 ^g |
| V4 | 18 | 16,52 ^g | 24,04 ^h | 7,71 ^f | 8,49 ^g |
| | 20 | 16,63 ^g | 24,05 ^h | 7,72 ^f | 8,49 ^g |
| | 22 | 16,64 ^g | 24,58 ^h | 7,72 ^f | 8,49 ^g |

^{abcdehg} Letras distintas en la misma columna difieren significativamente ($p < 0,05$).

El Análisis de Varianza indicó que existieron diferencias entre las observaciones del Grupo A ($p < 0,0001$) y el Grupo B ($p < 0,0001$), en la Figura 10, se presenta gráficamente la longitud de la hoja de *C. revoluta* de los dos grupos (A y B) en condiciones de invernadero según las etapas propuestas. Se observa que el crecimiento acelerado se dio en las etapas V1 y V2.

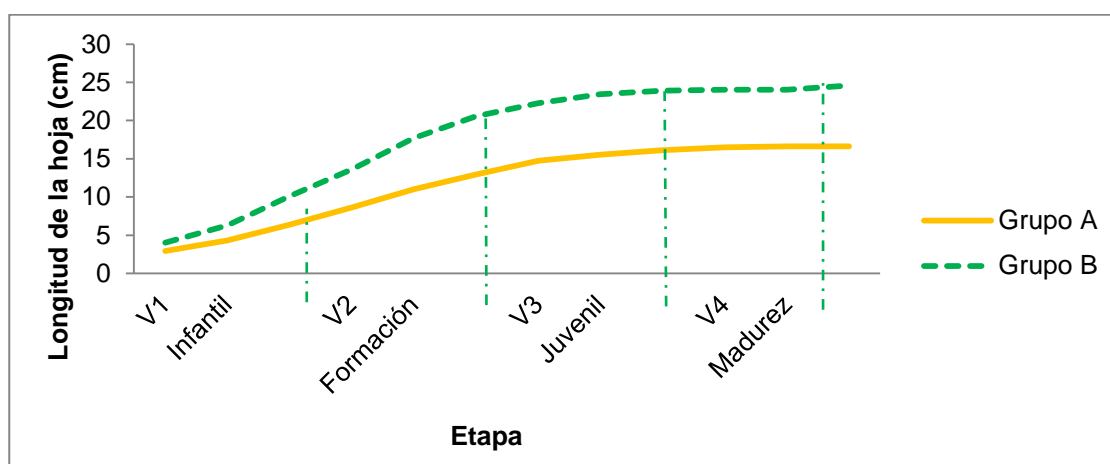


Figura 10. Longitud de la hoja (cm) de *Cycas revoluta* Grupo A y B, según etapas determinadas en condiciones de invernadero. Etapa I, ITCR 2014.

En la Figura 11 se observa el proceso de apertura de la hoja de *C. revoluta*; en donde desde la Etapa V1 hasta la V3 existió un crecimiento acelerado, mientras que en la Etapa V4 muestra un ancho constante en el que no existen cambios.

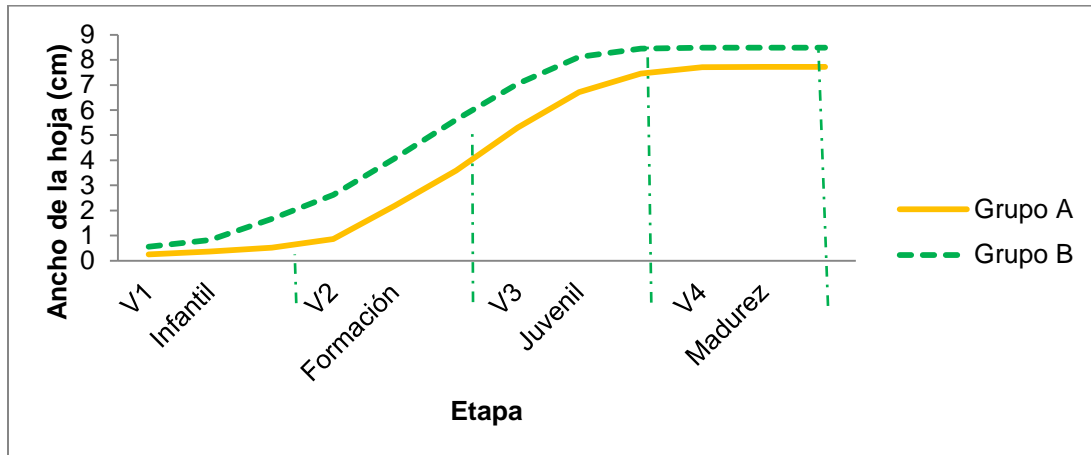


Figura 11. Ancho de la hoja (cm) de *Cycas revoluta* según etapas determinadas en condiciones de invernadero. Etapa I, ITCR 2014.

Cabe destacar que se registró el número de hojas en cada corona emitida por *C. revoluta* en condiciones de invernadero; las plantas de ambos grupos únicamente presentaron un brote de hojas transcurridos diez meses, en el Cuadro 9 observa que el brote estaba conformado por de cuatro hojas en promedio para el Grupo A y siete hojas en las plantas del Grupo B; en cuanto a la duración en días para que cada corona fuera emitida en plantas del Grupo A presentó un promedio de 52 días transcurridos desde la siembra hasta la emergencia del primer brote y por otro lado 72 días en el Grupo B. En el Cuadro 9 se muestra la variabilidad que existió entre la emergencia de la corona de hojas (Grupo A: CV=41,97% y Grupo B: CV=5,56%).

Cuadro 9. Variables obtenidas a partir de las observaciones de emisión foliar durante 10 meses. Etapa I, ITCR 2014.

| Variable | Grupo A | Grupo B |
|--|----------------|----------------|
| Número de hojas por corona | 4 | 7 |
| Días después de siembra en emerger corona de hojas | | |
| Promedio | 52 | 72 |
| Máximo | 84 | 93 |
| Mínimo | 10 | 67 |
| CV % | 41,97 | 8,56 |
| SD | 21,77 | 6,22 |

Debido al comportamiento de la emisión foliar de *C. revoluta*, se determinó necesaria la existencia de cuatro etapas V1, V2, V3 y V4, las cuales a su vez se subdividieran en tres fases con una duración de dos días cada fase. Por lo tanto cada etapa tardaría seis días aproximadamente.

La utilidad de conocer acerca de las fases de desarrollo de una planta, es que se puede tener una aproximación de la etapa de crecimiento, para tener un punto de referencia cuando se está hablando de periodos de susceptibilidad a las plagas, aplicaciones de agroquímicos o etapas críticas; en cuanto a la eficiencia, Whitelaw *et al.* (2007), mencionan la importancia que se estudie el hospedero para el manejo de enfermedades provocadas por un determinado patógeno.

Cabe destacar que al realizar una poda total de las plantas del Grupo A, que se mantenían en observación, se determinó que en promedio, emiten el primer brote a los 28 días después de la poda; mientras que para las plantas de Grupo B, emitieron otro brote de hojas transcurridos 22 días después de la poda, es probable que se relacione con el diámetro del bulbo; entre mayor sea el diámetro, existe mayor rapidez para emerger el brote de hojas. Las plantas que no fueron podadas no volvieron a emitir otro brote. Es posible que las plantas entraran en un periodo de dormancia y que la poda estimulara la emisión foliar.

- **Diámetro del bulbo**

El diámetro del bulbo de las cicas del Grupo A en observación, presentó una disminución conforme pasó el tiempo, a partir de los nueve meses después de la siembra. Existe la posibilidad de que el bulbo no haya aumentado el grosor en un periodo de más de un año por estar sembrado en una maceta y no a campo

abierto, donde normalmente se ubican las plantaciones comerciales. Marler y Moore (2010) destacan que *C. revoluta* tiende a ser una planta que se adapta al recipiente en el que esté sembrada y disminuye la velocidad de crecimiento cuando se encuentra con espacio limitado. Se descartó esta variable debido a la dificultad para medir el diámetro.

Se examinaron dos plantas, una de cada grupo, en la Figura 12, se observa la sintomatología presentada, no tenían sistema radical desarrollado, se estaba alimentando únicamente de las reservas de carbohidratos del bulbo y es posible que por ello presentar disminución en el diámetro.

El bulbo enfermo, presentó una coloración interna rojiza (Figura 12), con apariencia corchosa en la parte baja donde suponía el crecimiento de raíces; mientras que el bulbo sano, mostraba internamente un color amarillo claro abundante sistema radical completamente sano.

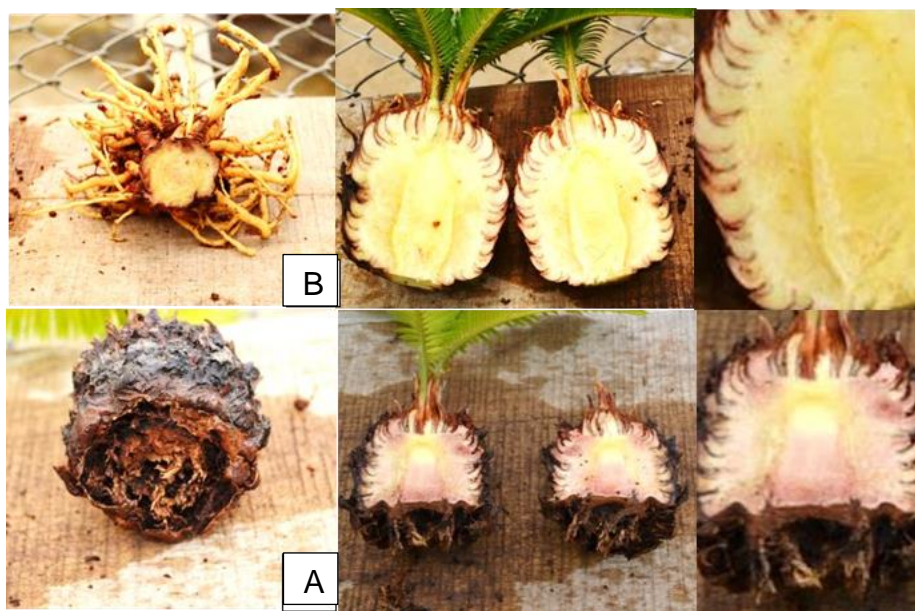














Figura 12. A Planta enferma del Grupo A. B. Plantas sana del Grupo. Etapa I, ITCR 2014.

I B. Escala fotográfica de las principales etapas de emisión foliar

Para efectos prácticos se diseñó la siguiente escala fotográfica de los cambios de la hoja de *C. revoluta* presentada en la Figura 13, con el fin de entender con facilidad las etapas identificadas como V1, V2, V3 y V4, estas fueron subdivididas

en A, B, C; dicho código es válido para aumentar la precisión con la que se quiere dar a conocer el estado de la corona de hojas de una planta. Se indican los días después de emergido el brote de hojas y una breve descripción de cada fase; es importante tener claro que no siempre es válido hacer referencia únicamente al número de días de emergida, debido a que algunas veces el brote de hojas se puede atrasar o adelantar en la fase, además que es difícil llevar el conteo de los días de emergido el brote de cada planta en campo, por ello se planteó que las fases debían ser determinadas más bien por el aspecto visual de las hojas, lo que funciona como base para que cualquier persona pueda identificar la fase de desarrollo en la que se encuentre la última corona de hojas de una planta de *C. revoluta*.

| Ritmo de emisión foliar de <i>Cycas revoluta</i> en condiciones de invernadero | | | Etapa | Nombre | Descripción |
|---|---|---|---------------|-----------|---|
|  |  |  | V1 (A,B,C) | Infantil | Corresponde al crecimiento y división celular acelerada que se da durante el día de emergencia y transcurridos 4 días después de emergencia (4 DDE) aproximadamente. Las hojas aún no se han desarrollado y conservan margen revoluta. Esta etapa, se subdivide en tres fases que son: A: En donde solamente se observa una estructura formada por el raquis de la hoja, están los foliolos en formación; puede medir entre 3 - 5 cm de alto y 0,5-1 cm de ancho, dependiendo de tamaño final de la hoja y generalmente se encuentra cerrado durante esta fase. B: Se da 2 DDE aproximadamente. La estructura formada por el raquis adquiere mayor altura pero aún no se ha dado la apertura de los foliolos. C: En algunos casos puede verse la apertura transcurridos 4 DDE aproximadamente, pero dependiendo del tamaño final de la hoja. En esta fase el raquis puede seguir adquiriendo altura. |
| A 0 DDE | B 2 DDE | C 4 DDE | | | |
|  |  |  | V2 (A,B,C) | Formación | Corresponde a la apertura de los foliolos y formación de la hoja, esto se puede observar entre 6 a 10 DDE aproximadamente. Comprende tres fases: A. Inicio de apertura foliar, al menos una de las hojas debe presentar esta característica, el ancho de la hoja puede medir entre 1,0 a 1,3 cm. B. Las hojas adquieren una forma definida, pero no ha finalizado la apertura; al ser tejido en formación la consistencia de los foliolos es blanda. C. Ya ha finalizado la formación de la hoja, puede existir al menos una hoja atrasada que está en apertura. |
| A 6 DDE | B 8 DDE | C 10 DDE | | | |
|  |  |  | V3 (A,B,C) | Juvenil | Esta etapa se centra en el endurecimiento de las hojas, puede encontrarse entre los 12 y 16 DDE aproximadamente. Está compuesta por tres fases: A. Pueden existir foliolos finalizando la etapa de formación, se da el inicio del endurecimiento de los foliolos de la hoja que antes eran blandos y susceptibles a daños físicos. B. La hoja va adquiriendo la dureza necesaria para la formación de espinas en la punta de los foliolos. C. Los foliolos adquieren una dureza aceptable para que inicie el cambio en la coloración. |
| A 12 DDE | B 14 DDE | C 16 DDE | | | |
|  |  |  | V4 (A,B,C) | Madurez | Corresponde a la etapa de cambio de coloración de las hojas y probablemente acumulación de carbohidratos en el bulbo. Estas van adquiriendo una tonalidad más oscura y ya tienen la dureza necesaria para soportar daños en la superficie. No hay cambio en crecimiento. Proceso para convertirse en una hoja madura, se divide en tres fases: A. B. C. que van desde 18 a 22 DDE aproximadamente. Luego de estas fases, no existen cambios visibles en apariencia ni tamaño (las primeras plantas en emerger se midieron hasta 32 DDE y no hubo cambios significativos). |
| A 18 DDE | B 20 DDE | C 22 DDE | | | |

M Sánchez, 2014

Figura 13. Escala fotográfica de las principales etapas y sus respectivas fases de emisión foliar en *C. revoluta* en condiciones de invernadero. Sánchez, M. ITCR 2014.

4.2 Etapa II. Identificación del agente causal de la chasparria en *Cycas revoluta* y la fase de la hoja más susceptible a la infección por patógenos.

II A. Identificación del agente causal

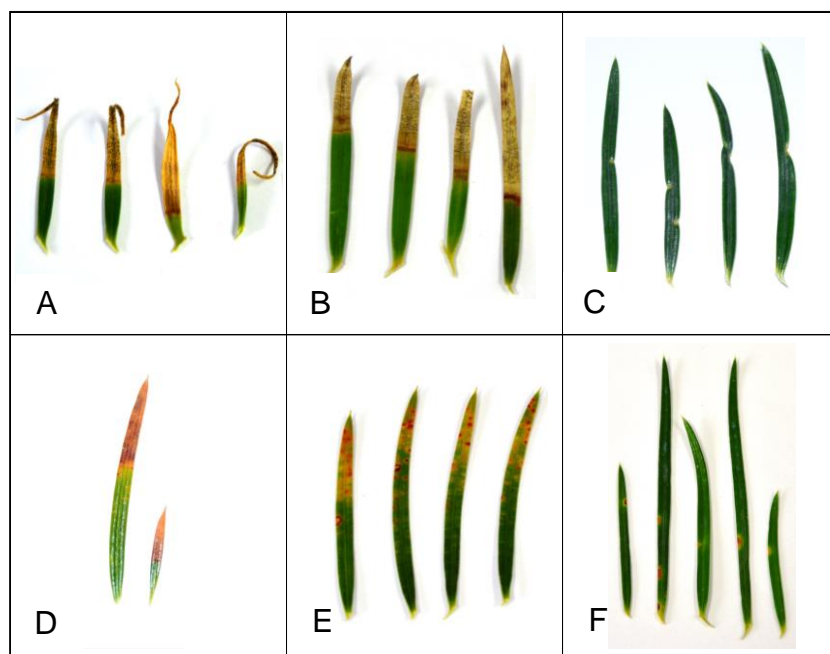
Agrios (2005), menciona la importancia de conocer primero acerca de la capacidad de respuesta del patógeno ante las condiciones del medio en el que se desarrolla, es decir la biología, etiología y epidemiología del organismo. Para determinar si un hongo es un organismo patógeno de ciertas plantas, es necesario el estudio microscópico de la morfología del micelio, estructuras reproductivas y apariencia de esporas, y que es necesaria la búsqueda de literatura para saber si ha sido reportado y en qué planta(s) se ha presentado. Ante la posibilidad de la similitud del hongo identificado al descrito en la literatura, se hace necesario aislar en medios de cultivo nutritivos, obtener cultivos puros y realizar análisis moleculares para tener mayor seguridad (Agrios 2005; Abarenkov *et al.* 2010).

En el caso de la presente investigación, se hizo necesaria la aplicación de los postulados de Koch, debido a que se desconocía el patógeno que estaba provocando la enfermedad y no existen registros que apoyen alguna patología en específico .

- **Categorización de síntomas**

La descripción de la totalidad de síntomas presentados en campo se encuentra en el Anexo 4; sin embargo las lesiones más frecuentes encontradas se resumen en la Figura 14, en donde la lesión categorizada como A, se refiere a un encrespamiento del extremo superior de los folíolos y desecamiento del tejido; la cual es una de las lesiones características de hojas nuevas o en etapa V3; en cuanto a la lesión B, no hay encrespamiento, la hoja se vuelve rígida pero quebradiza y desecada, la lesión inicia desde el extremo hacia dentro, hay presencia de puntos negros sobre la lesión, es común observarla en hojas viejas o en etapa V4; la lesión C, es concéntrica inicia en el borde lateral del folíolo, algunas veces lo deforma, es común observarlo a cualquier etapa durante la emisión foliar; por otra parte la lesión D, tiene aspecto marrón que inicia desde el extremo superior del folíolo, el tejido se vuelve rígido pero mantiene la coloración

característica; por último las lesiones E y F consisten en puntos cloróticos en la superficie de la hoja, alcanzan tonalidades amarillo - naranja, no tienen forma definida, inician en el borde, no hay deformación y aparecen en cualquier parte del foliolo, observados principalmente en hojas V4, en estado de senescencia.



Fuente: Sánchez, 2013

Figura 14. Categorización de los daños por chasparria en campo, lesiones aisladas en Laboratorio de Fitopatología de CORBANA S.A. Etapa II, Guápiles 2014.

- **Identificación taxonómica**

La identificación taxonómica basada en morfología generalmente presenta ambigüedad cuando se quieren establecer diferencias entre especies como en el caso de *Colletotrichum* según Cai *et al.* (2009) y Prihastuti *et al.* (2009), por ello se hizo necesaria la identificación a nivel molecular de los patógenos aislados de las lesiones en campo.

Por otro lado Cannon *et al.* (2000, citado por Phoulivong 2011), indican que los análisis de ácidos nucleicos proporcionan la mayor confiabilidad para la clasificación de las especies de *Colletotrichum*, debido a que no están predeterminadas por factores ambientales. Las bases de datos contienen secuencias de nucleótidos a nivel molecular, que son característicos de ciertas

especies, de esta manera es posible la identificación rigurosa, por medio del ADN y la comparación de secuenciaciones obtenidas por análisis PCR.

Las bases de datos NCBI (National Center for Biotechnology Information) y UNITE, se encuentran relacionadas, colaboran para INSD (International Nucleotide Sequence Data); esta última trabaja con FESIN (Fungal Environmental Sampling and Informatics Network), para procesar y analizar muestras correctamente. UNITE es una base de datos abierta para consultas, los usuarios no pueden hacer modificaciones en secuencias introducidas por otros autores, esto para asegurar mayor confiabilidad en los registros (Abarenkov *et al.* 2010).

Debido a la cantidad diversa de patógenos encontrados en las lesiones aisladas, se determinó que la lesión A, fue causada por *Colletotrichum proteae*, según UNITE (Cuadro 10), sin embargo en NCBI no se logró identificar a nivel de especie; el caso de *Fusarium* sp., puede ser posible que actúe como saprófito o patógeno oportunista, aprovechando la lesión originada por *C. proteae*.

Para la lesión B, se vuelven a encontrar los hongos *C. proteae* y *N. sphaerica*, pero en este caso el oportunista puede que sea *Aspergillus* sp. En el caso de la lesión C, es interesante encontrar que se identificó *N. sphaerica* y no así *C. proteae*, pero de igual manera apareció el género *Fusarium* sp. y *Cochliobolus geniculatus*, el cual fue un patógeno de menor frecuencia de aparición en anteriores aislamientos realizados por CORBANA S.A. Para la lesión D, E y F, se identificó el patógeno llamado *Pestalotiopsis foedans* el cual ya había sido aislado de lesiones que presentaban esa coloración rojiza. Por último, el hongo aislado en la lesión D, se refiere a *Davidiella tassiana*, el cual tampoco fue tomado en cuenta porque era la primera vez que figuraba en los aislamientos de lesiones en *C. revoluta*.

Cuadro 10. Identificación taxonómica¹ de hongos aislados de las lesiones categorizadas como A, B, C, D y E-F y el % de confiabilidad. Etapa II, CORBANA S.A 2014. (Anexo 3)

| Muestra | Organismo coincidentes RDP/UNITE | | % conf. | Organismo coincidentes NCBI | | % conf. |
|---------|----------------------------------|--------------------|---------|-----------------------------|------------------------|---------|
| A1 | <i>Fusarium</i> | sp. | 95 | <i>Fusarium</i> | sp. | 99 |
| A2 | <i>Colletotrichum</i> | <i>proteae</i> | 95 | <i>Colletotrichum</i> | sp. | 99 |
| A3 | <i>Nigrospora</i> | <i>sphaerica</i> | 95 | <i>Nigrospora</i> | <i>Sphaerica</i> | 99 |
| B1 | <i>Nigrospora</i> | <i>sphaerica</i> | 95 | <i>Nigrospora</i> | <i>Sphaerica</i> | 99 |
| B2 | <i>Colletotrichum</i> | <i>proteae</i> | 95 | <i>Colletotrichum</i> | <i>Gloeosporioides</i> | 99 |
| B3 | <i>Aspergillus</i> | sp. | 95 | <i>Aspergillus</i> | sp. | 100 |
| C1 | <i>Cochliobolus</i> | <i>geniculatus</i> | 95 | <i>Cochliobolus</i> | <i>Geniculatus</i> | 99 |
| C2 | <i>Fusarium</i> | sp. | 95 | <i>Fusarium</i> | sp. | 100 |
| C3 | <i>Nigrospora</i> | <i>sphaerica</i> | 95 | <i>Nigrospora</i> | <i>Sphaerica</i> | 99 |
| D1 | <i>Pestalotiopsis</i> | <i>foedans</i> | 95 | <i>Pestalotiopsis</i> | Sp | 99 |
| D2 | <i>Davidiella</i> | <i>tassiana</i> | 95 | <i>Cladosporium</i> | sp. | 100 |
| E-F | <i>Pestalotiopsis</i> | <i>foedans</i> | +95 | <i>Pestalotiopsis</i> | <i>Clavispora</i> | 99 |

¹Resultados brindados por el laboratorio de biología molecular de CORBANA S.A. (bases de datos consultadas RDP/UNITE y NCBI), secuenciación obtenida de análisis moleculares.

C. proteae fue identificado por Liu, Damm, Cai y Crous (MycoBank MB 802498) en el 2013, se aisló del género *Protea* en Sudáfrica. Es importante mencionar que las muestras A2 y B2 para la base de datos RDP/UNITE se considera como *Colletotrichum proteae*, sin embargo no fueron coincidentes en la identificación según NCBI, la cual indicó que para el A2 se identificó hasta nivel de género, mientras que para el B2, se identificó el patógeno *C. gloesporioides*, que se encuentra relacionado con la especie *proteae* descrita por Liu, Damm, Cai y Crous en el 2013. Dichos autores determinaron que en el complejo *C. gloesporioides* existían seis especies asociadas, entre las cuales se encontró un nuevo taxón denominado *C. proteae*, la secuenciación se encuentra en ambas bases de datos y la información fue suministrada por los autores que la identificaron.

Lubbe y otros investigadores en el 2004, publicaron que existían cuatro especies de *Colletotrichum* asociadas a enfermedades en la familia Proteaceae que en su mayoría son encontradas en Australia, Sur África, América central, Sur América y Sureste de Islas del pacífico, esta familia de plantas tienen importancia para la comercialización de flores según Rebelo (1995), citado por Lubbe *et al.* (2004). Lubbe *et al.*, durante una investigación realizada en Sudáfrica (2004),

indicó que dentro del género de plantas *Protea* se encuentran las especies de *Colletotrichum* más devastadoras que limitan la producción y pertenecen al complejo *C. gloeosporioides*, entre las cuales se encuentran: *C. acutatum*, *C. acutatum* f. sp. *hakea*, *C. boninense*, *C. crassipes*, *C. gloeosporioides* f. *protea* (from *protea*). En el 2006 Lubbe *et al.*, identificaron que *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* f. *protea* fueron los patógenos que se asociaron principalmente con necrosis foliar en cultivares del género *protea*.

Crous *et al.* (2000), mencionan que enfermedades provenientes de proteaceas han sido introducidas en otros países como patógenos latentes en semillas o cortes de tejido, debido a esto, es necesario tratar las enfermedades desde el centro de origen de dichas plantas o de donde hayan sido reportadas en otros cultivos, como en Estados Unidos, Europa, Israel entre otros; además que patógenos involucrados con miembros de la familia Proteaceae han sido introducidos a Australia desde Sudáfrica, por ello uno de los mayores impedimentos para la importación de estas especies es la introducción de enfermedades patogénicas, que antes se creían que eran específicas de dicho hospedero. Cabe resaltar que tal como lo indica Cai *et al.* (2009) y Hyde *et al.* (2009) las especies del género *Colletotrichum* son cosmopolitas y una misma especie puede afectar varios hospederos como en este caso que afecta a las especies de la familia Proteaceae y *Cycas revoluta*.

- **Inoculaciones controladas**

En las primeras inoculaciones realizadas con *Colletotrichum* sp, *Fusarium* sp. *Nigrospora* sp. y *Sclerotium* sp., no se tuvo éxito, las condiciones de humedad, viabilidad y concentración del inóculo no fueron las adecuadas, las plantas no se vieron afectadas por la suspensión de conidios aplicada sobre la superficie de las hojas, a pesar de que se varió la metodología de inoculaciones tampoco se obtuvieron resultados positivos. Es importante mencionar que en un estudio realizado por Lubbe *et al.* (2006) mencionan que al realizar las inoculaciones con *C. gloeosporioides* bajo condiciones controladas presentaron dificultades para que se diera el desarrollo de la enfermedad, se intentaron varias metodologías, entre ellas se dio la introducción directa del patógeno en el tejido, daño mecánico en hojas o tallos simulando el ataque de insectos y rocío de suspensión de conidios sobre la

superficie de las hojas a una concentración 1×10^6 esporas por mililitro más un producto adherente (Tween 20), utilizaron 10 ml por planta en cada intento de inoculación que realizaron.

En las inoculaciones posteriores, todas con *Colletotrichum proteae* (identificados como A2 y B2 en Cuadro 10), se determinó el principal síntoma en etapas V1, V2 y V3 (Figura 15) presentó un Periodo de Incubación (PI): 3-5 días y un Periodo de Latencia (PL): 6 días. Agrios (2005), menciona que para que la enfermedad se reproduzca tienen que interactuar ciertos componentes entre los cuales se encuentran el patógeno, el hospedero y las condiciones ambientales; esto es conocido como el triángulo de la enfermedad, si las condiciones ambientales son extremas es posible que el patógeno no pueda atacar al hospedante, incluso que aumente o disminuya la severidad del daño y que exista cierta resistencia. También puede suceder que aunque hospedante y patógeno estén en contacto, algunas veces puede que no se desarrolle la enfermedad.

Al realizarse las inoculaciones iniciales, se utilizó una cámara de humedad de un menor tamaño (70 x 40 x 40 cm) que la utilizada posteriormente (70 x 70 x 120 cm), de esta manera la temperatura fue mayor en la cámara de humedad más pequeña (38°C - 40°C) durante las horas más soleadas del día (9:00 am – 2:00 pm) y esto pudo haber afectado el desarrollo de la enfermedad. También otro aspecto fue que las cepas utilizadas en las primeras inoculaciones pudieron ser menos virulentas que las A2 y B2 inoculadas en los últimos intentos.

La humedad relativa y la disponibilidad de agua son factores importantes en el desarrollo de la enfermedad según Agrios (2005), debido a que es necesaria la disponibilidad de una película de agua para que las esporas de los patógenos puedan depositarse y germinar; por ello existieron diferencias cuando se utilizó el atomizador manual para asperjar agua comparado con los microaspersores – nebulizadores utilizados en la cámara grande de humedad; aunque en la cámara pequeña también se lograba una humedad relativa de 99%; fue necesaria la simulación de la lluvia o rocío sobre las hojas de la planta y sumado a esto, temperatura relativamente baja (28°C - 30°C). Forsberg (1993), citado por Lubbe *et al.* (2004), mencionan que la ocurrencia de este tipo de enfermedades en plantas

proteáceas cultivadas en campo también están definidas por condiciones climáticas moderadas (20°C - 25°C), humedad relativa y altos niveles de inóculo (Forsberg 1993, citado por Lubbe *et al.* 2004).

Al inocular *C. proteae*, se presentaron síntomas como los que se muestran en la Figura 15; se observó al principio una lesión que deforma la hoja levemente, el tejido afectado se tornó de color grisáceo, se transformó en una lesión húmeda y necrosada, que debilitó el foliolo, deshidrató el tejido y se volvió propensa a la entrada de otros patógenos; permitiendo observar las estructuras reproductivas a los dos - tres días de haber aparecido la lesión. Es posible que después de las etapas iniciales de la infección se dé la abscisión de una parte del foliolo. Los acérvulos se encontraron al siguiente día de haber aparecido el primer síntoma, se pueden observar puntos negros en la lesión húmeda que se fueron deshidratando.



Figura 15. Sintomatología presentada en las plantas que fueron inoculadas con *C. proteae* transcurridos desde tres a cinco días. Síntomas semejantes a los encontrados en campo. Etapa II, ITCR 2014.

En la Figura 16, se presentan las principales lesiones que aparecieron por las inoculaciones realizadas con *C. proteae*, es el síntoma característico de la enfermedad, siempre estuvo presente, consistió en una lesión color grisáceo al inicio, de apariencia húmeda, luego se tornó de color café y se secó; el tejido alrededor de la lesión empezó a formar estructuras de defensa, círculos concéntricos; se observaron los acérvulos en el tejido necrosado, la mayoría del tiempo la entrada del hongo se dio por la parte media del foliolo, pero también afectó desde el extremo o la base del foliolo.

Liu *et al.* (2013) mencionan que Knox (1981), Knox *et al.* (1986) y Crous *et al.* (2004), determinaron los principales síntomas causados en proteáceas, entre ellos la muerte descendente o “*Damping off*”, necrosis foliar y en tallo; por otro lado The International Society for Horticultural Science (2007) mencionan antracnosis, un síntoma conocido como “steam die-back” y “*Colletotrichum die-back*”. En la Figura 16-B, C, E, se observa un estrangulamiento de la vena media de la hoja compuesta de *Cycas revoluta*, es similar a una herida (Figura 16-D) la cual que es causada por las estructuras del hongo, esta lesión es característica de la época lluviosa y más problemática aun cuando coincide con el momento de emisión foliar.

En cuanto la Figura 16-F, se puede observar otro tipo de lesión causada por el mismo patógeno, consiste en pequeñas deformaciones del tejido foliar, debido a la entrada o establecimiento de las estructuras del hongo en la planta. Esta lesión se encontró en plantas en estado V3 e incluso V4.

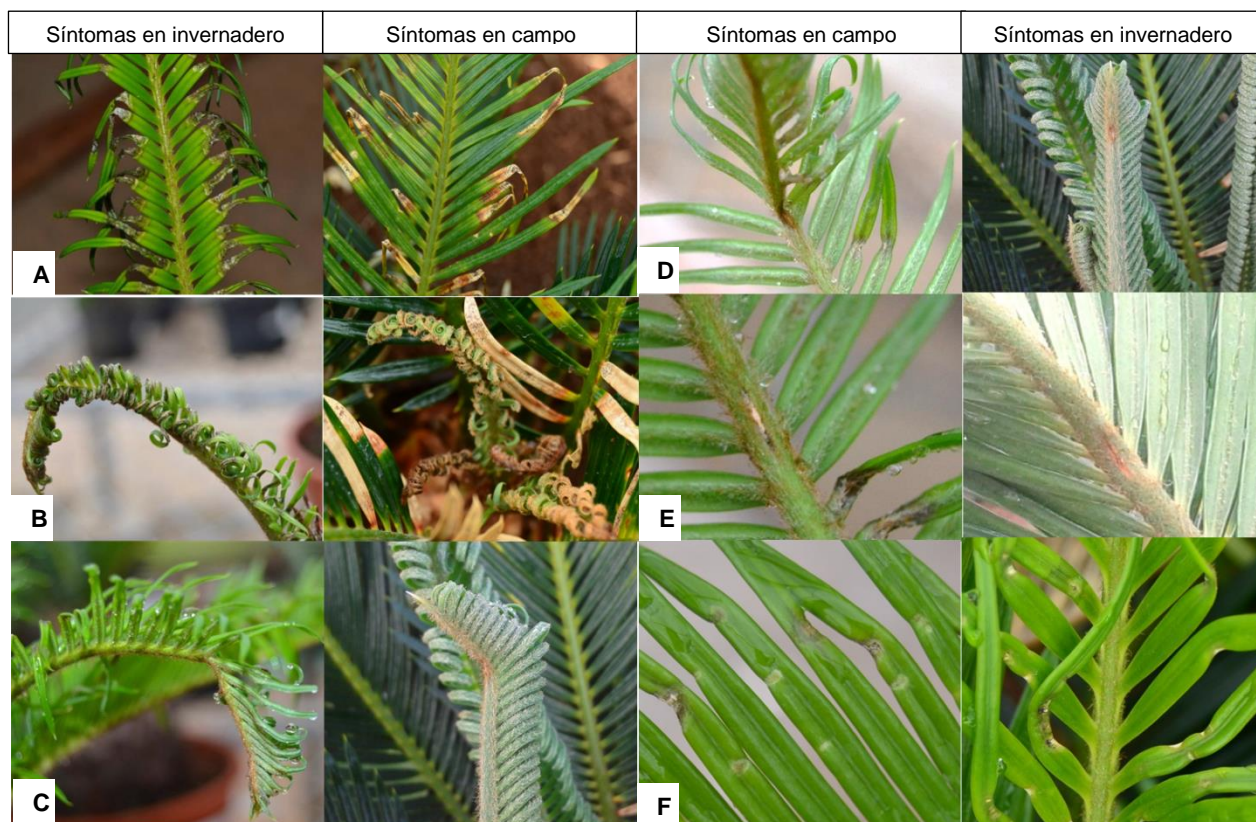


Figura 16. Contraste de la sintomatología presentada por las inoculaciones (A, B, C, D, E, F) con *C. proteae* a 1×10^5 conidios ml^{-1} de concentración y los presentados en la plantación enferma. Etapa II, ITCR 2014.

En la Figura 17 se observa la disminución en la concentración del inóculo, la cual no provoca una diferencia marcada en la severidad. No fue posible la identificación de algún agente que explicara la variabilidad de síntomas, a pesar de que se repitieron ocho veces las inoculaciones, los síntomas se vieron afectados por la cantidad del inóculo, siendo un ataque agresivo como se muestra en la Figura 16 el provocado por una concentración de 1×10^5 conidios por mililitro (Figuras 16), mientras que al hacerse la inoculación con una concentración de 2×10^4 conidios por mililitro, se observaron lesiones como las que se muestran en la Figura 17; pero el estrangulamiento del raquis, solamente se observó bajo la concentración más alta (1×10^5 conidios por mililitro). En las inoculaciones realizadas por Lubbe *et al.* (2006) se utilizaron concentraciones de 1×10^6 conidios por ml, la cual se puede categorizar como alta concentración.

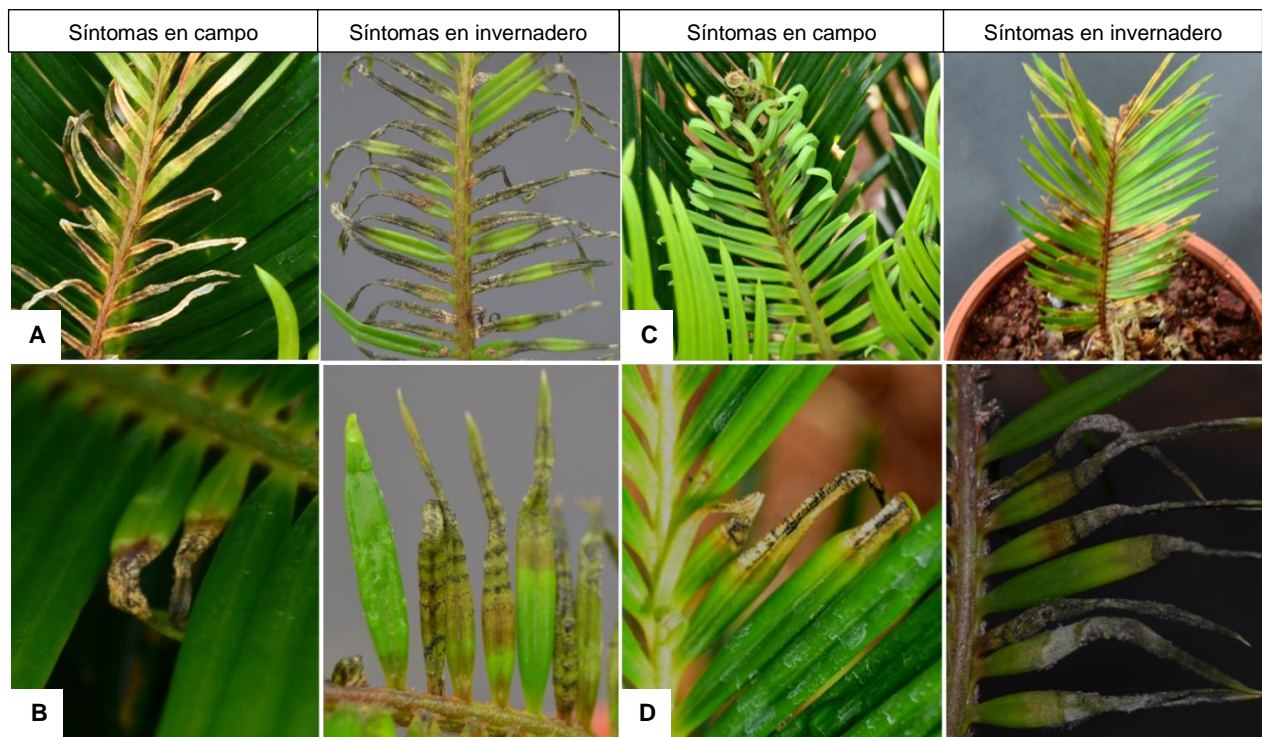


Figura 17. Contraste de la sintomatología presentada por las inoculaciones con *C. proteae* a 2×10^4 conidios ml^{-1} de concentración y los presentados en la plantación enferma (A, B, C, D). Etapa II, ITCR 2014.

- **Comprobación de síntomas**

Cai *et al.* (2009), mencionan que a la hora de identificar especies de *Colletotrichum*, es necesario que se tomen en cuenta características morfológicas como forma y tamaño de los conidios o acérvulos, conidios, conidióforos, setas y apresorios. Al realizar los re aislamientos de las lesiones presentadas por las inoculaciones (Figura 18), se observa la similitud entre características del patógeno inoculado y el patógeno re-aislado; en cuanto a las características fenotípicas, muchas veces el hongo no volvió a formar la misma colonia ni con la misma coloración que la anterior; sin embargo, se observaron los acérvulos formados y el micelio con tonos gris y amarillo. Los conidios tienen forma ovalada, bordes lisos, son abundantes y se mantienen en movimiento, algunas veces se les nota una constricción en la parte media, semejante a una cintura o célula binucleada.

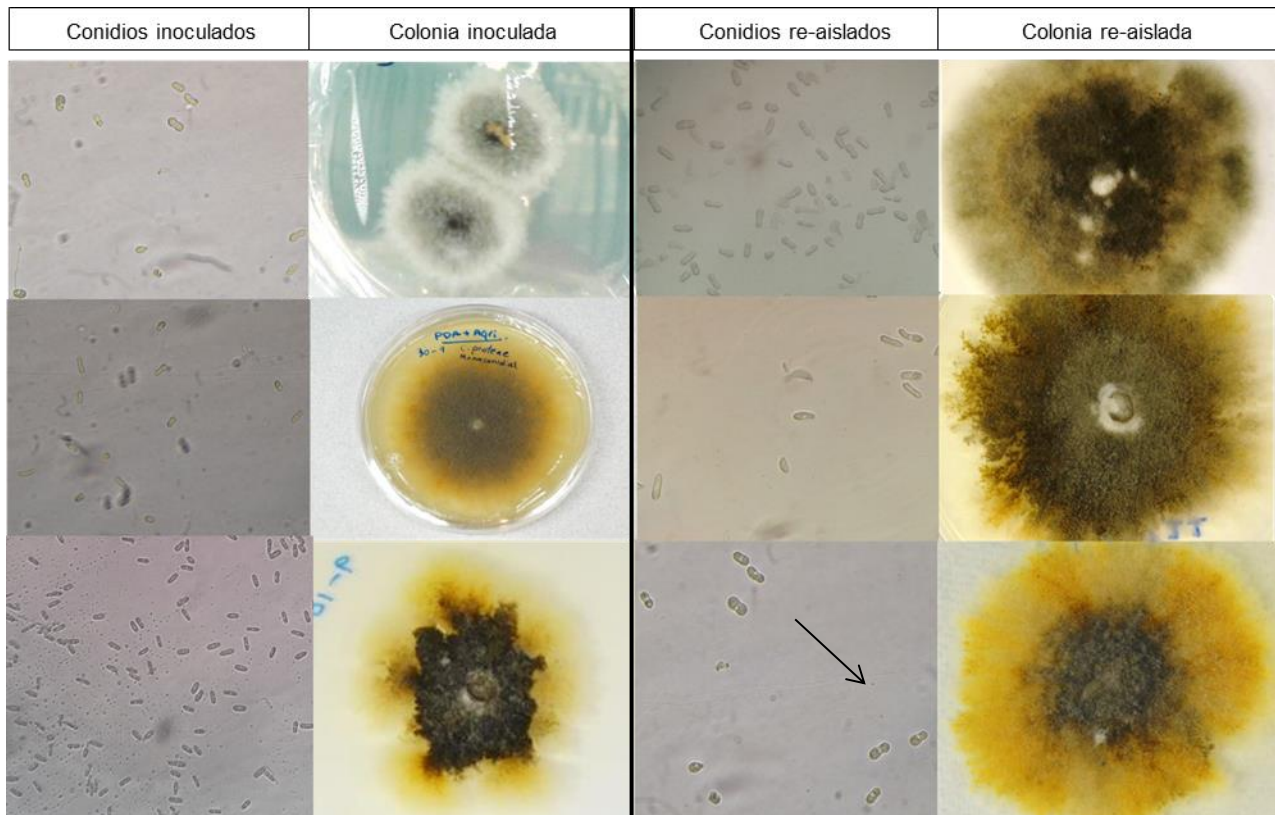
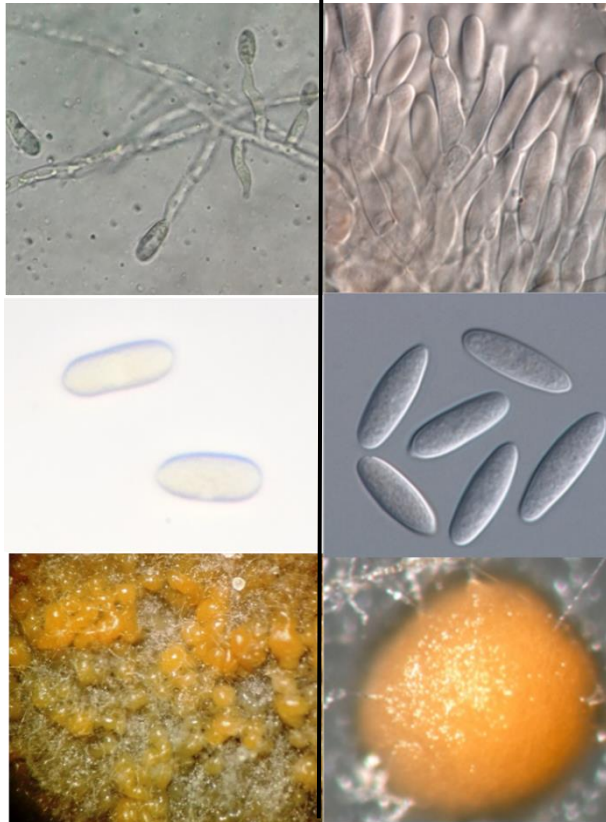


Figura 18. Contraste de los conidios y la colonia de *C. proteae*, durante comprobación de los postulados de Koch. Etapa II, ITCR 2014.



Fuente: Sánchez 2014 Fuente: Liu *et al.* 2013

Figura 19. Comparación de los conidióforos, conidios y acérvulos de la colonia de *C. proteae* aislada de *C. revoluta*, Etapa II ITCR 2014, con respecto a la especie proveniente de *Protea* sp identificada por Liu *et al.*, en el 2013.

En la Figura 19, el hongo identificado como *C. proteae* afectando a *C. revoluta*, se compara con el hongo determinado por Liu *et al.* (2013), como *C. proteae*, aislado por primera vez de la familia de las proteáceas. Se puede observar que existe cierta similitud en las características que se indican en la teoría, como la forma de los conidióforos y acérvulos; sin embargo, los acérvulos no siempre están presentes de color naranja, la mayoría de las veces son negros o grisáceos a menos que sean sometidos a algún tipo de estrés; los conidios del hongo identificado en la presente investigación, no siempre tienen una forma ovalada lisa perfecta, pero de igual manera fueron identificados molecularmente por RDP/UNITE como pertenecientes a la especie *proteae*.

Entre las principales características descritas por Liu *et al.* (2013) están, hifas hialinas, no se observaron clamidiosporas, hubo presencia de acérvulos color naranja, solamente se observó una seta color café claro, conidióforos y conidios hialinos de forma cilíndrica, elongados, fusiformes a elipsoidales; la forma de los conidios son comunes en especies del complejo *C. acutatum* (Damm *et al.* 2012^a; citado por Liu *et al.* 2013).

En cuanto a la colonia formada por el patógeno en PDA Liu *et al.* (2013) mencionan un diámetro micelial de 70 a 74 mm en 7 días, > 90 mm en diez días, se identificaron masas de micelio aéreas, color café claro; en SNA, la coloración se

presentó color miel y la masa de conidios color salmón o gris-plata, el diámetro aproximado de la colonia fue 61 a 65 mm en siete días, > 90 mm en diez días, demostrando por medio de secuencias de ADN, que *C. proteae* es perteneciente al complejo *C. gloesporioides*.

En la Figura 20, se puede observar las fotografías de la colonia formada por *C. proteae*, zetas que aparecieron solamente en algunos de los aislamientos, especialmente cuando estos fueron sometidos a algún tipo de estrés (expuestos a dosis de fungicidas) y acérvulos de color grisáceo y no naranja como en otros casos; estas estructuras fueron identificadas en aislamientos de *C. proteae*, sin embargo no se registraron en la descripción realizada por Lui *et al.* (2013) por ello, no se logró hacer una comparación con la literatura.

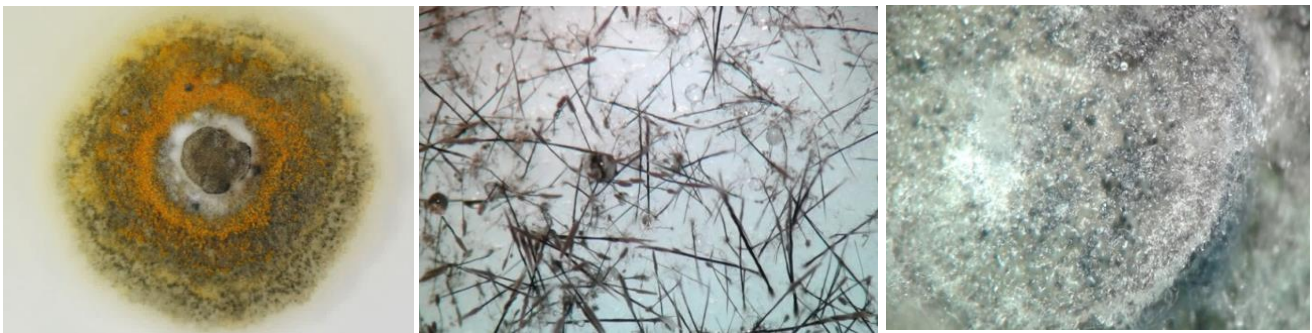


Figura 20. Estructuras observadas al estereoscopio en aislamientos de *C. proteae*. Etapa II, ITCR 2014.

- **Proceso de desarrollo de la enfermedad**

En la Figura 21 se observa el avance de la enfermedad desde los dos días post inoculación (DPI), en donde a los tres días (3 DPI) apareció el primer síntoma, lo que indicó la penetración del haustorio en el tejido vegetal, esto se refleja en la lesión necrótica ocasionada; transcurridos cuatro y cinco días (4 DPI y 5 DPI) se observaron estructuras reproductivas del hongo como los acérvulos de color negro, lo cual reflejó un inóculo secundario de la enfermedad, indicador de que se cumplió el ciclo reproductivo de *C. proteae*; a los ocho días se pudo observar que inició una despigmentación del foliolo bajo la lesión inicial, se dio el proceso necrótico pero esta vez presentando otro tipo de síntoma. Según Agrios (2005), este tipo de enfermedades se les llama policíclicas y son de rápida diseminación, los conidios

pueden viajar en gotas de agua y contagiar tejido cercano e incluso hojas nuevas en cualquier etapa. El mismo autor menciona que el ciclo de la enfermedad se refiere a la aparición, desarrollo y prevalencia de la infección; no precisamente está limitado al ciclo del patógeno. De manera que viene determinada por eventos tales como inoculación, penetración, establecimiento, colonización, dispersión y supervivencia del patógeno en ausencia del hospedero.

Rojas *et al.* (2010, citados por Phoulivong 2011) mencionan que la infección que presentan las especies *Colletotrichum* tienen mecanismos de pre-penetración parecidos, las diferencias radican en el proceso que hay después de la adhesión del conidio, en la penetración de la cutícula de la planta por el apresorio. Por otro lado, Agrios (2005) indica que poco tiempo después de la penetración se producen los cambios que son notorios en el tejido y estos son los que conforman los síntomas característicos de la enfermedad, además indican que estos síntomas debilitan la planta y no es posible que se lleven a cabo las funciones normales, por lo que la planta puede morir o mermar el crecimiento.

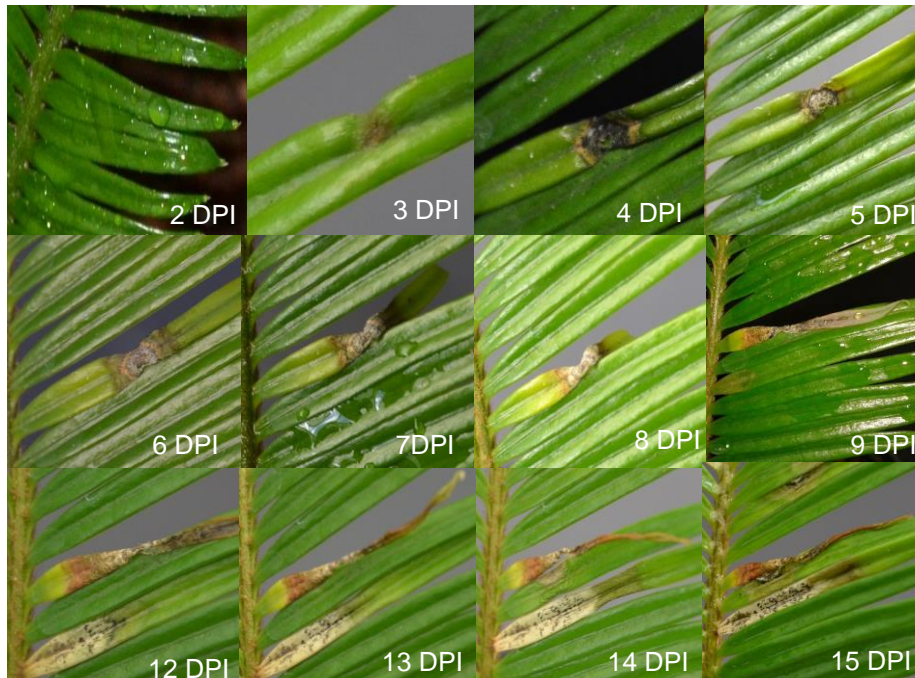


Figura 21. Orden cronológico del proceso de desarrollo de la enfermedad que presentaron las inoculaciones con *C. proteae* en plantas de *Cycas revoluta* etapa V3, desde el segundo día post inoculación (DPI), hasta los 15 DPI. Etapa II, ITCR 2014.

Según la figura anterior (Figura 21) al haber concluido el ciclo de la enfermedad, el inóculo secundario sigue latente como amenaza, de manera que es necesario determinar una estrategia para disminuir el inóculo secundario de la chasparria.

II B. Fase de desarrollo de la hoja más susceptible a la infección

• A nivel de invernadero

Debido a que las inoculaciones fueron realizadas en plantas de diferentes fases de desarrollo, se pudo observar la respuesta y la susceptibilidad de la fase al entrar en contacto con *C. proteae*; se determinó que la fase más susceptible a la infección es la V3 Juvenil (Figura 22-C), seguida por la V2 (Formación) (Figura 22-B) y V1 (Infantil) (Figura 22-A), por último la menos afectada fue la V4 (Madurez) (Figura 22-D), pero de igual manera transcurridos 24 días las hojas se observaron completamente necrosadas. Según Agrios (2005), es de esperarse que las hojas en estado maduro presenten periodos de incubación y latencia tardíos comparados con las etapas tempranas. En el caso de las proteáceas, según Lubbe *et al.* (2004), el síntoma de necrosis foliar es más común que se observe en plantas jóvenes en condiciones de vivero, debido a que este tipo de tejido es más susceptible a la infección.

Las plantas presentaron síntomas característicos representativos de la etapa en la que se encontraban, la V1 al ser inoculada, presentaba aún el margen revoluta, rodeado por una capa de tricomas, pero con los estomas expuestos a la entrada de patógenos, en dos días aproximadamente inició el proceso de apertura de la hoja, con presencia de lesiones en esta etapa o antes, lo cual impidió que se diera la apertura y provocara el decaimiento o estrangulamiento del raquis. Para la etapa V2 y V3, las hojas se observaron afectadas en mayor medida, posiblemente porque tenían superficie de tejido blando para que se diera el establecimiento del hongo fácilmente. El primer síntoma fue un color grisáceo oscuro, parecido a una mancha grasienta, muy tenue en los extremos de las hojas y pérdida de turgencia en los folíolos afectados; una vez que apareció este síntoma, se desencadenaron los procesos de la enfermedad que normalmente se presentaron en el tejido entre

los tres y cinco días de haber sido expuesto al patógeno, estos resultados fueron similares a los mencionados por Deghan *et al.* (1994), en donde se indicó que el inicio de los síntomas “necrotic dieback” se daba desde dos a tres días.

El tejido afectado se fue deshidratando hasta quedar de color café claro, las hojas en las etapas V2 y V3, se deformaron y se arrugaron; en la etapa V4, no se deformaron, más bien quedaron firmes pero secas debido a que se trataba de tejido con mayor cantidad de lignina que en etapas anteriores. Tal como lo indica Agrios (2005), el grosor de la cutícula, la cantidad y calidad de cera en la cutícula de la hoja, es una estructura de protección preexistente, debido a que obstaculiza el avance del patógeno, hace que la penetración directa sea difícil. Probablemente fue por ello que las plantas inoculadas en etapas maduras no se vieron afectadas con la misma velocidad que las plantas de cutícula blanda, de manera que las paredes celulares gruesas y firmes hicieron difícil la penetración del patógeno; el mismo autor mencionó que las hojas al tener una cutícula más gruesa, tienden a ser afectadas en menor intensidad, esto no quiere decir que las hojas maduras estén exentas de ser atacadas, sino que el ataque se puede dar lentamente.

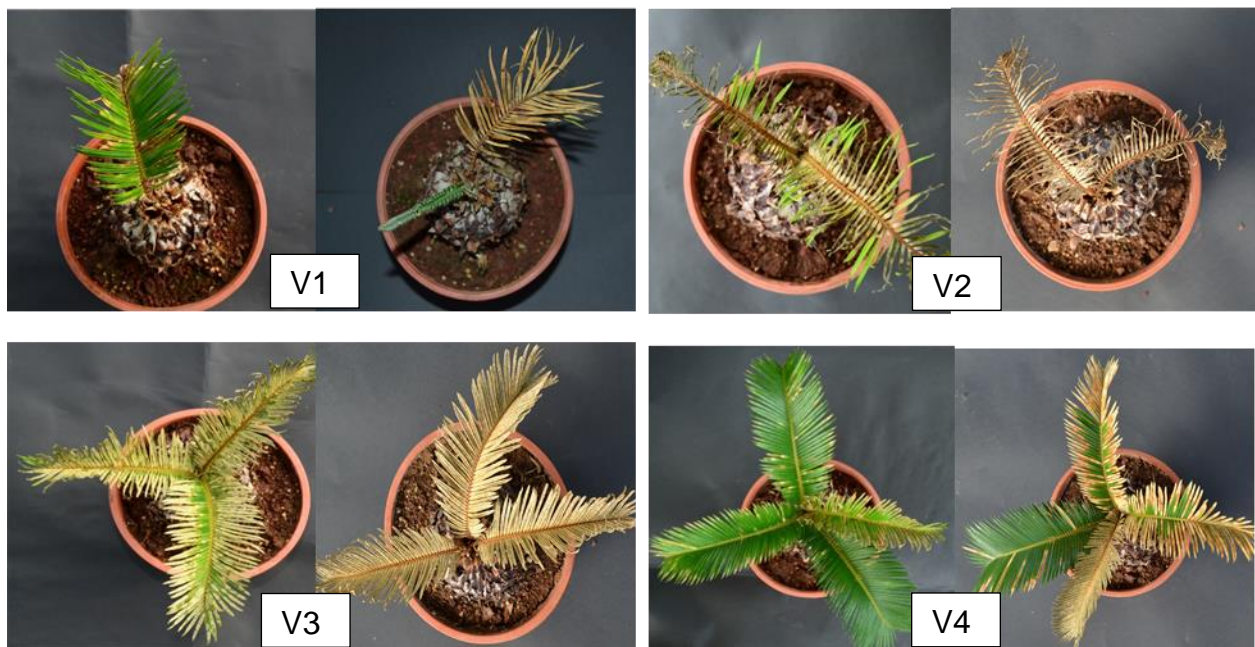


Figura 22. Fase de desarrollo más susceptible al ataque de patógenos en *Cycas revoluta*. Inoculaciones en: Etapa V1 Infantil, V2 Formación, V3 Juvenil y V4 Madurez. Etapa II, ITCR 2014. Foto tomada 15 - 24 días después de haber inoculado.

- **A nivel de campo**

Respecto al resultado de los muestreos de *C. revoluta*, se obtuvo una distribución de frecuencias de los síntomas en la plantación de cicas, en donde los más frecuentes en hojas en estado V3, fueron los categorizados como G (31,9%), H (31,4%), C (25,1%) y A (5,8%) según Anexo 4; en un menor porcentaje de aparición, se encontraron los síntomas B, J, K y L (Anexo 4), sin embargo, fue frecuente observar este tipo de lesiones en hojas más maduras, desde estado V4 hasta senescencia (Figura 24). Los síntomas presentados en campo con mayor frecuencia, fueron los observados en las inoculaciones con *C. proteae*. Es importante mencionar que al realizar el muestreo, los síntomas coincidieron con la época lluviosa y de emisión foliar, por ello algunos no estaban presentes al inicio de las observaciones en campo y no se contó con aislamientos en la Etapa I para la identificación de estos síntomas categorizados como G y H (Anexo 4), los cuales durante la época lluviosa se manifestaron en las hojas nuevas, en estado V2 y V3 principalmente.

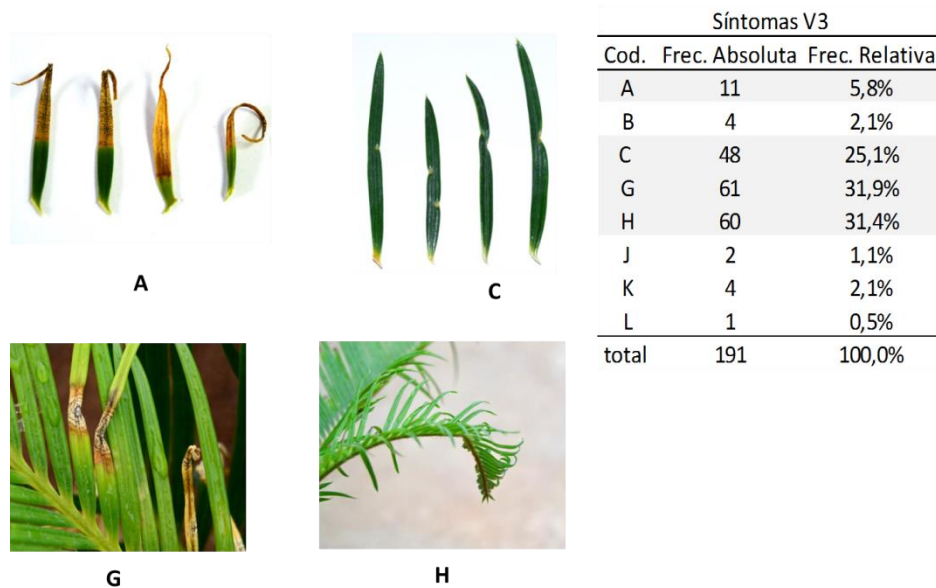


Figura 23. Distribución de las frecuencias de aparición en campo de síntomas de chasparria caracterizados en Anexo 4, en hojas de *C. revoluta* en estado V3. Etapa II, Los Chiles 2014.

En cuanto al muestreo realizado en fase V4 (Figura 25), se determinó que los síntomas de menor frecuencia en hojas nuevas (B y D), fueron más frecuentes en hojas viejas, posiblemente esto esté relacionado con la velocidad de avance del daño por *C. proteae*, estos síntomas concuerdan con los descritos por Agrios (2005) para el género *Colletotrichum*. Durante el muestreo realizado, se encontraron síntomas categorizados como B (30,5%), D (25%), A (21,4%) y E-F (13%) (Anexo 4), *C. proteae* presenta una variación en la sintomatología que muestra la planta en distintos estadios de desarrollo de la hoja.

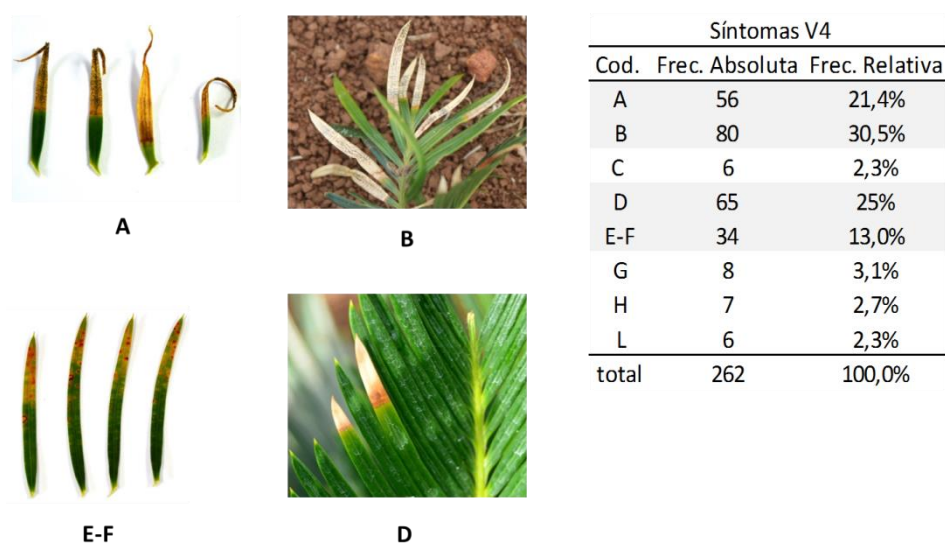


Figura 24. Distribución de las frecuencias de aparición en campo de síntomas de chasparria caracterizados en Anexo 4, en hojas de *C. revoluta* en estado V4. Etapa II, Los Chiles 2014.

Otros síntomas reportados como L, I, J y K en Anexo 4, no aparecieron entre las plantas muestreadas al azar; sin embargo se encontraban en la plantación; se les atribuye a causas de tipo fisiológico o lesiones patogénicas que fueron controladas por productos químicos fungicidas de acción curativa.

II C. Análisis de sensibilidad *in vitro* a fungicidas

- **Efecto de fungicidas protectantes sobre el crecimiento del diámetro de *C. proteae***

Se experimentó con seis concentraciones distintas, una de ellas fue cero (0 mg L⁻¹), la cual se categorizó como Testigo en cada caso. Según el Análisis de Varianza para la concentración 0,01 mg L⁻¹ del medio de cultivo enmendado, no existió efecto de tratamiento ($p=0,3015$) (Anexo 10); la aplicación de la prueba de medias LSD Fisher (5%) (Cuadro 11), indicó los mejores resultados en el crecimiento del diámetro de la colonia para las placas Petri con metiram (4,40 cm) y propineb (4,97 cm).

En la concentración 0,1 mg L⁻¹ existió efecto de tratamiento ($p=0,002$) (Cuadro 11), en donde el menor diámetro de crecimiento micelial fueron presentados por el medio de cultivo enmendado con propineb (3,89 cm) y metiram (4,57 cm), este último no presentó diferencias significativas ante el enmendado con clorotalonil (5,59 cm). Para la concentración de 1 mg L⁻¹ no existieron diferencias entre tratamientos ($p=0,3613$); sin embargo, de igual manera el propineb fue el ingrediente activo que presentó el menor diámetro de la colonia.

A 10 mg L⁻¹ de concentración del ingrediente activo con efecto fungicida protectante presentó efecto del tratamiento ($p<0,0001$) (Anexo 10). Según el Cuadro 11, nuevamente el propineb volvió a inducir el menor crecimiento del diámetro de la colonia de *C. proteae* (2,35 cm), sin presentar diferencias significativas ante el clorotalonil (2,93 cm), mientras que el metiram indujo el mayor crecimiento (4,04 cm) y su diferencia fue significativa con respecto a los demás.

La máxima concentración del ingrediente activo fue 100 mg L⁻¹, al evaluar resultó efecto de tratamiento ($p<0,0001$), en donde metiram fue el que indujo el menor diámetro de colonia micelial (0,33 cm) y presentó diferencias significativas ante el propineb (1,80 cm) y clorotalonil (2,18 cm), estos dos últimos no mostraron diferencias significativas entre sí.

Es importante destacar que los ingredientes activos mancozeb y la mezcla mancozeb con oxiclورو de cobre inhibieron en menor proporción el crecimiento micelial en las concentraciones 100, 10 y 0,1 mg L⁻¹.

Cuadro 11. Resultados de la prueba de medias LSD Fisher (5%) del diámetro de crecimiento micelial para los fungicidas protectantes evaluados a nivel *in vitro*. Etapa II, ITCR 2014.

| Fungicida | Ingrediente Activo | Concentración mg L ⁻¹ | | | | | |
|------------------------------|-----------------------------|----------------------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | | 0 | 0,01 | 0,1 | 1 | 10 | 100 |
| | p- valor | 0,0807 | 0,3015 | 0,002 | 0,3613 | <0,0001 | <0,0001 |
| Antracol [®] 70 WP | Propineb | 6,65 ^b | 4,97 ^b | 3,89 ^a | 3,01 ^a | 2,35 ^a | 1,80 ^b |
| Polyram [®] 70 WP | Metiram | 5,73 ^{ab} | 4,40 ^{ab} | 4,57 ^{ab} | 4,70 ^a | 4,04 ^b | 0,33 ^a |
| Clortosip [®] 72 SC | Clorotalonil | 5,05 ^a | 5,58 ^a | 5,59 ^{bc} | 3,75 ^a | 2,93 ^a | 2,18 ^b |
| Dithane [®] 80 WP | Mancozeb | 6,04 ^{ab} | 5,26 ^{ab} | 6,50 ^c | 4,92 ^a | 4,91 ^{bc} | 3,24 ^c |
| Cobrethane [®] | Mancozeb + Oxicloruro de Cu | 5,76 ^{ab} | 5,34 ^{ab} | 5,66 ^a | 4,40 ^a | 5,38 ^c | 3,81 ^c |

^{abc} Letras distintas en misma columna difieren significativamente $p < 0,05$.

Waller *et al.* (1993) en Phoulivong (2011), han realizado estudios en los que se ha determinado la sensibilidad de especies de *Colletotrichum* ante compuestos cúpricos como ditiocarbamatos, benzimidazoles y traizoles; así como a fungicidas entre los cuales están clorotalonil, imidazoles y prochloraz.

Phoulivong (2011), afirma que son frecuentes las aplicaciones con fungicidas como mancozeb, carbendazina, difenoconazole, dicolad y benomil. Según Fungicide Resistance Action Committee FRAC (2014), normalmente en la agricultura se prefieren aplicaciones con fungicidas como clorotalonil y mancozeb debido a que se ha comprobado que es más difícil crear resistencia a este tipo de moléculas con acción multisitio.

- **Efecto fungicidas protectantes sobre porcentaje de Inhibición de la colonia de *C. proteae***

Respecto al porcentaje de inhibición de la colonia de micelio de acuerdo a la concentración de ingrediente activo de los fungicidas protectantes evaluados, en el Cuadro 12 se observa que el metiram (Polyram[®] 70WP) fue el que presentó el mejor comportamiento (93,8% de inhibición) en la concentración de 100 mg L⁻¹, según la ficha técnica del producto, este fungicida ejerce un efecto sobre la germinación de esporas y el desarrollo del tubo germinativo, además pertenece al grupo de inhibidores multisitio y por ello es de alta efectividad. El propineb, fue el que obtuvo el mayor porcentaje de inhibición en las concentraciones 0,01 - 0,1 - 1 y 10 mg L⁻¹ (25,3% - 41,4% - 53,8% y 64,7%), debido al efecto que tiene sobre la

respiración celular del hongo. El clorotalonil en las concentraciones 1 mg L⁻¹ (20,7%) y 10 mg L⁻¹ (38,6%) presentó mejor comportamiento que el metiram, sin embargo este último aumentó la inhibición en la concentración 100 mg L⁻¹ (superando a todos los protectantes, debido al efecto que tiene sobre algunos procesos vitales como la respiración celular y la producción de energía. Su ficha técnica menciona que tiene efecto multisitio al consumir moléculas de Glutathione, el cual funciona como sustrato para ciertas enzimas relacionadas con dichos procesos. Es interesante destacar que el mancozeb no tuvo un efecto en la inhibición del crecimiento de la colonia de *C. proteae*, lo que coincide con lo obtenido por Ferreira *et al.* (2005), siendo la combinación de mancozeb + oxiclورو de cobre la que presentó los resultados más bajos con 0% de inhibición a una concentración de 0,1 – 0,1 - 10 mg L⁻¹, y el valor más alto fue de 28,1% de inhibición del crecimiento a una concentración de 100 mg L⁻¹. Lo que quiere decir que se necesita evaluar dosis más altas de los ingredientes activos mancozeb y la mezcla mancozeb + oxiclورو de cobre, para observar si existe efecto inhibitorio mayor al 50% en el crecimiento de la colonia.

Cuadro 12. Porcentaje de inhibición en el crecimiento de la colonia de *C. proteae* según pruebas de sensibilidad in vitro a ingredientes activos de fungicidas protectantes. Etapa II, ITCR 2014.

| Fungicida | Ingrediente activo | Concetración del fungicida (mg L ⁻¹) | | | | | |
|------------------|---------------------------|--|------|------|------|------|------|
| | | 0 | 0,01 | 0,1 | 1 | 10 | 100 |
| | | % de inhibición | | | | | |
| Antracol® 70 WP | Propineb | 0,0 | 25,3 | 41,4 | 53,8 | 64,7 | 73,0 |
| Polyram® 70 WP | Metiram | 0,0 | 17,3 | 14,1 | 11,7 | 21,5 | 93,8 |
| Clortosip® 72 SC | Clorotalonil | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 20,7 | 38,6 | 54,5 |
| Dithane® 80 WP | Mancozeb | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 3,9 | 7,0 | 36,7 |
| Cobrethane® | Mancozeb + Oxiclورو de Cu | 0,0 | 0,0 | 0,0 | 12,3 | 0,0 | 28,1 |

En la Figura 26, se puede observar que el propineb tuvo un comportamiento en el porcentaje de inhibición, aumentó gradualmente de acuerdo a la concentración como era de esperarse; a diferencia del metiram, el cual presentó el dato más bajo de % de inhibición a una concentración de 1 mg L⁻¹, fue superado por la concentración 0,01 mg L⁻¹ del mismo ingrediente activo.

En una investigación realizada por Haddad *et al.* en el año 2003, se analizó la sensibilidad en la germinación de conidios del hongo *C. gloesporioides* ante distintos fungicidas, se determinó que el clorotalonil y el mancozeb fueron los que presentaron el mejor desempeño, esto demuestra una alta eficiencia ante la inhibición de germinación de esporas del ingrediente activo clorotalonil el cual fue categorizado en ese estudio como fungicida de Alta Sensibilidad. Kososki *et al.* (2001), obtuvo resultados positivos con el clorotalonil para la especie *C. acutatum*; diferentes de los obtenidos de Tavares y Souza (2005), quienes obtuvieron una germinación de 70,4% en conidios de *C. gloesporioides* a una concentración de 1 mg L⁻¹, sin embargo en las concentraciones de 50-100 mg L⁻¹, la inhibición de la germinación fue del 100%.

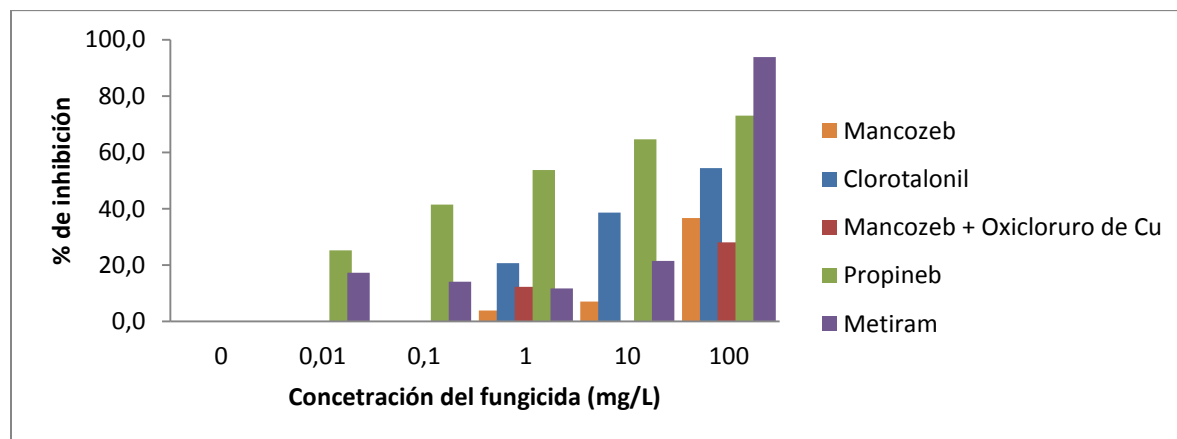


Figura 25. Resultados del porcentaje de inhibición del crecimiento de la colonia del patógeno *C. proteae* ante seis concentraciones de cinco ingredientes activos que funcionan como fungicidas protectantes.

- **Efecto de fungicidas sistémicos sobre el diámetro de la colonia de *C. proteae***

Según el Análisis de Varianza no se presentó efecto entre los tratamientos Testigo ($p=0,6853$) de igual manera que con los fungicidas protectantes ($p=0,0807$), (Anexo 10), Lo que indica que *C. proteae* tuvo un crecimiento homogéneo del micelio en el medio de cultivo.

Según el Cuadro 13, en la concentración más baja ($0,01 \text{ mg L}^{-1}$) no existieron diferencias significativas entre los tratamientos con fungicidas sistémicos ($p=0,4321$). Sin embargo, los ingredientes activos fungicidas que indujeron el menor crecimiento micelial fueron prochloraz (4,03 cm), pyrimethanil (4,35 cm) y difenoconazole (4,69 cm), en donde no hubo diferencias significativas entre ellos según LSD Fisher 5%.

En la concentración $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ se presentó efecto de tratamiento ($p=0,0001$). Siendo el prochloraz (1,01 cm) y el difenoconazole (2,32 cm) los ingredientes activos fungicidas que indujeron el menor crecimiento micelial y entre estos no hubieron diferencias significativas, seguido por el pyrimethanil (4,13 cm) el cual mostró diferencias significativas ante los dos anteriores según la prueba de medias de LSD Fisher al 5% (Cuadro 13).

Para la concentración de 1 mg L^{-1} el medio de cultivo enmendado con prochloraz (1,12 cm) y difenoconazole (1,97 cm) no presentaron diferencias significativas entre sí, así como tampoco este último con azoxistrobin (3,14 cm).

En la concentración 10 mg L^{-1} , el Análisis de Varianza indicó efecto de tratamiento ($p<0,0001$). En cuanto a la Prueba de Medias LSD Fisher 5% (Cuadro 13) mostró el menor crecimiento de micelio en el medio de cultivo enmendado con prochloraz (0,15 cm) y difenoconazole (0,96 cm) que presentaron diferencias significativas ante el pyrimethanil (3,06 cm) este último no presentó diferencias significativas ante azoxistrobin y boscalid, los cuales presentaron el mayor crecimiento micelial (3,65 cm y 4,05 cm). En la más alta concentración evaluada correspondiente a 100 mg Kg^{-1} , los ingredientes activos pyrimethanil y prochloraz no presentaron crecimiento micelial mientras que difenoconazole (0,46 cm) sin presentar diferencias significativas ante ellos. En el caso de los medios de cultivo

con azoxistrobin y boscalid en concentraciones 0,01 - 10 - 100 mg L⁻¹, presentaron el mayor crecimiento de la colonia de *C. proteae*.

Cuadro 13. Resultados provenientes de la Prueba de Medias LSD Fisher 5% para el diámetro de la colonia de *C. proteae* según Ingredientes activos sistémicos en diferentes concentraciones. Etapa II, ITCR 2014.

| Fungicida | Ingrediente activo | Concentración mg L ⁻¹ | | | | | |
|----------------|--------------------|----------------------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|
| | | 0 | 0,01 | 0,1 | 1 | 10 | 100 |
| | p-valor | 0,6853 | 0,4321 | 0,0001 | 0,0024 | <0,0001 | <0,0001 |
| Siganex® 60 SC | Pyrimethanil | 5,73 ^a | 4,35 ^a | 4,13 ^b | 4,09 ^c | 3,06 ^b | 0,00 ^a |
| Sportak® 45 EC | Prochloraz | 4,88 ^a | 4,03 ^a | 1,01 ^a | 1,12 ^a | 0,15 ^a | 0,00 ^a |
| Score®25 EC | Difenoconazole | 5,39 ^a | 4,69 ^a | 2,32 ^a | 1,97 ^{ab} | 0,96 ^a | 0,46 ^a |
| Amistar® 50 WG | Azoxistrobin | 4,64 ^a | 5,20 ^a | 4,54 ^b | 3,14 ^{bc} | 3,65 ^b | 1,95 ^b |
| Cumora® 50 WP | Boscalid | 5,12 ^a | 4,71 ^a | 4,63 ^b | 4,18 ^c | 4,05 ^b | 2,74 ^c |

^{abc} Letras distintas en misma columna difieren significativamente $p > 0,05$.

- **Efecto fungicidas sistémicos sobre porcentaje de Inhibición de la colonia de *C. proteae***

En el Cuadro 14 muestra el porcentaje de inhibición del crecimiento de la colonia del hongo analizado, en donde se observa solamente al prochloraz y pyrimethanil a una concentración de 100 mg L⁻¹ inhibir el 100% del crecimiento micelial, seguido por difenoconazole que logró inhibir 90,3%.

Tavares (2004) y Tavares y Souza (2005), demostraron que existe una alta sensibilidad de la especie *C. gloesporioides* ante los fungicidas prochloraz, propiconazol y tebuconazol, los cuales, en estudios anteriores han inhibido en promedio 83,3% del crecimiento micelial a una concentración de 1 mg L⁻¹.

Tavares y Souza (2005), indican que el grupo de los fungicidas benzimidazoles tienden a mostrar baja eficiencia en el control de *C. gloesporioides* y alta tolerancia ante fungicidas tiabendazole y metiltiofanato.

El boscalid y azoxistrobin, los cuales son inhibidores de la respiración mitocondrial, no lograron inhibir el 50% del crecimiento en las concentraciones 0,01 - 0,1 - 1 - 10 mg L⁻¹ y fue inferior al 60% de inhibición en la concentración más alta (100 mg/L).

Cuadro 14. Porcentaje de inhibición en el crecimiento de la colonia de *C. proteae* en pruebas de sensibilidad in vitro a fungicidas sistémicos. Etapa II, ITCR 2014.

| Fungicida | Ingrediente activo | Concentración del fungicida (mg L ⁻¹) | | | | | |
|----------------|--------------------|---|------|------|------|------|-------|
| | | 0 | 0,01 | 0,1 | 1 | 10 | 100 |
| | | % de inhibición | | | | | |
| Siganex® 60 SC | Pyrimethanil | 0,0 | 21,1 | 27,9 | 25,1 | 46,7 | 100,0 |
| Sportak® 45 EC | Prochloraz | 0,0 | 39,5 | 77,1 | 75,5 | 96,7 | 100,0 |
| Score®25 EC | Difenoconazole | 0,0 | 19,4 | 58,7 | 57,7 | 79,6 | 90,3 |
| Amistar® 50 WG | Azoxistrobin | 0,0 | 0,0 | 2,3 | 32,4 | 21,3 | 58,0 |
| Cumora® 50 WP | Boscalid | 0,0 | 5,8 | 12,8 | 15,8 | 23,8 | 48,4 |

En cuanto a los fungicidas sistémicos (Figura 27), los que presentaron los porcentajes más altos de inhibición fueron el prochloraz, difenoconazole y pyrimethanil en todas las concentraciones debido a que ejercen un efecto directo sobre la síntesis del ergosterol; en el caso del difenoconazole muestra una inhibición de la enzima esterol-1,4 α dimetilasa según el mecanismo de acción descrito para estos fungicidas en la ficha técnica del producto. Tavares y Souza (2005), mencionan que en investigaciones realizadas con azoxistrobin y prochloraz mostraron alta eficiencia en la inhibición de la germinación de *C. gloesporioides*. Por otro lado Kososki *et al.* (2001), indica que el ingrediente activo prochloraz fue el que presentó el mejor resultado a nivel in vitro en cuanto al crecimiento micelial.

Los ingredientes activos azoxistrobin y boscalid fueron los que mostraron el comportamiento más bajo en porcentajes de inhibición. El ingrediente activo azoxistrobin actúa mediante la unión del sitio Q_o del citocromo b, interrumpiendo el ciclo de energía dentro del hongo. Por otro lado, también se ha encontrado en especies de *Colletotrichum* que afectan frutos, alta efectividad ante fungicidas como estrobilurinas, sin embargo rápidamente pueden ejercer resistencia ante ciertos compuestos (Wharton & Deiguez-Uribeondo 2004, citado por Phoulivong 2011). El boscalid tiene un mecanismo de acción distinto que consiste en la interferencia del transporte de electrones del complejo II, de esta manera inhibe la formación de ATP.

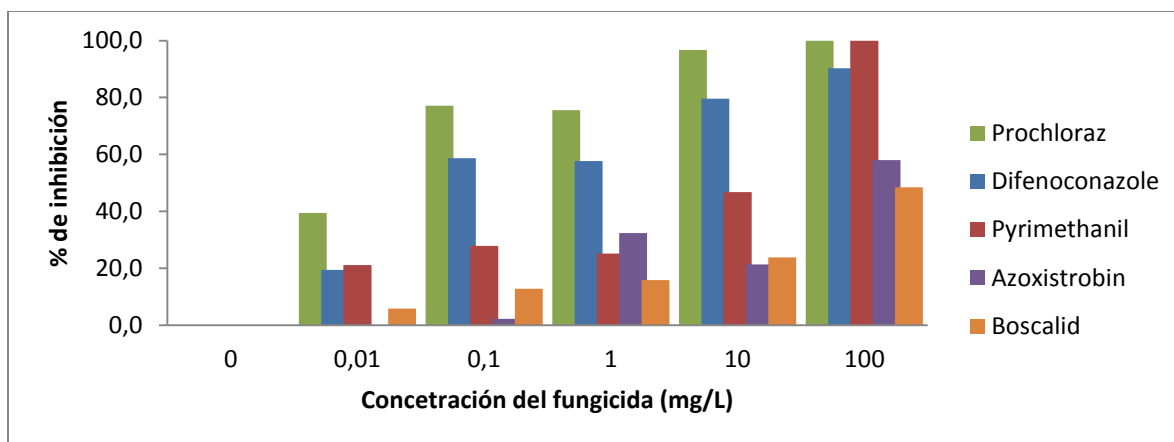


Figura 26. Porcentaje de inhibición del crecimiento de la colonia del patógeno *C. proteae* ante seis concentraciones de cinco ingredientes activos de fungicidas sistémicos.

- **Concentración efectiva EC^{50}**

La concentración efectiva capaz de inhibir el 50% del crecimiento micelial fue categorizada según Edgington *et al.* (1971) tal como se presenta en el Cuadro 15. En donde el ingrediente activo ubicado en Alta Sensibilidad fue prochloraz, mientras que los sistémicos, difenoconazole y pyrimethanil, así como los protectantes, propineb y metiram, fueron categorizados como de Baja Sensibilidad.

Cuadro 15. Resultados del cálculo de la Concentración Efectiva para inhibir el 50% (EC^{50}) crecimiento micelial, categorizados según Edgington *et al.* (1971).

| Categoría | Concentración | Ingrediente activo | EC_{50} mg L ⁻¹ |
|-------------------------|----------------------------|--------------------|------------------------------|
| Alta sensibilidad (AS) | <1 mg L ⁻¹ | Prochloraz | 0,01 |
| | | Difenoconazole | 0,2 |
| | | Propineb | 0,73 |
| Media sensibilidad (MS) | 1 - 10 mg L ⁻¹ | Pyrimethanil | 2,14 |
| Baja sensibilidad (BS) | 10 - 50 mg L ⁻¹ | Metiram | 13,85 |
| | | Clorotalonil | 70,14 |
| Insensibilidad (I) | >50 mg L ⁻¹ | Azoxistrobin | > 100 (103,16) |
| | | Boscalid | > 100 (958,05) |
| | | Mancozeb | > 100 (109071) |
| | | Mancozeb + Cu | > 100 (2860064) |

Cabe destacar que Edgington *et al.* (1971) creó dicha escala para valorar compuestos benzimidazoles, sin embargo Batista *et al.* (2009) la utilizó para categorizar ingredientes activos protectantes. Es importante indicar que se vuelve

más riguroso si se utiliza una escala para categorizar protectantes y sistémicos por aparte, debido a que las dosis recomendadas para protectantes son mayores a las recomendadas para sistémicos.

Para el cálculo de la concentración efectiva EC^{50} , se requirieron análisis de regresión logarítmica de los ingredientes activos protectantes y sistémicos, como se indica en las Figuras 28 y 29 (Las ecuaciones y R^2 , se encuentran en Anexo 11).

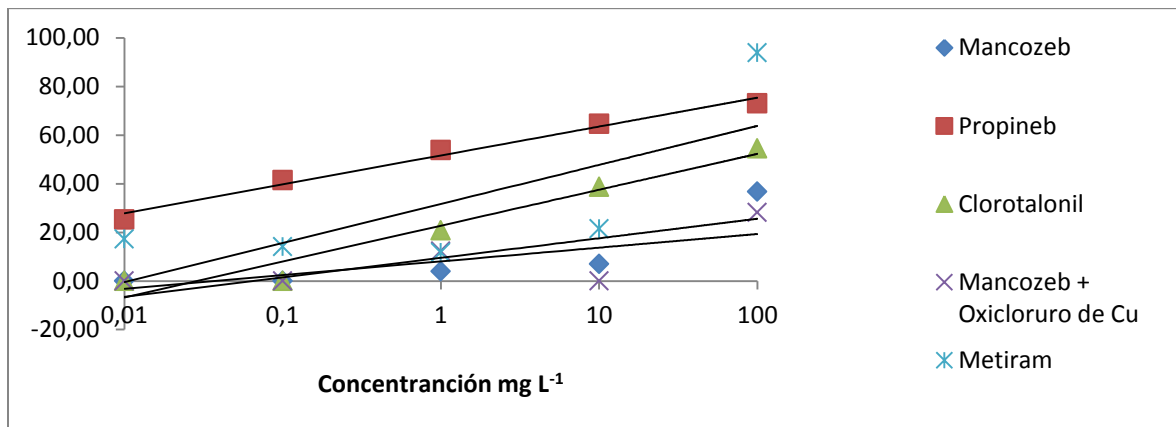


Figura 27. Análisis de regresión lineal del porcentaje de inhibición de la colonia de *C. proteae* ante cinco ingredientes activos protectantes en diferentes concentraciones evaluadas en el análisis de sensibilidad *in vitro*. Etapa II, ITCR 2014.

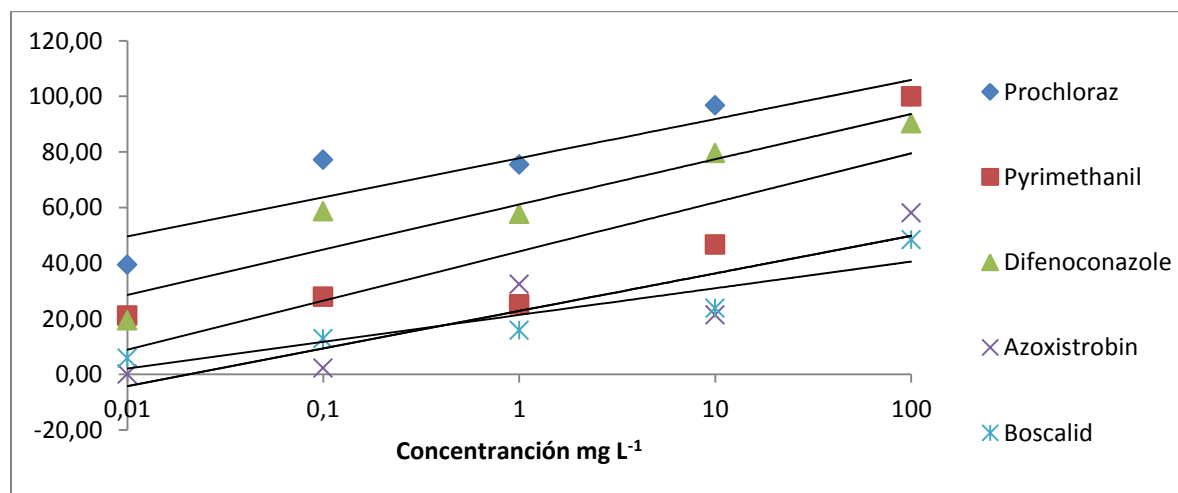


Figura 28. Análisis de regresión lineal del porcentaje de inhibición de la colonia de *C. proteae* ante cinco ingredientes activos sistémicos en diferentes concentraciones evaluadas en el análisis de sensibilidad *in vitro*. Etapa II, ITCR 2014.

4.3 Etapa III. Elaboración de escala diagramática de severidad de la enfermedad y evaluación de estrategias para el manejo de la chasparria en *Cycas revoluta*.

III A. Escala diagramática de la enfermedad

Con el objetivo de monitorear la enfermedad, se diseñó la siguiente escala diagramática presentada en la Figura 30, en la cual se determinaron los rangos de severidad, de manera que fue posible categorizar en forma porcentual el daño de la hoja de cicas, esto para realizar muestreos periódicos y monitorear la enfermedad en campo.

Las escalas diagramáticas son representaciones ilustradas, que muestran síntomas de diferentes niveles de severidad (Bergamin y Amorim 1996, citados por Godoy *et al.* 2006), son utilizadas para facilitar la evaluación y dar mayor precisión en la medición de la enfermedad (Berger 1980, citado por Godoy *et al.* 2006). El diseño de una escala diagramática, es utilizada para la evaluación de la severidad en enfermedades, esto reduce la subjetividad con la que pueden ser evaluadas; estas escalas han sido utilizadas para una gran cantidad de patosistemas (Godoy *et al.* 1997; Leite y Amorim, 2002; Martins *et al.*, 2004; Godoy *et al.* 2006).

Tal como lo dicen Horsfall y Barratt (1945); Godoy *et al.* (2006), se deben considerar aspectos como los límites superiores e inferiores los cuales deben corresponder a la mínima y máxima severidad observada en campo, así como los niveles intermedios que deben ser adecuados a la percepción visual humana. En este caso la representación gráfica (Figura 30) corresponde al valor medio del rango de severidad, es decir, la fotografía del Grado 6 en la escala responde al valor aproximado de 85% del tejido dañado de la hoja. Al mismo tiempo se indican los valores máximos (Grado 7) y mínimos (Grado 0) de severidad observados en campo.

Son necesarias otras pruebas de validación utilizando personas sin experiencia en la evaluación de la enfermedad tal como lo indica Godoy *et al.* (2006), en donde compara dos grupos de personas, unas con experiencia y otras sin experiencia en la evaluación, luego cada grupo evalúa las mismas plantas y se comparan los resultados por medio de un análisis de regresión.









| Escala diagramatica para evaluar la severidad de la chasparria en <i>Cycas revoluta</i> | | | |
|---|---|--|--|
| 0 | 1 | 2 | 3 |
| Sana | Muy levemente afectada | Levemente afectada | Medianamente afectada |
|  |  |  |  |
| 0% | >0 - 5% | >5% - 15% | >15% - 25% |
| 4 | 5 | 6 | 7 |
| Altamente afectada | Muy altamente afectada | No funcional | Totalmente necrosada |
|  |  |  |  |
| >25% - 50% | >50% - 75% | >75% - 95% | >95% |
| M Sánchez , 2014 | | | |

Figura 29. Escala de severidad para la evaluación en campo de la chasparria en *Cycas revoluta*. Etapa III, ITCR 2014.

III B. Evaluación de la rotación convencional y no convencional de fungicidas con aplicaciones de ácido acético extra como anti-esporulante.

- ***Análisis del Índice de severidad en el área experimental***

El muestreo inicial no mostró efecto entre los tratamientos ($p=0,3702$). En el mes de mayo, no se presentaron diferencias significativas según el Análisis de Varianza ($p=0,1069$), al igual que durante el mes de junio ($p=0,3515$) y julio ($p=0,3724$). En la Figura 31, se indica que desde el primer al cuarto muestreo (abril a julio 2014), los tratamientos no mostraron diferencias significativas entre sí.

Para el muestreo cinco, realizado en el mes de agosto se registró efecto entre los tratamientos ($p= 0,0001$), en donde el tratamiento correspondiente a fungicidas Convencionales fue el que presentó el Índice de severidad más bajo, con una media de 1,80 (Cuadro 16) este último presentó diferencias significativas ante los demás tratamientos; la media del tratamiento Convencional + ácido acético, fue menor con respecto al No convencional y la combinación de No convencional + ácido acético. Samandiego *et al.* (2008) y Sousa *et al.* (2012) afirman que el ácido acético induce a la muerte apoptótica de las células, lo que quiere decir que puede conllevar a la muerte celular programada (Gewies 2003) o necrosis programada como se le suele llamar en algunos casos (Kromer *et al.* 2009) y está focalizada en el punto en donde sufre la lesión por parte del patógeno; esto explica probablemente el aumento en la severidad de los tratamientos con ácido acético.

De la misma manera se comportó la tendencia durante el último muestreo en el mes de septiembre, existió efecto entre tratamiento Convencional y el resto ($p= 0,0005$), en donde el tratamiento con fungicidas convencionales fue el que mostró el más bajo índice de severidad (2,09), seguido del tratamiento Convencional + ácido acético, el cual presentó un índice de severidad de 2,71.

Según Agrios (2005), la mayoría de plantas poseen estructuras de defensa que son provocadas como respuesta a la infección patogénica, esto lo hacen para contrarrestar la invasión posterior, estas estructuras pueden ser provocadas por un proceso al que se le denomina reacción necrótica o de hipersensibilidad, en donde el núcleo de las células invadidas recibe una señal de muerte programada y tiene como función aislar el patógeno de sustancias que necesita para el desarrollo.

Cuadro 16. Tabla de medias Índice de Severidad calculada en cada muestreo. Etapa IIIB, Los Chiles 2014.

| Tratamiento | Índice de severidad | | | | | |
|-----------------------|---------------------|---------|--------|--------|--------|------------|
| | Abril | Mayo | Junio | Julio | Agosto | Septiembre |
| Convencional | 2,75 a | 3,44 ab | 3,53 a | 2,76 a | 1,80 a | 2,09 a |
| Conv. + Ác. acético | 3,35 a | 3,86 a | 4,16 a | 3,21 a | 2,66 b | 2,71 b |
| No convencional | 2,07 a | 3,82 b | 3,67 a | 3,26 a | 3,25 b | 3,19 b |
| No conv.+ Ác. acético | 3,24 a | 3,08 b | 3,60 a | 3,44 a | 2,97 b | 3,25 b |

^{a,b,c} Letras distintas en una misma columna, difieren significativamente ($p > 0,05$).

En la Figura 31, se observa que en los meses de abril, mayo y junio se presentó un aumento en el índice de severidad en todos los tratamientos, coincidiendo con la época lluviosa y brote de hojas hasta el mes de julio, en donde existió una disminución que se mantuvo hasta agosto, en donde hubo un leve aumento en el índice de severidad de las plantas muestreadas durante el mes de septiembre. Los síntomas en campo se incrementaron durante la época lluviosa y la misma coincidió con la emisión foliar, de manera podría suceder que al existir tejido nuevo las plantas fueron más propensas a ser afectadas por la chasparria. Esto se deduce porque lo mismo se observó en los experimentos relacionados con las fases de desarrollo (Etapa I) y las inoculaciones (Etapa II).

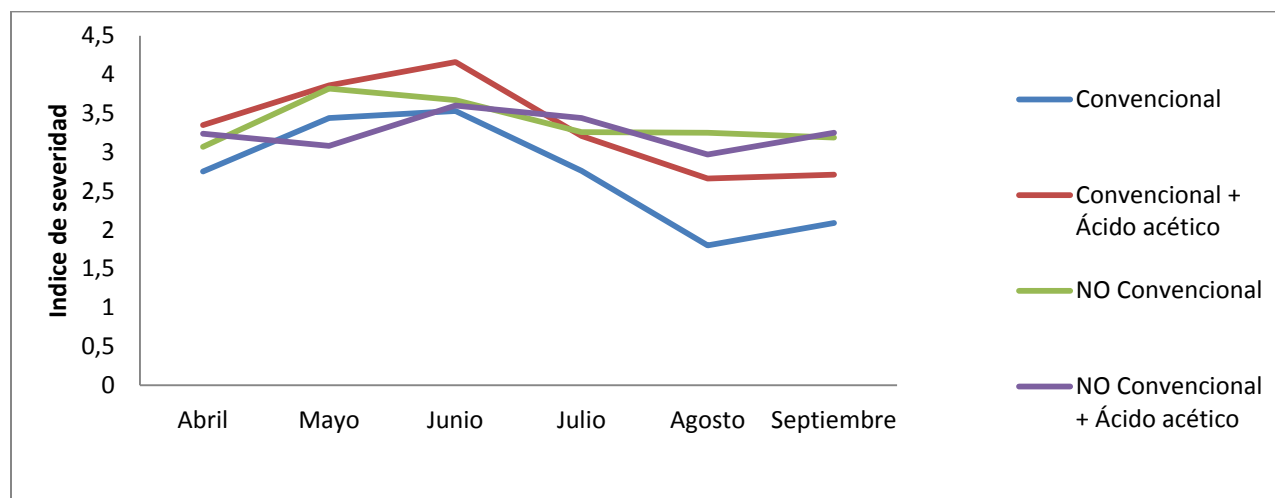


Figura 30. Índice de severidad en seis muestreos mensuales en campo, para la evaluación de rotación de fungicidas convencionales - no convencionales y el ácido acético como antiesporulante. Etapa III Los Chiles 2014.

En la Figura 32, se observan las parcelas experimentales para cada tratamiento aplicado, en donde claramente se aprecia la sanidad de las plantas del tratamiento convencional, con respecto al no convencional. El ácido acético debió ejercer efecto en el fungicida convencional, puesto que en vez de disminuir la severidad en el lote, aumentó la severidad en lotes que habían sido tratados con la misma rotación convencional y una aplicación extra con ácido acético.

Es necesario el estudio de la compatibilidad química, es posible que el ácido acético tenga algún efecto sobre la molécula del fungicida aplicado y eso disminuya la eficiencia de la aplicación. Según la ficha técnica, el ácido acético aplicado es del tipo glacial 99%, tiene un pH de 2,4 y presenta incompatibilidad con agentes oxidantes, ácido crómico, metales comunes (excepto el Al), ácido sulfúrico, ácido nítrico, peróxido de hidrógeno, carbonatos, Aminas y otros (Ficha técnica Anexo 8).

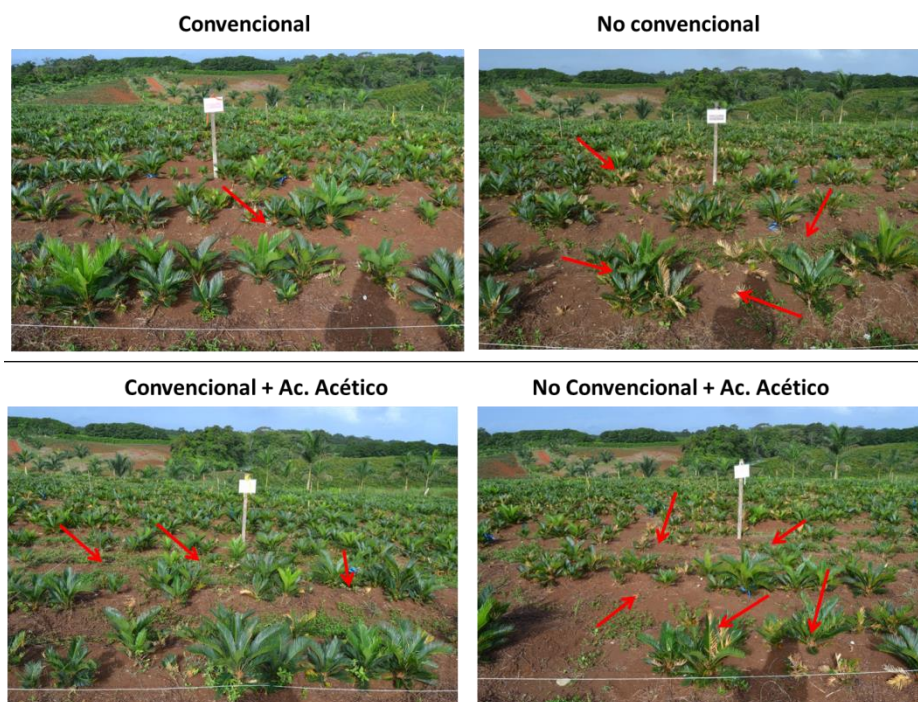


Figura 31. Parcelas en campo con los tratamientos evaluados en experimento sobre la rotación de fungicidas y la adición de ácido acético como anti-esporulante. Etapa III, Los Chiles 2014.

III C. Evaluación de la nutrición foliar

Respecto a la aplicación de fertilizantes foliares para el manejo de la chasparria, se determinó que no hubo efecto de tratamiento en cada observación

realizada en los meses abril ($p=0,9374$), mayo ($p=0,1236$), junio ($p=0,5117$), julio ($p=0,2665$), agosto ($p=0,1841$) y septiembre ($p=0,7446$); además tampoco hubo efecto entre el testigo y los demás tratamientos de fertilización foliar ($p=0,7829$) (Cuadro 17); sin embargo, el índice de severidad más alto fue para el Nitrato de Calcio en el último muestreo (4,21), verificable en las fotografías tomadas del estado de las parcelas en campo (Figura 34). Delgado *et al.* (2006) afirman que la fertilización con calcio aumenta la rigidez de la pared celular, impidiendo la entrada de patógenos y estructuras como el apresorio; sin embargo Wild (1992) afirma que se debe tomar en cuenta que el Calcio es un elemento poco móvil dentro de la planta y por ello es necesario que las aplicaciones se realicen con anticipación según la velocidad de translocación en la planta. Es probable que la eficiencia en la fertilización foliar fue baja y no ejerció efecto sobre la pared celular de las cicas, debido a que los análisis foliares no indicaron diferencias en el contenido de nutrientes respecto a los tratamientos aplicados (Anexo 9)

Cuadro 17. Valores índice de severidad obtenida en los muestreos realizados en campo para el experimento IIIC.

| Tratamientos | Abril | Mayo | Junio | Julio | Agosto | Septiembre |
|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|--------------------|
| Nitrato de Ca | 4,33 ^a | 3,40 ^a | 5,17 ^a | 3,40 ^a | 11,60 ^a | 12,03 ^a |
| Silicato de K | 4,25 ^a | 4,78 ^a | 2,91 ^a | 3,03 ^a | 9,02 ^a | 9,14 ^a |
| Sulfato de Mg | 4,47 ^a | 4,89 ^a | 5,93 ^a | 3,25 ^a | 7,76 ^a | 7,26 ^a |
| Testigo | 4,26 ^a | 4,93 ^a | 2,77 ^a | 3,34 ^a | 14,39 ^a | 17,38 ^a |

^aNo hay diferencias significativas entre los tratamientos ($p>0,05$).

Es posible que estas estrategias de fertilización no sean altamente efectivas; sin embargo no aumentaron la severidad observada en campo, más bien mantuvieron los rangos normales comparándola con el testigo, ningún tratamiento sobrepasó la severidad promedio del testigo.

Según el índice de severidad calculado, se observa en la Figura 33, que el tratamiento que presentó el mayor el índice de severidad fue el Sulfato de Magnesio, sin embargo en las fotografías tomadas de las parcelas (Figura 34), no fue tan evidente la menor cantidad de plantas enfermas en esa parcela.

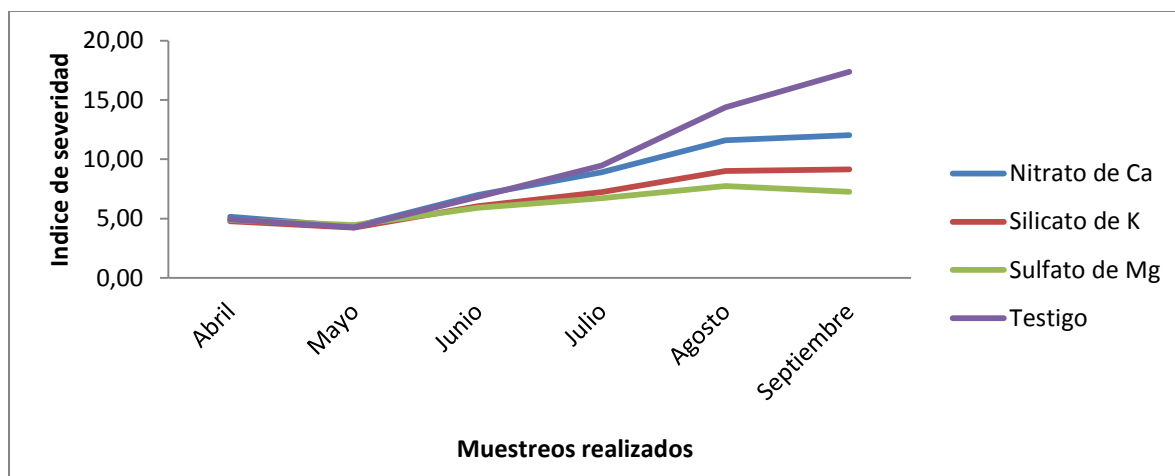


Figura 32. Índice de severidad mensual de chasparria en *C. revoluta* en condiciones de campo según muestreos mensuales. Etapa III, Los Chiles 2014.

En la Figura 34, se indica de manera visual la afectación de la enfermedad en las parcelas estudiadas. La parcela donde se aplicó Nitrato de Calcio fue al parecer la que presentó menor severidad, sin embargo no se puede generalizar debido a que en total fueron cinco parcelas por cada tratamiento y es posible que algunas resultaran más afectadas que otras.

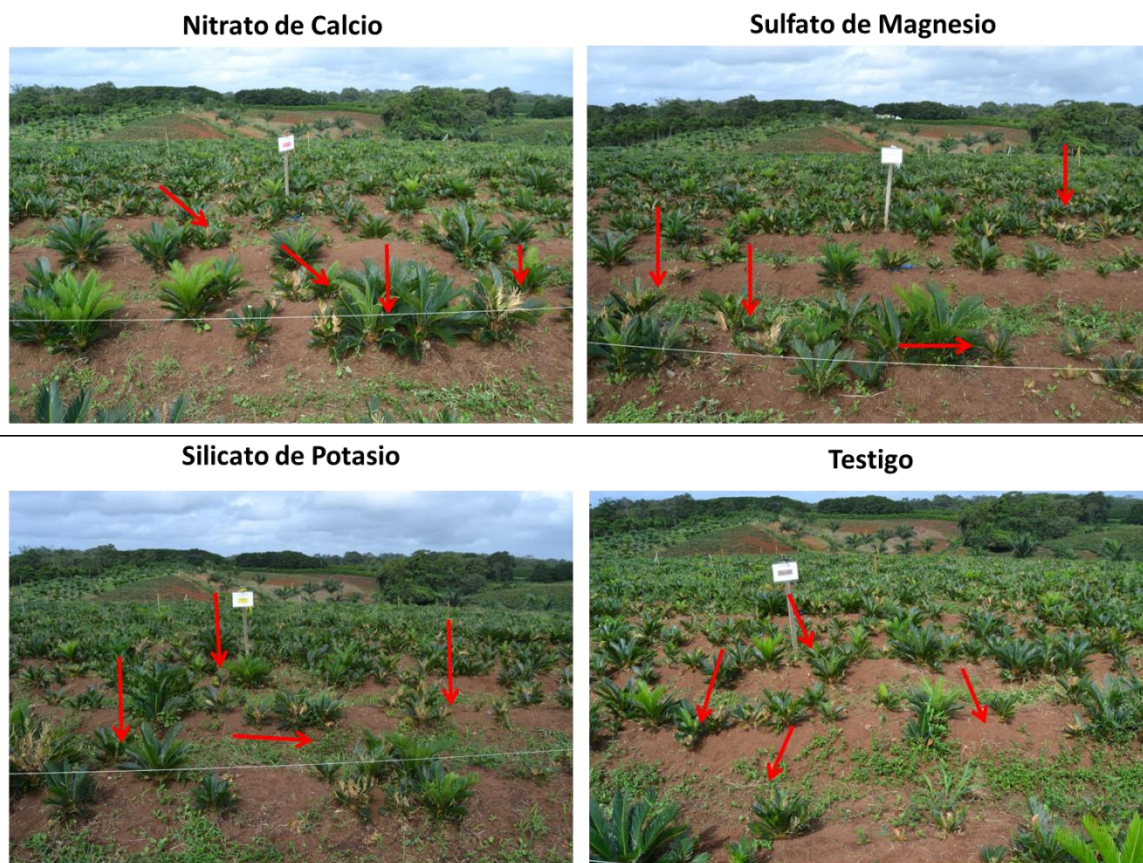


Figura 33. Parcelas en campo con los tratamientos evaluados en experimento sobre el efecto de la nutrición foliar con fertilizantes a base de Ca, Mg y Si. Etapa III, Los Chiles 2014.

4.4 Manual informativo sobre *Cycas revoluta*

Se diseñó un manual informativo sobre el cultivo de cicas Anexo 12, en el cual se abordaron aspectos útiles acerca del cultivo de *C. revoluta* como especie ornamental de explotación hortícola. En él mismo se indican, las principales prácticas agronómicas utilizadas para el control de enfermedades provocadas por hongos que dañan el área foliar, a partir de resultados de investigaciones y visitas a plantaciones en Costa Rica. También se trataron aspectos referentes a reproducción y ritmo de emisión foliar; así una breve historia y principales usos de la planta.

El manual inicia con algunos aspectos generales sobre las cicas, lugares donde fueron descubiertas y la forma de clasificación a nivel taxonómico en el mundo; en la parte botánica se identificaron las principales características de la planta que la

diferencian de las demás (raíces, anatomía de la hoja, tallo, semilla); seguidamente se identificaron los usos más comunes que se le da a esta especie en diversas partes del mundo.

En la siguiente sección del manual se introdujo la parte de prácticas de manejo agronómico, en donde se instruye al lector en temas sobre la producción tecnificada del cultivo de cicas, obtención de semillas, cuidados del semillero, tipo y frecuencia de riego, principales plagas encontradas en las plantaciones comerciales, transplante, densidad de siembra, fertilización y labores de cosecha. Otro aspecto que se rescató fue la parte reproductiva, de la cual muchas personas tienen desconocimiento debido a que en Costa Rica no existe ese tipo de explotación agrícola.

Fue relevante destacar las principales plagas que se han identificado para cicas en todo el mundo, entre ellas se encuentra la escama, el virus CNSV, algunos problemas sobre deficiencias de elementos nutritivos, la chasparria y su establecimiento sobre el follaje de la planta, que se ha identificado en otras partes del mundo.

En la última sección se incluye información sobre las principales estrategias para el manejo de la chasparria que afecta las cicas en Costa Rica; entre las cuales se mencionan estudios de fertilización, poda sanitaria y fungicidas experimentados en el presente estudio, así como también se incluye la escala diagramática de severidad para el monitoreo de la enfermedad.

Por último se consideró relevante mencionar la situación de las cicas a nivel mundial, debido a que hay desconocimiento de la existencia de organizaciones dedicadas a la investigación, reproducción y conservación de dicha especie.

5. CONCLUSIONES

- Las principales etapas del ritmo de emisión foliar de *C. revoluta*, son Infantil (V1), Formación (V2), Juvenil (V3) y Madurez (V4).
- Es posible identificar cada etapa de emisión foliar en *C. revoluta* al disponer de una escala fotográfica que ilustra y caracteriza cada una de ellas.
- El agente causal de la chasparria en *C. revoluta* es *Colletotrichum proteae* y la sintomatología asociada se encuentra caracterizada en el presente estudio.
- En etapas tempranas de emisión foliar (V1, V2, V3) el periodo de incubación es de tres a cinco días y el periodo de latencia de seis días.
- En hojas maduras de *C. revoluta* en etapa de emisión foliar V4, el periodo de Incubación fue de siete días, mientras que el periodo de latencia sucede transcurridos ocho días.
- Las hojas que se afectaron con mayor severidad fueron las de las etapas de emisión foliar V2 y V3 y fue leve sobre las etapas V1 y V4.
- Los ingredientes activos protectantes con mejores resultados de inhibición del crecimiento de *C. proteae* en pruebas de sensibilidad *in vitro* son propineb, metiram y clorotalonil.
- Los ingredientes activos sistémicos con los mejores resultados de inhibición del crecimiento de *C. proteae* en pruebas de sensibilidad *in vitro* son prochloraz, difenoconazole, pyrimethanil.
- Según la categorización de Edgington *et al.* (1971), los ingredientes activos evaluados prochloraz, difenoconazole y propineb fueron categorizados como de Alta sensibilidad, pyrimethanil como Media sensibilidad, metiram de Baja sensibilidad y clorotalonil, azoxistrobin, boscalid, mancozeb y mancozeb + oxiclóruo de Cobre, como Insensibles.
- Se logró diseñar un escala diagramática que permite visualizar la evolución de la chasparria en *C. revoluta*.
- La aplicación de ácido acético sobre lesiones de chasparria en *Cycas revoluta*, no disminuye la severidad de la enfermedad.

- El manejo convencional con rotación de productos químicos fungicidas sigue siendo la mejor estrategia para el manejo de la chasparria en *C. revoluta*.
- Fertilización en *C. revoluta* a base de Calcio, Magnesio y Silicio no presenta efecto sobre la severidad de la chasparria.
- El manual informativo generado a partir de esta experiencia de investigación se presenta como una herramienta de conocimiento accesible a personas interesadas en estudiar *Cycas revoluta*.

6. RECOMENDACIONES

- Realizar un estudio para determinar el tiempo transcurrido entre cada emisión foliar de *C. revoluta*.
- Para una comprobación más rigurosa de los Postulados de Koch, enviar a identificación molecular cultivos monoconidiales del re-aislamiento obtenido de las inoculaciones con *C. proteae* en *C. revoluta*.
- Realizar una investigación profunda sobre la etiología de los otros patógenos encontrados en las lesiones obtenidas del campo.
- Realizar análisis de sensibilidad *in vitro* de *C. proteae* a diferentes concentraciones de ácido acético para observar si existe algún efecto en la germinación de conidios y crecimiento micelial.
- Someter escala diagramática de severidad a validación rigurosa por medio de Análisis de regresión incluyendo el criterio de personas experimentadas y sin experiencia.
- Diseñar un plan de rotación de fungicidas para el manejo de chasparia en *C. revoluta*.
- Realizar pruebas con adherentes a los fertilizantes foliares (Nitrato de Calcio, Sulfato de Magnesio y Silicato de Potasio) para evitar el lavado del producto y aumentar la eficiencia de aplicación.
- Visitar plantaciones comerciales de *C. revoluta* para observar la distribución de la chasparria en las diferentes zonas productivas de Costa Rica.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abang, M; Abraham, W; Asiedu, R; Hoffmann, P; Wolf, G; Winter, S. 2009 . Secondary metabolite profile and phytotoxic activity of genetically distinct forms of *Colletotrichum gloeosporioides* from yam (*Dioscorea* spp.). *Mycological research* (113):130–140.
- Abarenkov, K; Henrik, R; Henrik, K; Alexander, I; Eberhardt, U; Erland, S; Hoiland, K; Kjoller, R; Larsson E, Pennanen, T; Sen, R; Taylor, A; Tedersoo, L; Ursing, B; Vralstad, T; Liimatainen, K; Peitner, U y Koljalg, U. The UNITE database for molecular identification of fungi – recent updates and future perspectives. *New Phytologist* (186):281-285.
- Alarcón, J; Chavarriaga, W. 2007. Diagnóstico precoz de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) (Penz) Penz & Sacc. en tomate de árbol mediante el empleo de infecciones quiescentes. *Agron.* 15(1): 89 - 102.
- Agrios, G. 2005. *Fitopatología*. 838 p.
- Aguirre, C; Chávez, T; García, P y Raya, J. 2007. El Silicio en los organismos vivos. *INTERCIENCIA*. 32(8): 504-509.
- Batista, J; Abreu, M; Sobral, I; Dias K y Borges, R. 2009. SENSIBILIDADE DE *Colletotrichum gloeosporioides* (MANCHA MANTEIGOSA DO CAFEIRO) A DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE FUNGICIDAS. *Ciênc. agrotec., Lavras.* (3):2052-2058.
- Banerjee, M; Shanoo, B y Jhuma, J. 2005. Regulatory effect of light and oxygen on nitrogen fixation by *Anabaena cycadae* in *Cycas*. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 11(1):93-97.
- Bastidas, O. s.f. Conteo con Hematocitómetro. Cámara de Neubauer. Celeromics. 6p. Consultado en Febrero 2015. Disponible en: <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>
- Broome, T. 1997. What fertilizer should I use on my cycads?. (en línea). Consultado 15 septiembre de 2013. Disponible en <http://www.plantapalm.com/vce/horticulture/fertilizer.htm>
- Burch, D. 1981. The propagation of Cycads. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 94:216-218.
- Cai, L; Hyde, K; Taylor, P; Weir, B; Waller, J; Abang, M; Zhang, J; Yang, Y; Phoulivong, S; Liu Z; Prihastuti, H; Shivas, R; McKenzie, E; Johnston, P. 2009. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Divers* (39):183–204

- Cannon, P; Damm, J; Johnston, P; Weir, B. 2012. Colletotrichum: current status and future directions. *Revista Studies in Mycology* 73: 181–213.
- CCAD (Comisión Centroamericana de Ambiente y Desarrollo). 2010. Informe de Valoración Económica del Proceso de Implementación de la Convención CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres). 34p.
- Crouch, J y Beirn, L. 2009. Anthracnose of cereals and grasses. *Fungal Diversity* 39: 19-44.
- Crous, P; Summerell, B; Taylor, J; Bullock, S. 2000. Fungi occurring on Proteaceae in Australia: selected foliicolous species. *Australas Plant Path* 29:267–278
- Dean, R; Van, J; Pretorius, Z; Hammond, K; Di Pietro, A; Spanu, P; Rudd, J; Dickman, M; Kahmann, R; Ellis, J; Foster, G. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 17p.
- Deghan, B. 1983. Propagation and Growth of Cycads – a conservation strategy. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 96:137-139.
- _____; Durando, J y Yeager, T. 1994. Symptoms And Treatments of Manganese Deficiency in *Cycas revolute* Thunb. *Hortscience* 29(6):645-648.
- Delgado, I; Sandoval, M; Rodríguez, C y Cárdenas, E. 2006. Aplicaciones foliares de calcio y silicio en la incidencia de mildiú en lechuga. *TERRA Latinoamericana*. 24(1):91-98.
- Donaldson, J. 2003. Cycads: Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Cycad Specialist Group. Cambridge. 97p.
- Dong, J; Chi, Q.; Wang, L y Chen D. 1999. Rhythm of leaf expansion and control technique of leaf shape for potted *Cycas revoluta*. *Journal of Fujian College of Forestry* 19(2):157-159.
- Edgington, L; Khew, K y Barron, G. 1971. Fungitoxic spectrum of Benzimidazole compounds. Consultado en febrero 2015. Disponible en http://www.apsnet.org/publications/phytopathology/backissues/Documents/1971Articles/Phyto61n01_42.PDF
- Epstein, E. 1999. Silicon. *Annual Review Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 641-664.
- Fauteux, F; Rémus, W; Menzies, J y Bélanger, R. 2005. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 249:1-6.

- Fernández, O; Quesada, A. 2009. Nematodos Asociados a los Cultivos de Costa Rica. MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). (en línea). Consultado 16 de septiembre de 2013. Disponible en [https://www.sfe.go.cr/tramites/Nematodos asociados a los%20Cultivos de Costa Rica.pdf](https://www.sfe.go.cr/tramites/Nematodos_asociados_a_los%20Cultivos_de_Costa_Rica.pdf)
- Filho, B., M.P; Zinder, G.H; Prabhu, A.S; Datnoff, L.E; Kornörfer, G.H. 2000. Importancia do silício para a cultura do arroz. Potafos. Encarte Técnico. Informações Agronômicas (89).
- Finch, H. 1990. Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina. 2da Edición reimpresión 2004, Editorial Trillas. México.
- Flores, E. 1999. La Planta. II Volumen. Editorial LUR. Cartago, Costa Rica. 884p.
- Fungicide Resistance Action Committee (FRAC). 2014. FRAC Code List: Fungicides sorted by mode of action. 10p.
- Gewies, A. 2003. Introduction to Apoptosis, retrieved.ApoReview 26p. Consultado en febrero 2015. Disponible en: <http://www.celldeath.de/encyclo/aporev/apointro.pdf>
- Gilchrist, L; Fuentes,C; Fuentes; Martínez, R; López, E; Duveiller, R; Singh, M; Henry, M y García, A. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. CYMMIT. México D.F. 75p.
- Gilman, E. 1999. *Cycas revoluta*. University of Florida, Cooperative Extension Service. 3p.
- Godoy, C; Carneiro, S; Iamauti, M; Dalla Pria, M; Amorim, L; Berger, R y Bergamin, A. 1997. Diagrammatic scales for bean disease: development and validation. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. Journal of Plant Diseases and Protection 104:336-345. Consultado en línea en febrero 2015. Disponible en: http://www.iapar.br/arquivos/File/zip_pdf/Diagrammatic%20scales.pdf
- Godoy, C; Koga, L y Canteri, M. 2006. Diagrammatic Scale for Assessment of Soybean Rust Severity. Fitopatol. Bras. 31(1): 63-68.
- Gómez, M. 2013. EFECTO DE LAS CONDICIONES DE INCUBACIÓN Y DE COMPUESTOS INORGÁNICOS Y ORGÁNICOS SOBRE LA ESPORULACIÓN DE LESIONES DE SIGATOKA NEGRA (*Mycosphaerella fijiensis*). Tesis Lic. Instituto Tecnológico de Costa Rica ITCR. 99p.
- Gómez, R; Rodríguez, M; Cárdenas, E y Sandoval, N. 2006. Fertilización foliar con silicio como alternativa contra la marchitez causada por *Fusarium oxysporum*

(Sheld) en tomate de cáscara . Revista Chapingo. Serie Horticultura, 12(1): 69-75.

Guzmán, M. 2012. Diagnóstico de patógenos en muestras foliares de Cycas. Correo electrónico impreso. Área de Fitopatología CORBANA.

Haddad, F; Maffia, L y Mizubuti, E. 2003. Avaliação de fungicidas para o controle de Colletotrichum gloeosporioides em cebola. Fitopatologia Brasileira, Brasília, 28(4): 435-437.

Harris, A. 2002. Nepoviruses and their Diagnosis in Plants. Agriculture, Fisheries and Forestry – Australia. Consultado el 30 octubre 2013. Disponible en http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=0CDQQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.daff.gov.au%2F_data%2Fassets%2Fpdf_file%2F0017%2F27161%2Fnepovirus.pdf&ei=n_abUurlHoSukQflyYG4CQ&usq=AFQjCNEI90tTefXK1pNcGq2c86sefHcDnA&sig2=8E_bvA08Qv2j8Ovwc6UjkQ

Horsfall, J y Barratt, R. 1945. An improved grading system for measuring plant diseases. (abstract). Phytopathology 35: 655. Consultado en línea en febrero 2015. Disponible en: <http://www.garfield.library.upenn.edu/classics1986/A1986A666500001.pdf>

Hyde, K; Cai, L; Cannon, P; Crouch, J; Crous, P; Damm, U; Goodwin, P; Chen, H; Johnston, P; Jones, E; Liu, Z; McKenzie, E; Moriwaki, J; Noireung, P; Pennycook, S; Pfenning, L; Prihastuti, H; Sato, T; Shivas, R; Tan, Y; Taylor, P; Weir, B; Yang, Y; Zhang, J. 2009. Colletotrichum: names in current use. Fungal Diversity 39, 147–182.

IQV AGRO. 2011. Bacteriosi en Nogueiras. Diapositivas

IUCN (International Union for Conservation of Nature). 2013. The IUCN Red List of Threatened Species. Consultado el 30 agosto 2013. Disponible en <http://www.iucnredlist.org/>

Janick, J y Paull, R. 2008. The Encyclopedia of Fruits and Nuts. CABI Publishing. USA. 954p.

Koski, R; Furlanetto, C y Tomita, C. 2001. Efeito de Fungicidas em Colletotrichum acutatum e Controle da Antracnose do Morangueiro. Fitopatologia Brasileira. 26(3): 662-666. Consultado en línea en febrero 2015. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/fb/v26n3/a16v26n3.pdf>

Kroemer, G; Galluzzi, L; Vandenabeele, P; Abrams, J; Alnemri, E; Baehrecke, E; Blagosklonny, M; El-Deiry, W; Golstein, P; Green, D; Hengartner, D; Knight, R; Kumar, S; Lipton, S; Malorni, W; Nunez, G; Peter, M; Tschopp, J; Yuan, J; Piacentini, M; Zhivotovsky, B y Melino, G. 2009. Classification of cell death:

recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. Cell Death Differ, 16: 3-11. Consultado en febrero 2015. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18846107>

Kordorferr, G y Datnoff, L. 1996. Fertilización con silicio: una alternativa para el control de enfermedades en caña de azúcar y arroz. Informaciones Agronómicas (22): 6-8.

Kyoda, S y Setoguchi, H. 2010. Phylogeography of *Cycas revoluta* Thunb. (Cycadaceae) on the Ryukyu Islands: very low genetic diversity and geographical structure. Plant Syst Evol. 288:177-189.

Leite, M y Amorim, L. 2002. Elaboração e validação de escala diagramática para mancha de *Alternaria* em girassol. Summa Phytopathologica 28:14-19. Consultado en línea en febrero 2015. Disponible en:

<http://cat.inist.fr/?aModele=afficheN&cpsidt=13758187>

Leyva, S; Soto, A; Espitia, E; Villaseñor, H; González, R y Huerta, R. 2004. Etiología e Incidencia de la Antracnosis *Colletotrichum graminicola* (Ces.) G.W. Wils. de la Avena (*Avena sativa* L.) en Michoacán, México. Revista Mexicana de FITOPATOLOGIA. 22(3): 351-355.

Liu, F; Damm, U; Cai, L; Crous, P. 2013. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* complex associated with anthracnose diseases of Proteaceae. Fungal Diversity 61: 89-105.

Lubbe, C; Denman, S; Cannon, P; Groenewalt, J; Lamprecht; Crous, P. 2004. Characterization of *Colletotrichum* species associated with disease of Proteaceae. Mycologia 4(96): 1268-1279.

Lubbe, C; Denman, S; Lamprecht, S; Crous, P. 2006. Pathogenicity of *Colletotrichum* species to *Protea* cultivars. Australasian Plant Pathology 35:37-41.

Luo, H. 2012. Using new tools to detect and characterise plant viruses. Tesis Ph.D. Murdoch University, Australia. 244h.

Madriz, K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta – patógeno. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). (63): 22-32.

Maharachchikumbura, S; Guo, G; Chukeatirote, E; Bahkali, A y Hyde, K. 2011. Pestalotiopsis morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. Fungal Diversity 50:167–187.

- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). 2007. Caracterización Cadena Local Plantas Ornamentales. Dirección Regional Huetar Norte Agencia de Servicios Agropecuarios La Tigra. 86p.
- Marler, T; Lee, V y Shaw, C. 2005. Cycad toxins and neurological disease. *HortScience* 40(6):1598-1606.
- _____ ; Lindstrom, A y Fisher, J. 2010a. Stem Tissue Dimensions Correlate with Vulnerability to Injury for Six *Cycas* Species. *HortScience*. 45(8):1293–1296.
- _____ y Moore, A. 2010b. Cryptic Scale Infestations on *Cycas revoluta* Facilitate Scale Invasions. *HortScience*. 45(5):837–839.
- Martins, M; Guerzoni, R; Câmara, G; Mattiazzi, P; Lourenço, S y Amorim, L. 2004. Escala diagramática para a quantificação do complexo de doenças foliares de final de ciclo em soja. *Fitopatologia Brasileira* 29:179-184. Consultado en línea en febrero 2015. Disponible en: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-41582004000200009&script=sci_abstract&tlng=pt
- MobileReference. 2009. Encyclopedia of Trees and Shrubs of the World. (en línea). Consultado 2 de octubre de 2013. Disponible en http://books.google.co.cr/books?id=mZEhZMOFLiQC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
- Molina, E. 1998. Encalado para la corrección de la acidez del suelo. Asociación Costarricense del Suelo (ACCS). 1era Edición. San José Costa Rica. 45p.
- Nishida, K; Kobayashi, A y Nagahama, T. 1956. Studies of Cycasin, a New Toxic Glycoside, of *Cycas revoluta* Thumb. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*. 20(3):122-126.
- Orozco, M. 2008. Nuevos Mecanismos de acción de Fungicidas en la Agricultura. Reunión de Agricultura Protegida 10 y 11 de Abril del 2008 Mazatlán, Sinaloa, México. Consultado el 14 septiembre 2013. Disponible en [http://www.bayercropscience.com.mx/bayer/cropscience/bcsmexico.nsf/files/external/\\$file/MODOS%20DE%20ACCION%20DE%20FUNGICIDAS.pdf](http://www.bayercropscience.com.mx/bayer/cropscience/bcsmexico.nsf/files/external/$file/MODOS%20DE%20ACCION%20DE%20FUNGICIDAS.pdf)
- Osborne, R; Calonge, M; Hill, K; Stanberg, L y Stevenson, D. 2012. World List of Cycads. 8th International Conference of Cycad Biology. 30p.
- Peñalva, M; Arst, H. 2002. Regulation of gene expression by ambient pH in filamentous fungi and yeast. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 426-446.
- Pérez, M y Vovides, A. 1997. Manual para el cultivo y propagación de cicadas. México. 36 p.

- Phoulivong, S. 2011. Colletotrichum, naming, control, resistance, biocontrol of weeds and current challenges. *Current Research in Environmental & Applied Mycology* 1(1), 53–73.
- Pontón, J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. *Revista Iberoamericana de Microbiología*. (25): 78-82.
- Popenoe, J. 2005. Sago *Cycas revoluta*. IFAS Extension. University of Florida. (en línea). Consultado 15 de septiembre de 2013. Disponible en http://hort.ifas.ufl.edu/database/documents/pdf/shrub_fact_sheets/cycrev.pdf
- Prihastuti, H; Cai, L; Chen, H; McKenzie, E; Hyde, K. 2009. Characterization of Colletotrichum species associated with coffee berries in Chiang Mai. *Fungal Diversity* (39): 89–109.
- PROCOMER (Promotora de Comercio Exterior). 2012. Sector plantas, flores y follajes. Consultado en línea 29 agosto 2013. Disponible en http://www.procomer.com/contenido/descargables/estadisticas/libro_estadistica2_012_v1-web.pdf
- Rao, R. Baheker, V. 1964. Fungi on *Cycas revolute* Thunb. *Mycopathologia* 23(4):266-268.
- Ribeiro, F; Corte-Real, M; Johansson, M. 2006. Caracterizacion of AND in Yeast Apoptosis Induced by Hydrogen Peroxide, Acetic Acid and Hyperosmotic Shock. *Molecular of Biology of the cell*: 4584-4591.
- Rinaldi, L; Margheri, M y Ena, A. 2005. Fertilizer-N Effects on *Cycas-Nostoc* Symbiosis. Poster session abstracts. 102nd Annual International Conference of the American Society for Horticultural Science. *HortScience* 40(4):1061
- Sánchez, M. 2014. Fotografías tomadas durante la etapa de campo en Trabajo Final de Graduación: Estudio de la etiología de la necrosis foliar en *Cycas revoluta* y evaluación de estrategias para el manejo de la enfermedad. Alajuela, Costa Rica.
- Samaniego, J; Cueto, C; Pedroza, A. 2008. Efecto fungistático y fungicida del ácido acético y aceite esencial de orégano sobre esclerocios de *Phymatotrichopsis omnívora*. *In vitro*. Memorias de la XX semana internacional de Agronomía. Durango, México. 193-195 p.
- Seckbach, J. 2012. Symbiosis: Mechanisms and model Systems. Kluwer Academic Publishers. 796p.
- Stevenson, D. 2001. Orden Cicadales. Trad. Favio González. Instituto de Ciencias Naturales. Bogotá, Colombia. 91p.

- Sánchez, M. 2013. Fotografías tomadas durante la investigación titulada: Estudio de la etiología de la Necrosis Foliar en *Cycas revoluta* y evaluación de estrategias para el control de la enfermedad.
- Sousa, M; Ludovico, P; Rodrigues, F; Leão, C y Côrte, M. 2012. Stress and Cell Death in Yeast Induced by Acetic Acid, Cell Metabolism - Cell Homeostasis and Stress Response. 208p. Consultado en febrero 2015. Disponible en <http://www.intechopen.com/books/cell-metabolism-cell-homeostasis-and-stress-response/stress-and-cell-death-in-yeast-induced-by-acetic-acid>
- Tavares, G y Souza, P. 2005. Efeito de fungicidas no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da Antracnose do Mamoeiro (Carica papaya L.). *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras 29(1):52-59.
- Taylor, A; Haynes, J; Stevenson, D; Holzman, G y Mendieta, J. 2012. Biogeographic Insights in Central American Cycad Biology. Edited by Lawrence Stevens. 98p.
- Thieret, J. 1958. Economic Botany of the Cycads, Chicago Natural History Museum. 12(1): 3-41.
- Uhre, G; Arneborg, N. 1998. Measurement of the effects of acetic acid and extracellular pH on intracellular pH of nonfermenting individual *Saccharomyces cerevisiae* cells by fluorescence microscopy. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 530:534
- University of Florida. 1999. *Cycas revoluta*. Cooperative Extension Service. Institute of Food and Agricultural Sciences. Consultado el 29 agosto 2013. Disponible en <http://baker.ifas.ufl.edu/Horticulture/documents/KingandEmperorSagoPalms.pdf>
- Vessey, J; Pawlowsky, K y Bergman, B. 2004. Root-based N₂-fixing symbioses Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. *Plant and Soil* 266: 205–230.
- Wild, A 1992. Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell. Mundi-Prensa. Madrid. 1045p.
- Whitelaw, M; Curtin, S; Huang, R; Steel, C; Blanchard, C; Roffey, P. 2007. Phylogenetic relationships and pathogenicity of *Colletotrichum acutatum* isolates from grape in subtropical Australia. *Plant Pathology* 56(3): 448– 463.
- Whitelock, L. 2002. The Cycads. Timber Press Inc. Portland, Oregon. 375 p.
- Yamada, S; Ohkubo, S.; Miyashita, H. y Setoguchi, H. 2012. Genetic diversity of symbiotic cyanobacteria in *Cycas revoluta* (Cycadaceae). *FEMS Microbiology Ecology* 81(3):696-706

ANEXOS

Anexo 1. Resultados de análisis de suelo de sustrato utilizado para las plantas en invernadero. Etapa I, CORBANA S.A, 2013



Informe de Ensayo

Laboratorio Químico

Centro de Investigaciones, CORBANA S.A.
La Rita, Pococí, Limón
Tel.: 2713-1675, 2713-1677 Fax 2783-3055
Email: vobando@corbana.co.cr

24/10/2013 0
Pág.: 1 de 1
QUI04005

Informe N°:
Boleta N°:
Factura N°:

Exper.: 39 Area experimental Sigatoka- La Rita
Finca: 1 La Rita
Solicita: MGUZMAN MAURICIO GUZMAN QUESADA
Teléfono: Email: mguzman@corbana.co.cr
Tipo de Muestra: 01 Suelos
Observaciones:

Ingreso/Entrega: 15/10/2013 /
Inicio del Muestreo: 11/10/2013
Fin del Muestreo: 11/10/2013
Responsable del Muestreo: Sección de Fitopatología
Cantidad: 1

Cultivo: 01 Banano

| Cod.Muestra | Id. de la Muestra (colilla) | pH | Acid. cmol(+)/L | Ca | Mg | K | P mg/L | Fe | Cu | Zn | Mn | M.O. % | Observaciones |
|-----------------|-----------------------------|------|-----------------|-------|------|------|--------|-----|-----|------|-----|--------|---------------|
| BU-2013-0013426 | SUELO | 6.57 | 0.06 | 17.50 | 5.71 | 3.44 | 445 | 129 | 6.5 | 19.7 | 132 | 7.9 | |

Métodos de Ensayo:

pH: Extracción en agua (1:2.5)
Acidez: Extracción en KCl 1 M y titulación
Ca, Mg, K, P, Fe, Cu, Zn y Mn: Extracción con disolución Mehlich 3 y lectura en ICP-AES
M.O.: Walkley & Black


Nota: El Laboratorio queda eximido de toda responsabilidad, en interpretaciones de resultados, cuando el muestreo no ha sido realizado por CORBANA, S.A.

Jefe de Laboratorio Químico VEDA MARIA OBANDO BUSTOS

Anexo 2. Tratamientos aplicados a plantas en el campo, para determinar la dosis óptima a utilizar en las pruebas en campo con ácido acético.

| | | | | | | |
|--|-----|---------------|---------|---|-----------------|--------|
| | T1 | Ácido acético | 5 ml/L | | | |
| | T2 | Ácido acético | 10 ml/L | | | |
| | T3 | Ácido acético | 20 ml/L | | | |
| | T4 | Ácido acético | 5 ml/L | + | Clortosip 72 SC | 8 ml/L |
| | T5 | Ácido acético | 10 ml/L | + | Clortosip 72 SC | 8 ml/L |
| | T6 | Ácido acético | 20 ml/L | + | Clortosip 72 SC | 8 ml/L |
| | T7 | Ácido acético | 30 ml/L | | | |
| | T8 | Ácido acético | 40 ml/L | | | |
| | T9 | Ácido acético | 30 ml/L | + | Clortosip 72 SC | 8 ml/L |
| | T10 | Ácido acético | 40 ml/L | + | Clortosip 72 SC | 8 ml/L |

Anexo 3. Resultados de la identificación a nivel molecular de las muestras de patógenos aislados de *C. revoluta* obtenidas del campo.

| | | |
|---|--|---------------------------------|
|  | Dirección de investigaciones Sección de Fitopatología Laboratorio Biología Molecular | Consecutivo: DI-SF-BMS-029-2014 |
| | | Fecha: 12 de agosto de 2014 |










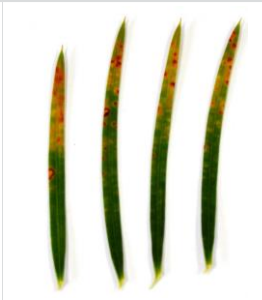
| |
|---|
| <p>Servicio solicitado: Amplificación y secuenciación Bacterias y Hongos</p> <p>Solicitante: Claudiana Carr Ing y Mauricio Guzmán Ing</p> <p>Fecha de solicitud: 23 de mayo 2014</p> <p>Tipo de producto (s) evaluado (s): Cultivos puros de Bacterias y Hongos</p> |
|---|













Tabla 1 Identificación de las muestras y resultados de secuenciación (Macrogen Inc, NCBI, RDP/UNITE)

| # | Cód Lab BM | Cód muestra | Organismo (s) Coincidentes RDP/UNITE | % conf | Organismo (s) Coincidentes NCBI | % ident |
|----|------------|----------------------------|--------------------------------------|--------|---------------------------------------|---------|
| 31 | 05-249 | Cyca Marilyn A1 05/5/14 | <i>Fusarium sp.</i> | 95 | <i>Fusarium sp.</i> | 99 |
| 32 | 05-250 | Cyca Marilyn A2 23/4 | <i>Colletotrichum proteae</i> | 95 | <i>Colletotrichum sp.</i> | 99 |
| 33 | 05-251 | Cyca Marilyn A3 05/05 | <i>Nigrospora sphaerica</i> | 95 | <i>Nigrospora sphaerica</i> | 99 |
| 34 | 05-252 | Cyca Marilyn B2 23/4 | <i>Colletotrichum proteae</i> | 95 | <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> | 99 |
| 35 | 05-253 | Cyca Marilyn C2 05/05 | <i>Fusarium sp.</i> | 95 | <i>Fusarium sp.</i> | 100 |
| 36 | 05-254 | Cyca Marilyn C3 05/05 | <i>Nigrospora sphaerica</i> | 95 | <i>Nigrospora sphaerica</i> | 100 |
| 37 | 05-255 | Cyca Marilyn D2 23/4 | <i>Davidiella tassiana</i> | 95 | <i>Cladosporium sp.</i> | 100 |
| 38 | 05-256 | Cyca Marilyn B1 | <i>Nigrospora sphaerica</i> | 95 | <i>Nigrospora sphaerica</i> | 99 |
| 39 | 05-257 | Cyca Marilyn B3 | <i>Aspergillus sp</i> | 95 | <i>Aspergillus sp</i> | 100 |
| 40 | 05-258 | Cyca Marilyn C1 05/05 | <i>Cochliobolus geniculatus</i> | 95 | <i>Cochliobolus geniculatus</i> | 99 |
| 41 | 05-259 | Cyca Marilyn D1 05/05 | <i>Pestalotiopsis foedans</i> | 95 | <i>Pestalotiopsis sp.</i> | 99 |
| 42 | 05-260 | Cyca Marilyn E 05/05 | <i>Pestalotiopsis foedans</i> | 95 | <i>Pestalotiopsis clavispora</i> | 99 |

Anexo 4. Sintomatología correspondiente a la “chasparria” en *Cycas revoluta*, presentados a nivel de campo.

Síntomas presentados por chasparria en campo

| Ilustración | | | Caracterización | Patógeno presente en lesión |
|---|---|------------|---|--|
|  |  | A | Se presenta como una desecación repentina o acelerada de foliolos jóvenes que avanza desde el ápice hacia la base del mismo. A diferencia del síntoma B, el tejido dañado tiende a corrugarse y puede haber absición de la totalidad o parte del mismo. Al igual que en B y en G, se observa en el tejido seco la formación de estructuras (cuerpos fructíferos del hongo) que semejan puntos negros. | <i>Fusarium</i> sp. <i>Colletotrichum proteae</i> <i>Nigrospora sphaerica</i> |
|  |  | B | Lesión de apariencia seca, que inicia desde el extremo apical del foliolo y va avanzando hacia la base del mismo hasta secarlo por completo. El tejido se endurece, se tuesta y se observa la formación de estructuras (cuerpos fructíferos del hongo) que semejan puntos negros. | <i>Nigrospora sphaerica</i> <i>Colletotrichum proteae</i> <i>Aspergillus</i> sp. |
|  |  | C | La lesión inicia como un punto decolorado en la parte central o borde del foliolo. Con el tiempo un halo clorótico envuelve la lesión la cual al crecer causa deformación del tejido hacia el borde del foliolo. La lesión crece hasta unos 0,5 cm, su parte interna se seca y se hunde hasta que se forma una zona de tejido muerto. En otros casos se da la deformación del tejido hacia el borde del foliolo, puede tratarse de infecciones latentes o que han sido parcialmente controladas por aplicaciones de fungicidas. | <i>Cochliobolus geniculatus</i> <i>Fusarium</i> sp. <i>Nigrospora sphaerica</i> |
|  |  | D | Consiste en un desecamiento del foliolo que va avanzando desde la punta hacia el peciolo, tiene color rojo - cobrizo y no necesariamente los foliolos afectados se encuentran cercanos entre si. | <i>Pestalotiopsis foedans</i> |
|  |  | E-F | Lesiones redondeadas color café-marrón o cobre, dispersos de la parte media del foliolo hacia el ápice del mismo. No hay deformación de los foliolos y provocan una despigmentación gradual del foliolo o de la hoja entera. | <i>Pestalotiopsis foedans</i> <i>Davidiella tassiana</i> |

| | | | |
|---|---|---|--|
|  |  | <p>G Al principio la lesión es de color grisáceo, de apariencia húmeda, luego se torna café claro en los bordes y gris claro en su parte central y se forman círculos concéntricos con puntos negros en la superficie. Las lesiones se ubican principalmente en la parte media de los foliolos, secando su parte apical, la cual luego se dobla o retorce y pueden llegar a desprenderse de la hoja. En caso de abscisión una parte de la hoja y encrespamiento del extremo, puede ser similar al síntoma A.</p> | <p><i>Inoculado: Colletotrichum proteae</i></p> |
|  |  | <p>H Se presenta una lesión inicial en el raquis de la hoja, creando una especie de herida. También se da la deformación de la hoja por medio de un encorbamiento, ya sea hacia abajo, hacia arriba o a un lado y por último el raquis se quiebra en la lesión. Luego se desencadenan los síntomas presentados por el síntoma G.</p> | <p><i>Inoculado: Colletotrichum proteae</i></p> |
|  |  | <p>I Deformación y despigmentación verde claro de la parte media de un grupo de foliolos consecutivos de la hoja. Primero se deforma una parte del foliolo y luego va perdiendo la coloración verde oscuro. Se puede dar naturalmente el proceso de abscisión del foliolo en la parte afectada. Es posible que este síntoma esté relacionado con desórdenes nutricionales.</p> | <p>Infección contrarrestada por fungicidas o desórden nutricional</p> |
|  |  | <p>J Despigmentación y leve deformación de la parte central de los foliolos de la hoja sin presencia de necrosis. Es probable que este síntoma esté relacionado con el I.</p> | <p>Posiblemente infección contrarrestada por fungicidas o desorden nutricional.</p> |
|  |  | <p>K Decoloración y secamiento del tejido que inicia en la base del foliolo y avanza hacia el ápice del mismo. La lesión se seca, el tejido se mantiene firme y no hay presencia de puntos negros como en la lesión A, B y G. Se le atribuye a un desorden fisiológico o producto de un efecto fungicida y no a una patología como tal.</p> | <p>Posiblemente infección contrarrestada por fungicidas o de carácter fisiológico.</p> |
|  |  | <p>L Se presenta una fuerte despigmentación amarillo claro en partes de los foliolos a manera de manchas o rayas transversales. Algunas veces puede haber deformación, este síntoma se ha observado en plantas en semillero y adultas.</p> | <p>Posiblemente desorden fisiológico o virus</p> |

Anexo 5. Análisis de muestra de suelo obtenida del área experimental en campo. Etapa III, Los Chiles 2014.



Informe de Ensayo

07/11/2014 11:06 AM
 Pág.: 1 de 1
 QUI04005

Laboratorio Químico
 Centro de Investigaciones, CORBANA S.A.
 La Rita, Pococi, Limón
 Tel.: 2713-1675, 2713-1677 Fax 2763-3055
 Email: vobando@corbana.co.cr

Informe N°: 2014001170
Boleta N°: 20141023
Factura N°:

Exper.: 39 **Area experimental** Sigatoka- La Rita
Finca: 1 La Rita
Solicita: CCARR CLAUDIANA CARR RODRIGUEZ
Entrega: CLAUDIANA CARR
Teléfono: **Email:** ccarr@corbana.co.cr

Ingreso/Entrega: 28/10/2014 /
Inicio del Muestreo: 28/10/2014
Fin del Muestreo: 28/10/2014
Responsable del Muestreo: Sección de Fitopatología
Cantidad: 1

Tipo de Muestra: 01 Suelos **Cultivo:** 01 Banano

Observaciones:

| Cod.Muestra | Id. de la Muestra (colilla) | ° | | cmol(+)L | | | | | mg/L | | | | | % | Observaciones |
|--------------|-----------------------------|------|------|----------|------|------|---|-----|------|-----|-----|------|--|---|---------------|
| | | pH | Acid | Ca | Mg | K | P | Fe | Cu | Zn | Mn | M.O. | | | |
| 2014-0018672 | CYCA REVOLUTA | 4.83 | 0.92 | 4.14 | 1.21 | 0.41 | 2 | 147 | 5.0 | 1.2 | 106 | 5.5 | | | |

Métodos de Ensayo:

pH: Extracción en agua (1:2.5)
 Acidez: Extracción en KCl 1 M y titulación
 Ca, Mg, K, P, Fe, Cu, Zn y Mn: Extracción con disolución Mehlich 3 y lectura en ICP-AES
 M.O.: 2 x C; C: carbono total por combustión

Nota: El Laboratorio queda eximido de toda responsabilidad, en interpretaciones de resultados, cuando el muestreo no ha sido realizado por CORBANA, S.A.

Jefe de Laboratorio Químico **VEDA MARIA OBANDO BUSTOS**

Anexo 6. Programa de Rotación de fungicidas Convencionales y No convencionales en la plantación de *Cycas revoluta* para el manejo de la chasparria. Etapa III, Los Chiles, 2014.

| Aplicaciones fungicidas en Etapa IIIB | | | | | | | | |
|---------------------------------------|-----------------------|---------|-----------|-----------|-----------------|--------------------------|---------|---------------------|
| Aplic. # | Rotación convencional | | | | Coadyuvante | Rotación NO convencional | | |
| | Protectante | | Sistémico | | | Formulado en finca | | Sintético |
| 1 | Kumulus | 1,5 g/L | - | - | Cosmo In 1 ml/L | Ác. Acético | 50 ml/L | Clorotalonil 8 ml/L |
| 2 | Cobrethane | 8 g/L | - | - | Cosmo In 1 ml/L | Protector Zinc | 17 ml/L | |
| 3 | Antracol | 8 g/L | Bellis | 1 g/L | Cosmo In 1 ml/L | Caldo Bordelés | 17 ml/L | |
| 4 | Mancol | 10 ml/L | - | - | - | Ác. Acético | 50 ml/L | Clorotalonil 8 ml/L |
| 5 | Clorotalonil | 8 ml/L | - | - | - | Protector Zinc | 17 ml/L | |
| 6 | Cobrethane | 8 g/L | Bayleton | 0,66 g/L | Cosmo In 1 ml/L | Caldo Bordelés | 17 ml/L | |
| 7 | Kumulus | 1,5 g/L | - | - | Cosmo In 1 ml/L | Ác. Acético | 50 ml/L | Clorotalonil 8 ml/L |
| 8 | Clorotalonil | 4 ml/L | Duett | 2,5 ml/L | Cosmo In 1 ml/L | Protector Zinc | 17 ml/L | |
| 9 | Cobrethane | 8 g/L | - | - | Cosmo In 1 ml/L | Caldo Bordelés | 17 ml/L | |
| 10 | Clorotalonil | 4 ml/L | Sportak | 1,33 ml/L | Cosmo In 1 ml/L | Ác. Acético | 50 ml/L | Clorotalonil 8 ml/L |
| 11 | Vondozeb Plus | 10 ml/L | - | - | Nu-Film | Protector Zinc | 17 ml/L | |
| 12 | Antracol | 8 g/L | Amistar | 1 g/L | Cosmo In 1 ml/L | Caldo Bordelés | 17 ml/L | |
| 13 | Cobrethane | 8 g/L | - | - | Cosmo In 1 ml/L | Ác. Acético | 50 ml/L | Clorotalonil 8 ml/L |
| 14 | Clorotalonil | 4 ml/L | Score | 1,33 ml/L | Cosmo In 1 ml/L | Protector Zinc | 17 ml/L | |
| 15 | Vondozeb Plus | 10 ml/L | - | - | Nu-Film | Caldo Bordelés | 17 ml/L | |
| 16 | Antracol | 8 g/L | Piramide | 2 ml/L | Cosmo In 1 ml/L | Ác. Acético | 50 ml/L | Clorotalonil 8 ml/L |
| 17 | Cobrethane | 8 g/L | - | - | Cosmo In 1 ml/L | Protector Zinc | 17 ml/L | |
| 18 | Clorotalonil | 4 ml/L | BanRot | 1,75 g/L | Cosmo In 1 ml/L | Caldo Bordelés | 17 ml/L | |
| 19 | Vondozeb Plus | 10 ml/L | - | - | Nu-Film | Ác. Acético | 50 ml/L | Clorotalonil 8 ml/L |
| 20 | Antracol | 8 g/L | - | - | Nu-Film | Protector Zinc | 17 ml/L | |
| 21 | Cobrethane | 8 g/L | Score | 1,33 ml/L | Cosmo In 1 ml/L | Caldo Bordelés | 17 ml/L | |

Anexo 7. Rotación de fungicidas no convencionales, dosis y preparación.

| Fungicida | Dosis/L | Preparación |
|------------------------------|--|--|
| Ácido acético + Clorotalonil | 50 ml L ⁻¹ + 8 ml L ⁻¹ | Mezcla de ambos |
| Protector Zn | 17 ml L ⁻¹ | 20 L Sulfocalcico + 2 kg Sulfato de Zn |
| Caldo bordelés | 17 ml L ⁻¹ | Sulfato de Cu pentahidratado + oxido de Ca + Agua (1:1:100) Calentar el Cobre y depositar sobre la cal disuelta. El pH debe estar cercano a 6. |

Anexo 8. Resumen informativo sobre fungicidas utilizados en la rotación convencional en el experimento IIIB. (Fuente: Elaboración propia, tomado de fichas técnicas del producto comercial).

| Información sobre fungicidas Etapa IIIB | | | | |
|--|------------------|---|--|-----------------------------|
| Abril a Septiembre 2014 | | | | |
| Aplic. # | Fungicida | Ingrediente Activo | Mecanismo de acción | Grupo químico |
| 1 | Kumulus® 80 WG | Azufre inorgánico | Inhibe el proceso de germinación y desarrollo de hongos | Inorgánico |
| 2 | Cobrethane® | Mancozeb (50%) + Oxicloruto de Cu (19%) | Fungicida preventivo, con propiedades adherentes | Ditiocarbamato + inorgánico |
| 3 | Bellis® 38 WG | Boscalid + pyraclostrobin | Sistémico local translaminar. Mecanismos de acción: intervine en la liberación de etileno y afecta la producción de ATP en el hongo. Intensifica la acción de la enzima Nitrato reductasa. Tiene efecto antiesporulante. | Anilidas + Azoxistrobina |
| | Antracol® 70 WP | Propineb | Afecta la respiración celular del hongo. | Ditiocarbamato |
| 4 | Manco® 43.5 SC | Mancozeb | Amplio espectro | Ditiocarbamato |
| 5 | Clortosip® 72 SC | Clorotalonil | Se une con las moléculas de Glutathione y estas dejan sin sustrato a enzimas importantes en procesos vitales de la célula del hongo (respiración, producción de energía). | Cloronitrilos |
| 6 | Cobrethane® | Mancozeb (50%) + Oxicloruto de Cu (19%) | 2. | |
| | Bayleton® 25 WP | Triadimefon | El efecto se da al interior del follaje, elimina haustorios y esporas germinadas. | Triazol |
| 7 | Kumulus® 80 WG | Azufre inorgánico | 1. | |
| 8 | Clortosip® 72 SC | Clorotalonil | 5. | |
| | Duett 25SC | Epoxiconazole + Carbendazina | Inhibe la síntesis del ergosterol + inhibe tubo germinativo, formación de apresorios y crecimiento de micelio. | Triazol + Benzimidazol. |
| 9 | Cobrethane® | Mancozeb (50%) + Oxicloruto de Cu (19%) | 2. | |
| 10 | Clortosip® 72 SC | Clorotalonil | 5. | Cloronitrilos |
| | Sportak 45 EC | Prochloraz | Inhibición de la síntesis del ergosterol | Imidazol |

| Aplic. # | Fungicida | Ingrediente Activo | Mecanismo de acción | Grupo químico |
|----------|---------------------|---|--|----------------|
| 11 | Vondozeb Plus 42 SC | Mancozeb | Actúa en la producción de energía al reaccionar con los grupos SH de proteínas, principalmente enzimas, dentro de la célula, ocurriendo una acción multisitio. | Ditiocarbamato |
| 12 | Antracol® 70 WP | Propineb | 3. | Estrobilurina |
| | Amistar 50 WG | Azoxistrobina | Inhibidor de la respiración mitocondrial mediante la unión del sitio Qo del citocromo b, interrumpiendo el ciclo de energía dentro del hongo. Interfiere en el ciclo de vida principalmente durante la germinación de las esporas y la penetración del tejido. | |
| 13 | Cobrethane® | Mancozeb (50%) + Oxicloruro de Cu (19%) | 2. | |
| 14 | Clortosip® 72 SC | Clorotalonil | 5. | Triazol |
| | Score 25 EC | Difenoconazole | Rápida penetración dentro de la planta de forma traslaminar, presentando una sistemía local. | |
| 15 | Vondozeb Plus 42 SC | Mancozeb | 11. | |
| 16 | Antracol® 70 WP | Propineb | 3. | Anilopirimidas |
| | Piramide 60 SC | Pyrimethanil | Actúa como inhibidor de la biosíntesis de la metionina, inhibiendo la secreción de enzimas necesarias para la infección del patógeno. | |
| 17 | Cobrethane® | Mancozeb (50%) + Oxicloruro de Cu (19%) | 2. | |
| 18 | Clortosip® 72 SC | Clorotalonil | 5. | |
| 19 | BanRot 40 WP | Etridiazol | | |
| 20 | Vondozeb Plus 42 SC | Mancozeb | 11. | |
| 21 | Antracol® 70 WP | Propineb | 3. | |
| | Score 25 EC | Difenoconazole | 14 | |
| 22 | Cobrethane® | Mancozeb (50%) + Oxicloruro de Cu (19%) | 2. | |

Anexo 9. Análisis foliares obtenidos de muestras en el área de experimento IIC en Alajuela, Los Chiles 2014.



Informe de Ensayo

14/11/2014 08:40 AM
Pág.: 1 de 1
QUI04005

Laboratorio Químico
Centro de Investigaciones, CORBANA S.A.
La Rita, Pocosí, Limón
Tel.: 2713-1675, 2713-1677 Fax 2763-3055
Email: vobando@corbana.co.cr

Informe N°: 2014001211
Boleta N°: 20141058
Factura N°: 15621

Cliente: 444 AGRIOTECNOLOGIA DE COSTA RICA

Finca: 1 nd

Solicita: 2 Esteban Blanco

Entrega: MAURICIO GUZMAN

Teléfono: Email: eblanco@agriobiocr.com

Tipo de Muestra: 02 Foliare

Cultivo: 36 cyca

Ingreso/Entrega: 07/11/2014 /

Inicio del Muestreo: 07/11/2014

Fin del Muestreo: 07/11/2014

Responsable del Muestreo: Solicitante (Cliente)

Cantidad: 4

Observaciones:

| Cod.Muestra | Id. de la Muestra (colilla) | % sobre base seca | | | | | | mg/kg | | | | | | Observaciones |
|----------------|-----------------------------|-------------------|------|------|------|------|------|-------|------|----|----|----|------|---------------|
| | | N | P | K | Ca | Mg | S | Fe | Cu | Zn | Mn | B | Al-e | |
| o-2014-0019191 | FESTIGO 147.7g | 2.17 | 0.10 | 1.12 | 0.52 | 0.13 | 0.13 | 176 | 13.9 | 15 | 77 | 13 | 137 | |
| o-2014-0019192 | AMARILLO 148.7g | 2.28 | 0.10 | 1.10 | 0.51 | 0.13 | 0.13 | 219 | 15.7 | 17 | 76 | 12 | 156 | |
| o-2014-0019193 | ROJO 146.5g | 2.24 | 0.10 | 1.05 | 0.51 | 0.13 | 0.12 | 156 | 14.3 | 15 | 71 | 13 | 102 | |
| o-2014-0019194 | BLANCO 150.1g | 2.22 | 0.10 | 1.05 | 0.49 | 0.13 | 0.13 | 591 | 15.6 | 16 | 77 | 13 | 150 | |

Métodos de Ensayo:

N: Combustión seca

P, K, Ca, Mg, S, Fe, Cu, Zn, Mn, B y Al-e: digestión en microondas (HNO₃ y H₂O₂) y lectura en ICP-AES

Nota: El Laboratorio queda eximido de toda responsabilidad, en interpretaciones de resultados, cuando el muestreo no ha sido realizado por CORBANA, S.A.

Jefe de Laboratorio Químico

VEDA MARIA OBANDO BUSTOS

Anexo 10. Análisis de Varianza incluidos en resultados.

- **ANDEVA Longitud de la hoja. ETAPA IA**

GRUPO A

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|------------------|-----|----------------|-------------------|-------|
| Longitud de hoja | 240 | 0,78 | 0,77 | 22,35 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|---------|---------|-----|--------|-------|---------|
| Modelo. | 5723,54 | 11 | 520,32 | 73,96 | <0,0001 |
| DDE | 5723,54 | 11 | 520,32 | 73,96 | <0,0001 |
| Error | 1604,02 | 228 | 7,04 | | |
| Total | 7327,56 | 239 | | | |

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,65271

Error: 7,0352 gl: 228

DDE Medias n E.E.

| | | | | | | | |
|----|-------|----|------|---|---|---|-----|
| 0 | 2,95 | 20 | 0,59 | A | | | |
| 2 | 4,33 | 20 | 0,59 | A | | | |
| 4 | 6,37 | 20 | 0,59 | | B | | |
| 6 | 8,62 | 20 | 0,59 | | | C | |
| 8 | 11,01 | 20 | 0,59 | | | | D |
| 10 | 12,93 | 20 | 0,59 | | | | E |
| 12 | 14,75 | 20 | 0,59 | | | | F |
| 14 | 15,55 | 20 | 0,59 | | | | F G |
| 16 | 16,13 | 20 | 0,59 | | | | F G |

| | | | | |
|----|-------|----|------|---|
| 18 | 16,52 | 20 | 0,59 | G |
| 20 | 16,63 | 20 | 0,59 | G |
| 22 | 16,64 | 20 | 0,59 | G |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

GRUPO B

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|------------------|-----|----------------|-------------------|-------|
| Longitud de hoja | 206 | 0,90 | 0,89 | 13,80 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|---------|----------|-----|--------|--------|---------|
| Modelo. | 10637,71 | 11 | 967,06 | 157,54 | <0,0001 |
| DDE | 10637,71 | 11 | 967,06 | 157,54 | <0,0001 |
| Error | 1190,87 | 194 | 6,14 | | |
| Total | 11828,57 | 205 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,66830

Error: 6,1385 gl: 194

| DDE | Medias | n | E.E. | |
|-----|--------|----|------|-----|
| 0 | 4,02 | 17 | 0,60 | A |
| 2 | 6,29 | 17 | 0,60 | B |
| 4 | 10,08 | 17 | 0,60 | C |
| 6 | 13,61 | 17 | 0,60 | D |
| 8 | 17,72 | 17 | 0,60 | E |
| 10 | 20,58 | 17 | 0,60 | F |
| 12 | 22,29 | 17 | 0,60 | G |
| 14 | 23,44 | 17 | 0,60 | G H |
| 16 | 23,92 | 17 | 0,60 | G H |
| 18 | 24,04 | 17 | 0,60 | H |
| 20 | 24,05 | 17 | 0,60 | H |
| 22 | 24,58 | 19 | 0,57 | H |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

• ANDEVA ANCHO DE LA HOJA. ETAPA I

GRUPO A

C:\Users\Marilyn\Dropbox\Cycas\3-TESIS DOC FINALES ENERO
2015\Ancho_hoja.IDB2 : 14/02/2015 - 03:52:35 p.m. - [Versión : 01/11/2014]

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|------------|-----|----------------|-------------------|-------|
| Ancho hoja | 240 | 0,90 | 0,90 | 24,57 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|---------|---------|----|--------|--------|---------|
| Modelo. | 2140,45 | 11 | 194,59 | 193,39 | <0,0001 |
| DDE | 2140,45 | 11 | 194,59 | 193,39 | <0,0001 |

| | | | |
|-------|---------|-----|------|
| Error | 229,41 | 228 | 1,01 |
| Total | 2369,86 | 239 | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,62503

Error: 1,0062 gl: 228

| DDE | Medias | n | E.E. | |
|-----|--------|----|------|-----|
| 0 | 0,25 | 20 | 0,22 | A |
| 2 | 0,36 | 20 | 0,22 | A |
| 4 | 0,52 | 20 | 0,22 | A |
| 6 | 0,86 | 20 | 0,22 | A |
| 8 | 2,19 | 20 | 0,22 | B |
| 10 | 3,59 | 20 | 0,22 | C |
| 12 | 5,20 | 20 | 0,22 | D |
| 14 | 6,21 | 20 | 0,22 | E |
| 16 | 7,00 | 20 | 0,22 | F |
| 18 | 7,49 | 20 | 0,22 | F G |
| 20 | 7,58 | 20 | 0,22 | F G |
| 22 | 7,74 | 20 | 0,22 | G |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

GRUPO B

C:\Users\Marilyn\Dropbox\Cycas\3-TESIS DOC FINALES ENERO 2015\DATOS ANCHO
 HOJA.IDB2 : 14/02/2015 - 05:16:08 p.m. - [Versión : 01/11/2014]

Análisis de la varianza

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------|-----|----------------|-------------------|-------|
| ANCHO | 216 | 0,79 | 0,78 | 29,09 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|---------|---------|-----|--------|-------|---------|
| Modelo. | 1807,57 | 11 | 164,32 | 70,41 | <0,0001 |
| DDE | 1807,57 | 11 | 164,32 | 70,41 | <0,0001 |
| Error | 476,11 | 204 | 2,33 | | |
| Total | 2283,68 | 215 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,00404

Error: 2,3339 gl: 204

| DDE | Medias | n | E.E. | |
|-------|--------|----|------|-----|
| 2,00 | 0,88 | 18 | 0,36 | A |
| 0,00 | 1,00 | 18 | 0,36 | A |
| 4,00 | 1,71 | 18 | 0,36 | A |
| 6,00 | 2,74 | 18 | 0,36 | B |
| 8,00 | 4,12 | 18 | 0,36 | C |
| 10,00 | 5,51 | 18 | 0,36 | D |
| 12,00 | 6,64 | 18 | 0,36 | E |
| 14,00 | 7,33 | 18 | 0,36 | E F |
| 16,00 | 7,90 | 18 | 0,36 | F G |
| 18,00 | 8,23 | 18 | 0,36 | F G |
| 20,00 | 8,38 | 18 | 0,36 | G |
| 22,00 | 8,58 | 18 | 0,36 | G |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

- ANDEVA PARTICIONADO POR CONCENTRACIÓN DE INGREDIENTES ACTIVOS. ETAPA IIC**

PROTECTANTES

C:\Users\Marilyn\Dropbox\Cycas\RESULTADOS Toma de datos TESIS\Análisis Estadístico INFOSTAT\II C Datos sensibilidad promedio.IDB2 : 09/02/2015 - 07:43:59 a.m. - [Versión : 01/11/2014]

Análisis de la varianza

| Concentración mg/Kg | Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|---------------------|-----------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| 0 | Diámetro colonia (cm) | 28 | 0,29 | 0,17 | 13,50 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------------------|-------|----|------|------|---------|
| Modelo. | 7,35 | 4 | 1,84 | 2,39 | 0,0807 |
| Ingrediente activo | 7,35 | 4 | 1,84 | 2,39 | 0,0807 |
| Error | 17,71 | 23 | 0,77 | | |
| Total | 25,06 | 27 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,08904

Error: 0,7699 gl: 23

| Ingrediente activo | Medias | n | E.E. |
|---------------------------|--------|---|----------|
| Clorotalonil | 5,05 | 6 | 0,36 A |
| Metiram | 5,73 | 5 | 0,39 A B |
| Mancozeb_Oxicloruro_de_Cu | 5,76 | 6 | 0,36 A B |
| Mancozeb | 6,04 | 6 | 0,36 A B |
| Propineb | 6,65 | 5 | 0,39 B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

| Concentración mg/Kg | Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|---------------------|-----------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| 0,01 | Diámetro colonia (cm) | 25 | 0,21 | 0,05 | 16,24 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------------------|-------|----|------|------|---------|
| Modelo. | 4,58 | 4 | 1,15 | 1,31 | 0,3015 |
| Ingrediente activo | 4,58 | 4 | 1,15 | 1,31 | 0,3015 |
| Error | 17,53 | 20 | 0,88 | | |
| Total | 22,11 | 24 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,24550

Error: 0,8767 gl: 20

| Ingrediente activo | Medias | n | E.E. |
|---------------------------|--------|---|----------|
| Metiram | 4,40 | 6 | 0,38 A |
| Propineb | 4,97 | 4 | 0,47 A B |
| Mancozeb | 5,26 | 5 | 0,42 A B |
| Mancozeb_Oxicloruro_de_Cu | 5,34 | 5 | 0,42 A B |
| Clorotalonil | 5,58 | 5 | 0,42 B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

| Concentración mg/Kg | Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|---------------------|----------|---|----------------|-------------------|----|
|---------------------|----------|---|----------------|-------------------|----|

0,1 Diámetro colonia (cm) 29 0,59 0,52 14,32

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------------------|-------|----|------|------|---------|
| Modelo. | 24,65 | 4 | 6,16 | 8,60 | 0,0002 |
| Ingrediente activo | 24,65 | 4 | 6,16 | 8,60 | 0,0002 |
| Error | 17,19 | 24 | 0,72 | | |
| Total | 41,84 | 28 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,02850

Error: 0,7163 gl: 24

| Ingrediente activo | Medias | n | E.E. |
|---------------------------|--------|---|----------|
| Propineb | 3,89 | 6 | 0,35 A |
| Metiram | 4,57 | 6 | 0,35 A B |
| Clorotalonil | 5,59 | 5 | 0,38 B C |
| Mancozeb_Oxicloruro_de_Cu | 5,66 | 6 | 0,35 C |
| Mancozeb | 6,50 | 6 | 0,35 C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

| Concentración mg/Kg | Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|---------------------|-----------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| 1 | Diámetro colonia (cm) | 25 | 0,19 | 0,02 | 33,78 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------------------|-------|----|------|------|---------|
| Modelo. | 12,33 | 4 | 3,08 | 1,15 | 0,3613 |
| Ingrediente activo | 12,33 | 4 | 3,08 | 1,15 | 0,3613 |
| Error | 53,53 | 20 | 2,68 | | |
| Total | 65,87 | 24 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,17633

Error: 2,6767 gl: 20

| Ingrediente activo | Medias | n | E.E. |
|---------------------------|--------|---|--------|
| Propineb | 3,01 | 5 | 0,73 A |
| Clorotalonil | 3,75 | 5 | 0,73 A |
| Mancozeb_Oxicloruro_de_Cu | 4,40 | 5 | 0,73 A |
| Metiram | 4,70 | 4 | 0,82 A |
| Mancozeb | 5,60 | 6 | 0,67 A |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

| Concentración mg/Kg | Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|---------------------|-----------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| 10 | Diámetro colonia (cm) | 29 | 0,75 | 0,70 | 16,20 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------------------|-------|----|------|-------|---------|
| Modelo. | 38,41 | 4 | 9,60 | 17,53 | <0,0001 |
| Ingrediente activo | 38,41 | 4 | 9,60 | 17,53 | <0,0001 |
| Error | 13,14 | 24 | 0,55 | | |
| Total | 51,55 | 28 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,89922

Error: 0,5476 gl: 24

| Ingrediente activo | Medias | n | E.E. |
|--------------------|--------|---|--------|
| Propineb | 2,35 | 6 | 0,30 A |

| | | | | |
|---------------------------|------|---|------|-----|
| Clorotalonil | 2,93 | 6 | 0,30 | A |
| Metiram | 4,04 | 6 | 0,30 | B |
| Mancozeb | 4,91 | 5 | 0,33 | B C |
| Mancozeb Oxicloruro de Cu | 5,38 | 6 | 0,30 | C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

| Concentración mg/Kg | Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|---------------------|-----------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| 100 | Diámetro colonia (cm) | 30 | 0,86 | 0,83 | 18,29 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------------------|-------|----|-------|-------|---------|
| Modelo. | 43,89 | 4 | 10,97 | 37,68 | <0,0001 |
| Ingrediente activo | 43,89 | 4 | 10,97 | 37,68 | <0,0001 |
| Error | 7,28 | 25 | 0,29 | | |
| Total | 51,17 | 29 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,64165

Error: 0,2912 gl: 25

| Ingrediente activo | Medias | n | E.E. |
|---------------------------|--------|---|--------|
| Metiram | 0,33 | 6 | 0,22 A |
| Propineb | 1,80 | 6 | 0,22 B |
| Clorotalonil | 2,18 | 6 | 0,22 B |
| Mancozeb | 3,24 | 6 | 0,22 C |
| Mancozeb Oxicloruro de Cu | 3,81 | 6 | 0,22 C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

SISTÉMICOS

C:\Users\Marilyn\Dropbox\Cycas\RESULTADOS Toma de datos TESIS\Análisis Estadístico INFOSTAT\II C Datos sensibilidad promedio.IDB2 : 09/02/2015 - 07:55:22 a.m. - [Versión : 01/11/2014]

Análisis de la varianza

| Concentración mg/Kg | Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|---------------------|-----------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| 0 | Diámetro colonia (cm) | 28 | 0,09 | 0,00 | 22,75 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------------------|-------|----|------|------|---------|
| Modelo. | 4,00 | 4 | 1,00 | 0,57 | 0,6853 |
| Ingrediente activo | 4,00 | 4 | 1,00 | 0,57 | 0,6853 |
| Error | 40,22 | 23 | 1,75 | | |
| Total | 44,22 | 27 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,64124

Error: 1,7485 gl: 23

| Ingrediente activo | Medias | n | E.E. |
|--------------------|--------|---|--------|
| Azoxistrobin | 4,64 | 6 | 0,54 A |
| Prochloraz | 4,88 | 6 | 0,54 A |
| Boscalid | 5,12 | 5 | 0,59 A |
| Difenoconazole | 5,39 | 6 | 0,54 A |
| Pyrimethanil | 5,73 | 5 | 0,59 A |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

| Concentración mg/Kg | Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|---------------------|-----------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| 0,01 | Diámetro colonia (cm) | 27 | 0,15 | 0,00 | 19,55 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------------------|-------|----|------|------|---------|
| Modelo. | 4,20 | 4 | 1,05 | 0,99 | 0,4321 |
| Ingrediente activo | 4,20 | 4 | 1,05 | 0,99 | 0,4321 |
| Error | 23,25 | 22 | 1,06 | | |
| Total | 27,45 | 26 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,30268

Error: 1,0569 gl: 22

| Ingrediente activo | Medias | n | E.E. |
|--------------------|--------|---|--------|
| Prochloraz | 4,03 | 6 | 0,42 A |
| Pyrimethanil | 4,35 | 5 | 0,46 A |
| Difenoconazole | 4,69 | 6 | 0,42 A |
| Boscalid | 4,71 | 5 | 0,46 A |
| Azoxistrobin | 5,20 | 5 | 0,46 A |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

| Concentración mg/Kg | Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|---------------------|-----------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| 0,1 | Diámetro colonia (cm) | 30 | 0,60 | 0,53 | 32,15 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------------------|--------|----|-------|------|---------|
| Modelo. | 61,20 | 4 | 15,30 | 9,22 | 0,0001 |
| Ingrediente activo | 61,20 | 4 | 15,30 | 9,22 | 0,0001 |
| Error | 41,49 | 25 | 1,66 | | |
| Total | 102,69 | 29 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,53183

Error: 1,6596 gl: 25

| Ingrediente activo | Medias | n | E.E. |
|--------------------|--------|---|--------|
| Prochloraz | 1,01 | 6 | 0,53 A |
| Difenoconazole | 2,32 | 6 | 0,53 A |
| Pyrimethanil | 4,13 | 6 | 0,53 B |
| Azoxistrobin | 4,54 | 6 | 0,53 B |
| Boscalid | 4,63 | 6 | 0,53 B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

| Concentración mg/Kg | Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|---------------------|-----------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| 1 | Diámetro colonia (cm) | 28 | 0,50 | 0,41 | 37,64 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------------------|-------|----|------|------|---------|
| Modelo. | 39,60 | 4 | 9,90 | 5,73 | 0,0024 |
| Ingrediente activo | 39,60 | 4 | 9,90 | 5,73 | 0,0024 |
| Error | 39,72 | 23 | 1,73 | | |
| Total | 79,31 | 27 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,63100

Error: 1,7267 gl: 23

| Ingrediente activo | Medias | n | E.E. | | |
|--------------------|--------|---|------|---|-----|
| Prochloraz | 1,12 | 6 | 0,54 | A | |
| Difenoconazole | 1,97 | 6 | 0,54 | A | B |
| Azoxistrobin | 3,14 | 6 | 0,54 | | B C |
| Pyrimethanil | 4,09 | 5 | 0,59 | | C |
| Boscalid | 4,18 | 5 | 0,59 | | C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

| Concentración mg/Kg | Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|---------------------|-----------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| 10 | Diámetro colonia (cm) | 30 | 0,75 | 0,71 | 32,21 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------------------|-------|----|-------|-------|---------|
| Modelo. | 71,18 | 4 | 17,80 | 18,41 | <0,0001 |
| Ingrediente activo | 71,18 | 4 | 17,80 | 18,41 | <0,0001 |
| Error | 24,16 | 25 | 0,97 | | |
| Total | 95,35 | 29 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,16901

Error: 0,9665 gl: 25

| Ingrediente activo | Medias | n | E.E. | | |
|--------------------|--------|---|------|---|---|
| Prochloraz | 0,15 | 6 | 0,40 | A | |
| Difenoconazole | 0,96 | 6 | 0,40 | A | |
| Pyrimethanil | 3,06 | 6 | 0,40 | | B |
| Azoxistrobin | 3,65 | 6 | 0,40 | | B |
| Boscalid | 4,05 | 6 | 0,40 | | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

| Concentración mg/Kg | Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|---------------------|-----------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| 100 | Diámetro colonia (cm) | 30 | 0,90 | 0,88 | 24,29 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|--------------------|-------|----|------|-------|---------|
| Modelo. | 37,39 | 4 | 9,35 | 54,21 | <0,0001 |
| Ingrediente activo | 37,39 | 4 | 9,35 | 54,21 | <0,0001 |
| Error | 4,31 | 25 | 0,17 | | |
| Total | 41,70 | 29 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,49375

Error: 0,1724 gl: 25

| Ingrediente activo | Medias | n | E.E. | | |
|--------------------|--------|---|------|---|---|
| Pyrimethanil | 0,00 | 6 | 0,17 | A | |
| Prochloraz | 0,00 | 6 | 0,17 | A | |
| Difenoconazole | 0,46 | 6 | 0,17 | A | |
| Azoxistrobin | 1,95 | 6 | 0,17 | | B |
| Boscalid | 2,74 | 6 | 0,17 | | C |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

• **ANDEVA PARTICIONADO POR MUESTREO. ETAPA IIIB**

INDICE SEVERIDAD

Análisis de la varianza

Abril

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------|-----|----------------|-------------------|-------|
| Abril | 100 | 0,11 | 0,04 | 40,66 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|-------------|--------|----|------|------|---------|
| Modelo. | 18,49 | 7 | 2,64 | 1,66 | 0,1283 |
| Tatramiento | 5,05 | 3 | 1,68 | 1,06 | 0,3702 |
| Bloque | 13,44 | 4 | 3,36 | 2,11 | 0,0854 |
| Error | 146,30 | 92 | 1,59 | | |
| Total | 164,79 | 99 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,70838

Error: 1,5902 gl: 92

| Tatramiento | Medias | n | E.E. |
|------------------------------|--------|----|--------|
| Convencional | 2,75 | 25 | 0,25 A |
| NO Convencional | 3,07 | 25 | 0,25 A |
| NO Convencional + Ácido ac.. | 3,24 | 25 | 0,25 A |
| Convencional + Ácido acéti.. | 3,35 | 25 | 0,25 A |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Mayo

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------|-----|----------------|-------------------|-------|
| Mayo | 100 | 0,21 | 0,15 | 35,64 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|-------------|--------|----|------|------|---------|
| Modelo. | 39,69 | 7 | 5,67 | 3,54 | 0,0020 |
| Tatramiento | 10,03 | 3 | 3,34 | 2,09 | 0,1069 |
| Bloque | 29,65 | 4 | 7,41 | 4,63 | 0,0019 |
| Error | 147,21 | 92 | 1,60 | | |
| Total | 186,90 | 99 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,71059

Error: 1,6001 gl: 92

| Tatramiento | Medias | n | E.E. |
|------------------------------|--------|----|----------|
| NO Convencional + Ácido ac.. | 3,08 | 25 | 0,25 A |
| Convencional | 3,44 | 25 | 0,25 A B |
| NO Convencional | 3,82 | 25 | 0,25 B |
| Convencional + Ácido acéti.. | 3,86 | 25 | 0,25 B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Junio

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------|-----|----------------|-------------------|-------|
| Junio | 100 | 0,16 | 0,10 | 36,36 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|-------------|--------|----|------|------|---------|
| Modelo. | 32,32 | 7 | 4,62 | 2,50 | 0,0215 |
| Tatramiento | 6,13 | 3 | 2,04 | 1,10 | 0,3515 |
| Bloque | 26,20 | 4 | 6,55 | 3,54 | 0,0098 |
| Error | 170,17 | 92 | 1,85 | | |
| Total | 202,50 | 99 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,76400

Error: 1,8497 gl: 92

| Tatramiento | Medias | n | E.E. |
|------------------------------|--------|----|--------|
| Convencional | 3,53 | 25 | 0,27 A |
| NO Convencional + Ácido ac.. | 3,60 | 25 | 0,27 A |
| NO Convencional | 3,67 | 25 | 0,27 A |
| Convencional + Ácido acéti.. | 4,16 | 25 | 0,27 A |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Julio

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------|-----|----------------|-------------------|-------|
| Julio | 100 | 0,07 | 0,00 | 49,63 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|-------------|--------|----|------|------|---------|
| Modelo. | 16,87 | 7 | 2,41 | 0,98 | 0,4541 |
| Tatramiento | 6,22 | 3 | 2,07 | 0,84 | 0,4758 |
| Bloque | 10,65 | 4 | 2,66 | 1,08 | 0,3724 |
| Error | 227,40 | 92 | 2,47 | | |
| Total | 244,28 | 99 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,88317

Error: 2,4717 gl: 92

| Tatramiento | Medias | n | E.E. |
|------------------------------|--------|----|--------|
| Convencional | 2,76 | 25 | 0,31 A |
| Convencional + Ácido acéti.. | 3,21 | 25 | 0,31 A |
| NO Convencional | 3,26 | 25 | 0,31 A |
| NO Convencional + Ácido ac.. | 3,44 | 25 | 0,31 A |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Agosto

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------|-----|----------------|-------------------|-------|
| Agosto | 100 | 0,23 | 0,17 | 41,17 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|-------------|--------|----|------|------|---------|
| Modelo. | 32,45 | 7 | 4,64 | 3,85 | 0,0010 |
| Tatramiento | 29,56 | 3 | 9,85 | 8,17 | 0,0001 |
| Bloque | 2,90 | 4 | 0,72 | 0,60 | 0,6633 |
| Error | 110,91 | 92 | 1,21 | | |

Total 143,37 99

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,61679

Error: 1,2056 gl: 92

| Tatramiento | Medias | n | E.E. | |
|------------------------------|--------|----|------|---|
| Convencional | 1,80 | 25 | 0,22 | A |
| Convencional + Ácido acéti.. | 2,66 | 25 | 0,22 | B |
| NO Convencional + Ácido ac.. | 2,97 | 25 | 0,22 | B |
| NO Convencional | 3,25 | 25 | 0,22 | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Septiembre

Variable N R² R² Aj CV
Septiembre 100 0,26 0,20 37,77

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|-------------|--------|----|------|------|---------|
| Modelo. | 36,53 | 7 | 5,22 | 4,63 | 0,0002 |
| Tatramiento | 21,77 | 3 | 7,26 | 6,44 | 0,0005 |
| Bloque | 14,76 | 4 | 3,69 | 3,28 | 0,0147 |
| Error | 103,63 | 92 | 1,13 | | |
| Total | 140,16 | 99 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,59619

Error: 1,1264 gl: 92

| Tatramiento | Medias | n | E.E. | |
|------------------------------|--------|----|------|---|
| Convencional | 2,09 | 25 | 0,21 | A |
| Convencional + Ácido acéti.. | 2,71 | 25 | 0,21 | B |
| NO Convencional | 3,19 | 25 | 0,21 | B |
| NO Convencional + Ácido ac.. | 3,25 | 25 | 0,21 | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

• ANDEVA PARTICIONADO POR MUESTREO ETAPA IIIC

IIIC INDICE SEVERIDAD

Análisis de la varianza

Abril

Variable N R² R² Aj CV
Abril 100 0,06 0,00 31,65

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|-------------|--------|----|------|------|---------|
| Modelo. | 11,51 | 7 | 1,64 | 0,88 | 0,5272 |
| Bloque | 10,74 | 4 | 2,68 | 1,43 | 0,2293 |
| Tratamiento | 0,77 | 3 | 0,26 | 0,14 | 0,9374 |
| Error | 172,29 | 92 | 1,87 | | |

Total 183,80 99

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,76875

Error: 1,8728 gl: 92

| Tratamiento | Medias | n | E.E. |
|---------------|--------|----|--------|
| Silicato de K | 4,25 | 25 | 0,27 A |
| Testigo | 4,26 | 25 | 0,27 A |
| Nitrato de Ca | 4,33 | 25 | 0,27 A |
| Sulfato de Mg | 4,47 | 25 | 0,27 A |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Mayo

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------|-----|----------------|-------------------|-------|
| Mayo | 100 | 0,07 | 0,00 | 49,53 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|-------------|--------|----|------|------|---------|
| Modelo. | 40,87 | 7 | 5,84 | 0,97 | 0,4555 |
| Bloque | 38,83 | 4 | 9,71 | 1,62 | 0,1763 |
| Tratamiento | 2,04 | 3 | 0,68 | 0,11 | 0,9522 |
| Error | 551,88 | 92 | 6,00 | | |
| Total | 592,75 | 99 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,37585

Error: 5,9986 gl: 92

| Tratamiento | Medias | n | E.E. |
|---------------|--------|----|--------|
| Silicato de K | 4,78 | 25 | 0,49 A |
| Sulfato de Mg | 4,89 | 25 | 0,49 A |
| Testigo | 4,93 | 25 | 0,49 A |
| Nitrato de Ca | 5,17 | 25 | 0,49 A |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Junio

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------|-----|----------------|-------------------|-------|
| Junio | 100 | 0,09 | 0,02 | 81,01 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|-------------|---------|----|-------|------|---------|
| Modelo. | 238,70 | 7 | 34,10 | 1,25 | 0,2849 |
| Bloque | 216,19 | 4 | 54,05 | 1,98 | 0,1043 |
| Tratamiento | 22,51 | 3 | 7,50 | 0,27 | 0,8435 |
| Error | 2512,90 | 92 | 27,31 | | |
| Total | 2751,60 | 99 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,93587

Error: 27,3141 gl: 92

| Tratamiento | Medias | n | E.E. |
|---------------|--------|----|--------|
| Sulfato de Mg | 5,93 | 25 | 1,05 A |
| Silicato de K | 6,04 | 25 | 1,05 A |
| Testigo | 6,84 | 25 | 1,05 A |
| Nitrato de Ca | 7,00 | 25 | 1,05 A |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Julio

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------|-----|----------------|-------------------|--------|
| Julio | 100 | 0,09 | 0,02 | 122,68 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|-------------|---------|----|--------|------|---------|
| Modelo. | 934,12 | 7 | 133,45 | 1,36 | 0,2333 |
| Bloque | 805,55 | 4 | 201,39 | 2,05 | 0,0942 |
| Tratamiento | 128,57 | 3 | 42,86 | 0,44 | 0,7280 |
| Error | 9050,48 | 92 | 98,37 | | |
| Total | 9984,61 | 99 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=5,57167

Error: 98,3748 gl: 92

| Tratamiento | Medias | n | E.E. |
|---------------|--------|----|--------|
| Sulfato de Mg | 6,73 | 25 | 1,98 A |
| Silicato de K | 7,24 | 25 | 1,98 A |
| Nitrato de Ca | 8,90 | 25 | 1,98 A |
| Testigo | 9,47 | 25 | 1,98 A |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Agosto

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|----------|-----|----------------|-------------------|--------|
| Agosto | 100 | 0,09 | 0,03 | 179,78 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V. | SC | gl | CM | F | p-valor |
|-------------|----------|----|--------|------|---------|
| Modelo. | 3529,02 | 7 | 504,15 | 1,37 | 0,2295 |
| Bloque | 2881,75 | 4 | 720,44 | 1,95 | 0,1087 |
| Tratamiento | 647,27 | 3 | 215,76 | 0,58 | 0,6269 |
| Error | 33977,16 | 92 | 369,32 | | |
| Total | 37506,17 | 99 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=10,79550

Error: 369,3169 gl: 92

| Tratamiento | Medias | n | E.E. |
|---------------|--------|----|--------|
| Sulfato de Mg | 7,76 | 25 | 3,84 A |
| Silicato de K | 9,02 | 25 | 3,84 A |
| Nitrato de Ca | 11,60 | 25 | 3,84 A |
| Testigo | 14,39 | 25 | 3,84 A |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Septiembre

| Variable | N | R ² | R ² Aj | CV |
|------------|-----|----------------|-------------------|--------|
| Septiembre | 100 | 0,09 | 0,02 | 233,63 |

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| <u>F.V.</u> | <u>SC</u> | <u>gl</u> | <u>CM</u> | <u>F</u> | <u>p-valor</u> |
|-------------|-----------|-----------|-----------|----------|----------------|
| Modelo. | 6725,46 | 7 | 960,78 | 1,34 | 0,2399 |
| Bloque | 5265,35 | 4 | 1316,34 | 1,84 | 0,1282 |
| Tratamiento | 1460,12 | 3 | 486,71 | 0,68 | 0,5667 |
| Error | 65883,85 | 92 | 716,13 | | |
| Total | 72609,32 | 99 | | | |

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=15,03275

Error: 716,1288 gl: 92

| <u>Tratamiento</u> | <u>Medias</u> | <u>n</u> | <u>E.E.</u> |
|--------------------|---------------|----------|-------------|
| Sulfato de Mg | 7,26 | 25 | 5,35 A |
| Silicato de K | 9,14 | 25 | 5,35 A |
| Nitrato de Ca | 12,03 | 25 | 5,35 A |
| Testigo | 17,38 | 25 | 5,35 A |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Anexo 11. Cálculo de la concentración efectiva del ingredient active del fungicida evaluado a nivel *in vitro*.

| Dosis | In dosis | Clorotalonil | Mancozeb | Mancozeb + Oxicloruro de Cu | | Metiram | Propineb | Pyrimethanil | Prochloraz | Difenoconazole | Azoxistrobin | Boscalid |
|----------------------------|-------------|--------------|----------|--------------------------------------|----------|----------|----------|--------------|------------|----------------|--------------|----------|
| | | | | | | | | | | | | |
| % de inhibición | | | | | | | | | | | | |
| 0,01 | -4,60517019 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 17,28 | 25,26 | 21,10 | 39,45 | 19,38 | 0,00 | 5,84 | |
| 0,1 | -2,30258509 | 0,00 | 0,00 | 0,00 | 14,08 | 41,43 | 27,90 | 77,14 | 58,67 | 2,26 | 12,81 | |
| 1 | 0 | 20,73 | 3,91 | 12,26 | 11,74 | 53,76 | 25,11 | 75,49 | 57,71 | 32,40 | 15,82 | |
| 10 | 2,30258509 | 38,64 | 7,04 | 0,00 | 21,50 | 64,66 | 46,73 | 96,70 | 79,55 | 21,31 | 23,82 | |
| 100 | 4,60517019 | 54,45 | 36,66 | 28,11 | 93,80 | 73,01 | 100,00 | 100,00 | 90,26 | 58,02 | 48,40 | |
| Intersección (b) | | 22,76440 | 9,52102 | 8,07547 | 31,68075 | 51,62406 | 44,16739 | 77,75824 | 61,11349 | 22,79871 | 21,33710 | |
| Pendiente (m) | | 6,40755 | 3,48964 | 2,44188 | 6,96910 | 5,15602 | 7,67115 | 6,10876 | 7,06310 | 5,86695 | 4,17528 | |
| x=50 (ln EC50) | | 4,25055 | 11,59976 | 17,16894 | 2,62864 | -0,31498 | 0,76033 | -4,54401 | -1,57346 | 4,63636 | 6,86491 | |
| Coef. R² | | 0,94785 | 0,67585 | 0,51430 | 0,52793 | 0,98522 | 0,72830 | 0,85039 | 0,89704 | 0,80166 | 0,85424 | |
| EC50 | | 70,1439 | 109071 | 2860064 | 13,8549 | 0,72980 | 2,13898 | 0,01063 | 0,20732 | 103,1681 | 958,0596 | |

- **Anexo 12.** Manual informativo sobre *Cycas revoluta*.

Cycas revoluta Thunb.

Generalidades
Manejo del cultivo
y Enfermedades



Marilyn Sánchez Valverde

***Cycas revoluta* Thunb.**

Generalidades
Manejo del cultivo
y Enfermedades

Marilyn Sánchez Valverde

2015

Presentación

En países como Japón, Nueva Zelanda, Australia y Estados Unidos, la investigación enfocada a especies pertenecientes al orden Cycadales es de suma importancia. Existen organizaciones científicas dedicadas al estudio y conservación de especies de cycas que se encuentran dentro de la lista roja de especies amenazadas y en peligro de extinción según la UICN. *Cycas revoluta* es una especie tropical de las menos protegidas, pero de igual manera se encuentra dentro de la lista roja, por lo que se busca una explotación responsable de este cultivo hortícola.

En cuanto a los permisos de explotación para el comercio de esta especie, es importante mencionar que se encuentran regulados por la convención CITES (Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres); además en el 2010 durante dicha convención se indicó que *C. revoluta* es la planta que tiene un ingreso por venta considerablemente mayor al de las demás especies exportadas que se encuentran amenazadas.

En Costa Rica existen pocos estudios relacionados a *C. revoluta* y al manejo agronómico del cultivo en general, sin embargo para el 2007, contaba con más de 114 hectáreas dedicadas al cultivo solamente en la Zona Norte, pero muchos productores han ido dejando la actividad por falta de conocimiento sobre el cultivo para el manejo de plagas; por ello es importante conocer acerca de las prácticas de manejo más comunes que se deben realizar para la producción de dicha especie.

En muchas donde se cultivan cicas en Costa Rica, se han observado síntomas de necrosis y clorosis en el tejido foliar, esto retarda el llenado del bulbo, alarga el ciclo de producción, aumenta el tiempo de permanencia de la planta en el campo y puede provocar la muerte de esta, dejando pérdidas económicas importantes al productor; este problema no ha sido metódicamente estudiado, además no se ha logrado encontrar alguna respuesta relacionada a los posibles agentes causales.

El siguiente manual informativo pretende dar a conocer al lector información útil acerca del cultivo de *C. revoluta* como especie ornamental de explotación hortícola. Además de indicar las principales prácticas agronómicas utilizadas para el control de enfermedades provocadas por hongos que dañan el área foliar, a partir de resultados de investigación y visitas a las principales plantaciones en Costa Rica. También se tratarán aspectos referentes a reproducción y ritmo de emisión foliar; así como algunos pasajes de historia y principales usos de la planta.

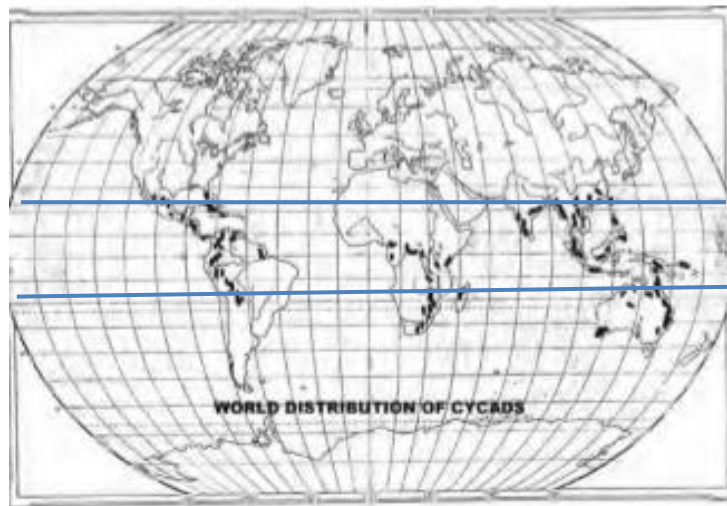
Índice

| | |
|--|-----------|
| 1. Generalidades..... | 1 |
| 1.1 Descripción botánica de <i>Cycas revoluta</i> | 1 |
| 1.2 Usos e importancia | 5 |
| 2. Prácticas de Manejo agronómico del cultivo | 7 |
| 2.1 Importación de semilla | 7 |
| 2.2 Pruebas de viabilidad de la semilla..... | 7 |
| 2.3 Semillero | 7 |
| 2.4 Riego..... | 8 |
| 2.5 Principales problemas en etapa de semillero..... | 9 |
| 2.6 Trasplante a campo | 10 |
| 2.7 Densidad de siembra | 10 |
| 2.8 Fertilización..... | 10 |
| 2.9 Cosecha..... | 11 |
| 2.10 REPRODUCCIÓN..... | 12 |
| 2.10.1 Reproducción asexual | 12 |
| 2.10.2 Reproducción sexual | 13 |
| 3. Principales plagas | 15 |
| 3.1 Cycad Aulacaspis Scale (CAS)..... | 15 |
| 3.2 Virus CSNV (Cycad Necrotic Stunt Virus)..... | 16 |
| 3.3 Deficiencia de elementos como Mn y relación Fe:Mn..... | 17 |
| 3.4 Necrosis foliar o chasparria..... | 18 |
| 3.4.1 Desarrollo de la enfermedad | 23 |

| | |
|--|-----------|
| 4. Estrategias para el manejo de la chasparria..... | 24 |
| Fertilización..... | 26 |
| Poda sanitaria..... | 29 |
| Ácido acético..... | 30 |
| Fungicidas..... | 32 |
| 5. Galería..... | 35 |
| 6. Las cicas en el mundo..... | 36 |
| Montgomery Botanical Center (MBC)..... | 36 |
| The Cycad Society (TCS)..... | 36 |
| Cycad Specialist Group (UICN)..... | 37 |
| Convención CITES..... | 37 |
| 7. Bibliografía..... | 38 |

1. Generalidades

Las especies del orden de las Cycadales se encuentran en el grupo de plantas vasculares más antiguas (hace 300 millones de años), son llamadas “fósiles vivientes” (Pérez y Vovides 1997), se encuentran principalmente en los trópicos y subtropicos, en América, África, Asia y Australia (Figura 1). Actualmente este orden está conformado por tres familias: Cycadaceae (*Cycas sp.*), Stangeriaceae y Zamiaceae (Stevenson 2001). En la familia Cycadaceae se encuentra el género *Cycas* que comprende 98 especies distintas (Janick y Paull 2008). La especie *C. revoluta* es originaria de una isla en el sur de Japón llamada Ryukyu, se reportó en 1782 según Osborne *et al.* (2012) en el libro llamado “The world list of Cycads”.



Fuente: Taylor *et al* 2012

Figura 34. Distribución mundial de cicas.

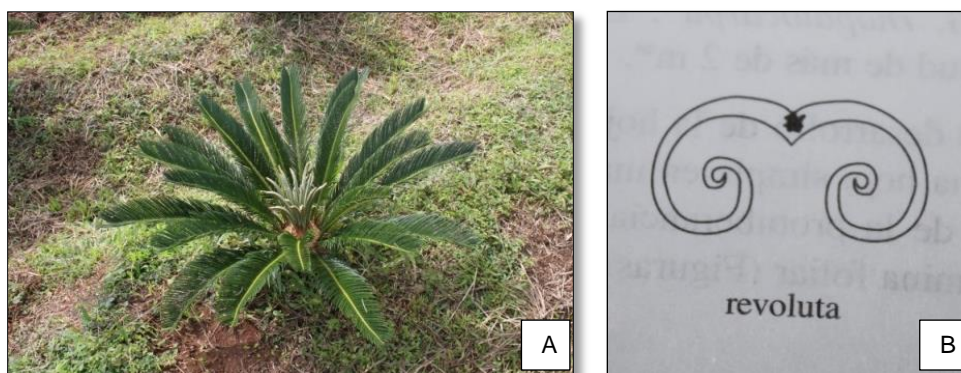
1.1 Descripción botánica de *Cycas revoluta*

Son plantas dioicas, con tallos subterráneos arborescentes generalmente cubiertos por la base de las hojas, las cuales son pinnaticompuestas - imparipinnadas, característica que distingue a las cicas del resto de las gimnospermas (Flores 1999). Dicha planta se caracteriza por un lento crecimiento, es considerada una especie perenne, las hojas se agrupan a manera de roseta en los extremos del tallo, opuestas o subopuestas, tienden a ser pubescentes cuando son jóvenes y glabras al madurar (Stevenson 2001). Al ser una planta



arborescente, es muy común que se les confunda con palmas, sin embargo, carecen de relación entre sí, debido a que las palmas pertenecen a otro grupo de plantas como las angiospermas (Pérez y Vovides 1997). Posee hojas color verde oscuro brillante y se disponen a manera de corona, con una longitud de 50 cm hasta dos metros de longitud, presenta una *vernación revoluta* que se les llama a los márgenes foliares curvados abaxialmente (Flores 1999) (Figura 2).

La cica es una planta simétrica, que soporta una corona de hojas sobre un tronco grueso, normalmente de 20 cm de diámetro en la madurez, algunas veces más amplio, que puede crecer entre seis y siete metros de altura en especímenes muy viejos; sin embargo, esta planta tiene un crecimiento muy lento, por lo que se requieren entre 50 a 100 años para alcanzar dicha altura (MobileReference 2009).



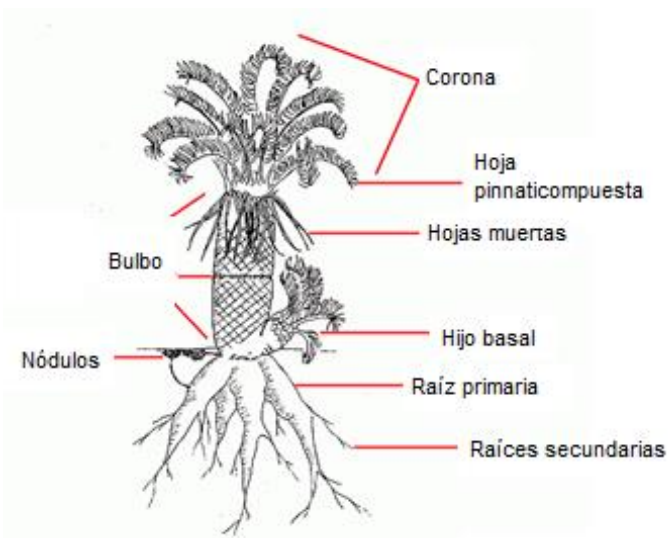
Fuente: Sánchez 2013

Fuente: Flores 1999

Figura 35. (A). Planta de *Cycas revoluta* hojas se disponen en forma de corona, imparipinnada, (B). Ilustración de la forma del margen revoluta de las hojas cuando inician el crecimiento.

Las raíces de las cicas (Figura 3) presentan asociación simbiótica con bacterias fijadoras de nitrógeno como *Anabaena cycadae* (Banerjee *et al.* 2005) y *Nostoc* (Seckbach 2002; Vessey *et al.* 2004; Rinaldi *et al.* 2005; Vessey *et al.* 2004; Marler *et al.* 2005).





Fuente: Bergman y Bergman 2013.















Fuente: Sánchez 2014

Figura 36. Anatomía de *C. revoluta* y sistema radical de planta joven de *Cycas revoluta*.

En la Figura 4, se presenta una escala de emisión foliar diseñada por Sánchez 2015, con el fin de entender con facilidad las fases identificadas como V1 (Infantil), V2 (Formación), V3 (Juvenil) y V4 (Madurez), estas fueron subdivididas en A, B, C; se indican los días después de emergido el brote de hojas y una breve descripción de cada fase; es importante tener claro que no siempre es válido hablar sobre el número de días de emergida, debido a que algunas veces el brote de hojas se puede atrasar o adelantar en la fase, además que es difícil llevar el conteo de los días de emergido el brote de cada planta en campo, por ello se planteó que las fases debían ser determinadas más bien por el aspecto visual, para que funcione como una base para que cualquier persona pueda identificar la fase de desarrollo en la que se encuentra la última corona de hojas de una planta de *C. revoluta*; además permite estandarizar criterios para tener un punto de referencia cuando se está hablando de periodos de susceptibilidad a las plagas, aplicaciones de agroquímicos o etapas críticas.

Existe desconocimiento acerca del ritmo de emisión foliar de dicha planta, el cual es un parámetro de importancia para el manejo agronómico de cualquier especie productiva.



| Ritmo de emisión foliar de <i>Cycas revoluta</i> en condiciones de invernadero | | | Etapa (Fase desarrollo) | Nombre | Descripción |
|---|---|---|-------------------------|----------|---|
|  |  |  | V1 (A,B,C) | Infantil | Corresponde al crecimiento y división celular acelerada que se da durante el día de emergencia y transcurridos 4 días después de emergencia (4 DDE) aproximadamente. Las hojas aún no se han desarrollado y conservan margen revoluta. Esta etapa, se subdivide en tres fases que son: A: En donde solamente se observa una estructura formada por el raquis de la hoja, están los folíolos en formación; puede medir entre 3 - 5 cm de alto y 0,5-1 cm de ancho, dependiendo de tamaño final de la hoja y generalmente se encuentra cerrado durante esta fase. B: Se da 2 DDE aproximadamente. La estructura formada por el raquis adquiere mayor altura pero aún no se ha dado la apertura de los folíolos. C: En algunos casos puede verse la apertura transcurridos 4 DDE aproximadamente, pero dependiendo del tamaño final de la hoja. En esta fase el raquis puede seguir adquiriendo altura. |
| A 0 DDE | B 2 DDE | C 4 DDE | | | |
|  |  |  | | | |
| A 6 DDE | B 8 DDE | C 10 DDE | | | |
|  |  |  | V3 (A,B,C) | Juvenil | Esta etapa se centra en el endurecimiento de las hojas, puede encontrarse entre los 12 y 16 DDE aproximadamente. Está compuesta por tres fases: A. Pueden existir folíolos finalizando la etapa de formación, se da el inicio del endurecimiento de los folíolos de la hoja que antes eran blandos y susceptibles a daños físicos. B. La hoja va adquiriendo la dureza necesaria para la formación de espinas en la punta de los folíolos. C. Los folíolos adquieren una dureza aceptable para que inicie el cambio en la coloración. |
| A 12 DDE | B 14 DDE | C 16 DDE | | | |
|  |  |  | | | |
| A 18 DDE | B 20 DDE | C 22 DDE | | | |

M Sánchez, 2014

Fuente: Sánchez 2015.

Figura 37. Escala fotográfica del ritmo de emisión foliar en *C. revoluta* en condiciones de invernadero.



1.2 Usos e importancia

Algunas especies de cicas están disponibles para la venta, tales como *Zamia*, *C. revoluta*, *Encephalartos*, *Dioon* entre otras, a un alto precio, comparado con las plantas ornamentales en general. Debido a que tienen restricciones para extraerlas de bosques; a menudo se observan en jardines exteriores, pero su explotación no se da al máximo, por ello es necesaria la tecnificación del cultivo de cicas (Burch 1981).

Además de ser una planta explotada comercialmente, en algunos lugares del mundo como en las montañas de Panamá, la parte interna del tallo es utilizado como alimento y en otros lugares como en la India, Sri Lanka, China, es industrializada para la extracción de "Sagú" o "Sago" (sustancia almidonosa para espesar salsas con alto contenido de carbohidratos), de ahí es donde proviene el nombre por el cual se le conoce: "King Sago Palm" o "sotetsu" en Japón (Laqueur y Spatz 1968); Janick y Paull (2008), reportan que las nueces o semillas de las cicas, son utilizadas como alimento en Sri Lanka, India y buena parte de Indonesia, contiene 12%-14% de proteína cruda y 66%-70% de almidón (Burkill 1933; Nishida 1936; Peckolt 1887; Sastri 1950; Yoshimura 1919 citados por Thieret 1958). El análisis de aire y materia seca del tallo en *C. revoluta* indicó que existe un 44,5% de almidón y 19,5% de proteína cruda, esto puede ser afectado con la temporada (verano-invierno) y según sean las plantas macho o hembra debido a la producción de semillas (Yoshimura y Sagava 1918; Nakamura y Nakajima 1943, citados por Thieret 1958). En la isla Ryukyu ha sido una planta de importancia alimenticia, es ofrecido en los menú de restaurantes en un lugar llamado Amami Oshima, al que le llaman también "The Cycad Hell", sin embargo los habitantes no mencionan a otras personas que en este lugar se practica el consumo de *C. revoluta* y tampoco admiten tener semillas en su posesión (Haring 1952, citado por Thieret 1958). La planta contiene una sustancia tóxica llamada cicasina (Nishida *et al.* 1956; Marler *et al.* 2005; Kyoda y Setoguchi 2010; Yamada *et al.* 2012) y hay diversos estudios que afirman que la toxina es letal tanto para animales como para humanos (Laqueur y Spatz 1968; Marler *et al.* 2005). También existe una bebida a base de semillas de



cicas al cual le llaman *doku sake* o *batido venenoso*, debido a que los que la beben pueden volverse violentos e incluso morir (Harring 1954, citado por Thieret 1958).

Se ha mencionado el uso de las hojas jóvenes de *C. revoluta* como alimento en Japón, pero no detallan cómo es el consumo debido a que existe cierta toxicidad (Kinch 1883, citado por Thieret 1958), por ejemplo el consumo de brotes jóvenes de *C. rumphii* es causante de reumatismo en hombres (Oches 1931, citado por Thieret 1958). Durante la segunda guerra mundial, en tiempos de la esclavitud y escasez de alimento, el consumo de subproductos de las cicas tuvo una importancia relevante debido al contenido nutricional que posee (Haring 1952, citado por Thieret 1958). También el extracto de sagú es utilizado para la fabricación de bebidas alcohólicas especialmente cerveza y para la fabricación de gomas, la cual se obtiene de exudados del órgano reproductor femenino, en el cual sostienen las semillas (Balfour 1875; Lindley 1838; Schwendener 1890; Roxburgh 1958, citados por Thieret 1958). La extracción de aceite de las semillas de *C. revoluta* se utilizó durante la crisis de la segunda guerra mundial en un lugar llamado Okinawa en Japón (Thieret 1958).

Se considera una planta ornamental utilizada para decoración de jardines a nivel mundial y en funerales o ceremonias en Japón (Whitelock 2002). Es producida en escala masiva para la comercialización, cultivada en grandes extensiones de terreno en lugares como China, La India y Sri Lanka; es considerada la especie de cicas más popular en la industria hortícola internacional (Marler *et al.* 2005), se ha reportado también que es comercializada como bonsái (Marler y Moore 2010) y se dice que los consumidores la prefieren debido a que son de lento crecimiento cuando son restringidas a una maceta; a pesar de la explotación comercial que tiene dicha especie, existe falta de conocimiento y estudios agronómicos y tiempo que tarda la planta en desarrollarse y el ritmo de emisión foliar.



2. Prácticas de Manejo agronómico del cultivo

En cuanto al manejo agronómico de *C. revoluta* existe poca información acerca del tema, por ello, además de artículos científicos se ha recurrido a fuentes de información del tipo comunicaciones personales con expertos en el cultivo¹.

2.1 Importación de semilla

Las semillas son provenientes de Japón, debido que, a nivel mundial es el principal exportador de semillas de *C. revoluta* (90%) y de plantas (65%) (IUCN/SSC 2003); se importan en mallas de 1400 – 1600 semillas. Al dedicarse al cultivo de *C. revoluta*, es necesaria la compra de la semilla importada, debido a que no existe producción para venta de semilla sexual en Costa Rica. Sabiendo esto, se debe destacar que el costo de la semilla es individual y por ende la pérdida de cada planta en campo debido a distintas patologías, significa un aumento considerable en costo de producción.

2.2 Pruebas de viabilidad de la semilla

Las semillas antes de ser sembradas en las camas, son sumergidas en agua para desechar las que flotan, lo que quiere decir que no tienen embrión desarrollado, es una práctica común utilizada por productores; las demás son tratadas con productos de acción nematicida que protegen la semilla durante la etapa de germinación.

2.3 Semillero

Se preparan camas de aserrín humedecido constantemente (Figura 5) y las mallas que contienen las semillas se distribuyen de manera uniforme en camas a la intemperie con riego por aspersión y fertilización foliar para desarrollar la etapa de semillero, que tiene una duración aproximada de seis meses a un año dependiendo del manejo agronómico que el productor realice.



Una de las dificultades del sustrato es la compactación del aserrín, la cual se debe al peso de la gota de agua al caer sobre este, esto hace que semillas que han germinado no puedan emerger a la superficie y tengan dificultad para desarrollarse y traspasar el sustrato para salir a la superficie a captar luz. Desde la siembra hasta que empiecen a brotar las plantas, transcurridos 2,5 meses aproximadamente.

Es particular que las plántulas de la misma edad, que se encuentran en semilleros, presenten diferencias de crecimiento y vigor entre ellas; esto puede deberse a factores como el tiempo de reposo que debe pasar la semilla antes de que sea sembrada, para que se dé el almacenamiento de sustancias dentro de la semilla, las cuales van a nutrir al embrión; a esto se le conoce como letargo por embrión no desarrollado (Perez y Vovides 1997).

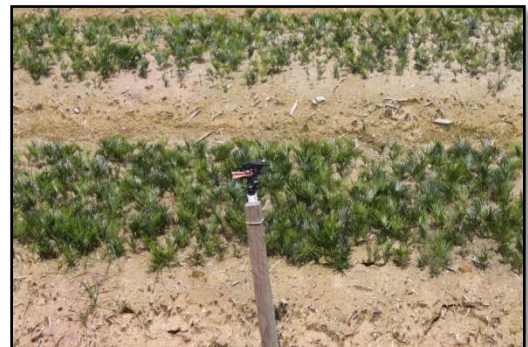


Fuente: Sánchez 2014

Figura 38. (A). Etapa de plántula de *C. revoluta*, periodo de emergencia 3 meses aproximadamente. (B). Etapa de semillero de *C. revoluta*, fueron sembradas el 23 mayo del 2013. (C) Distribución de las semillas en camas de germinación.

2.4 Riego

La planta *C. revoluta* presenta una alta exigencia de riego (Figura 6) en etapa de semillero debido a que la semilla necesita humedad para desencadenar los procesos de germinación. Así mismo cuando se va plantar un bulbo, es necesario que se coloque en un medio húmedo para que comience a brotar. Una vez



Fuente: Sánchez 2013

Figura 39. Riego por aspersion en semillero de *Cycas revoluta*



que las plantas son trasplantadas al campo, se pueden desarrollar normalmente con el agua disponible de la lluvia.

Se han realizado algunos estudios en China, donde se controla la intensidad del riego en *C. revoluta* en pote, para regular el tamaño de la planta y obtener curvaturas en las hojas que las hacen ser más llamativas y aumentar el precio para el consumidor (Dong *et al.* 1999).

2.5 Principales problemas en etapa de semillero

Entre los principales problemas que se pueden encontrar en las camas de germinación está un padecimiento conocido como mal de talluelo (Figura 7), se presenta una lesión en la parte central del tallo, impidiendo la translocación de nutrientes de la raíz hacia la parte aérea y viceversa.



Fuente: Sánchez 2014

Figura 40. Mal del talluelo, se refiere al estrangulamiento del tallo de plántulas de *C. revoluta* en semillero.

También se encontraron síntomas de chasparria, afectando las puntas de los folíolos, como se observa en la Figura 8. La enfermedad se propaga rápidamente debido a la densidad de siembra de las camas de germinación, permite la diseminación de esporas de hongos.





Fuente: Sánchez 2014

Figura 41. Principales síntomas de chasparria encontrados en las hojas de plántulas en semillero de *C. revoluta*.

2.6 Trasplante a campo

El trasplante es programado transcurridos desde seis a doce meses después de la siembra en dependencia del manejo del cultivo; se realiza a raíz desnuda, con el cascarón de la semilla adherido, también es posible removerlo. Es necesario que desde el semillero la planta se encuentre sana, sin presencia de enfermedades, debido a que si es trasplantada enferma, es posible que muera, retarde el crecimiento o que sea una fuente de inóculo para la diseminación de alguna enfermedad, como en el caso de la chasparria (Guzmán 2012).

2.7 Densidad de siembra

Las plantas de *C. revoluta* se siembran en camas o lomillos de 0,50 m de ancho, en donde se distribuyen las plantas por medio del método de siembra tres bolillo con doble hilera a 0,25 m entre plantas y un metro de distancia entre lomillos, para un total de 60 mil plantas por hectárea aproximadamente.



Fuente: Sánchez 2014

Figura 42. Método de siembra de *C.*

2.8 Fertilización

A menudo se utiliza la misma fertilización aplicada en palmas, (Dehgan (1983) y Pérez y Vovides (1997), recomiendan utilizar fertilizantes de lenta liberación en cultivos de ciclo largo. Broome (1997), sugiere la fórmula 18-6-8 con elementos



menores, de liberación continua, durante las primeras etapas de crecimiento, de manera que una vez que las plantas pasen a crecimiento episódico por medio de coronas de hojas, se recomiendan aplicaciones trimestrales de 24-7-8 más elementos menores, coincidiendo con los momentos de emisión de hojas. Sin embargo, la fertilización puede variar mucho según el manejo; cada productor define la fórmula que va a utilizar y el momento de aplicación. Se carece de estudios que propongan una fertilización ideal para el cultivo de *C. revoluta*. Productores mencionan que fórmulas altas en nitrógeno no son necesarias debido a que el sistema radical de la planta realiza fijación de N por bacterias, de modo que lo que necesita es Mg. En la práctica se han realizado aplicaciones de magnesio tanto foliares como al suelo y ha obtenido excelentes resultados en la planta, coloración de las hojas e incluso mayor vigorosidad. Joiner (1981) indica que se puede utilizar fórmulas completas en relación 3:2:1 (N:P₂O₅:K₂O) y que se debe complementar con aplicaciones foliares para mejorar el aspecto del follaje.

2.9 Cosecha

Es importante recalcar que se debe promocionar y diversificar el mercado con innovaciones como el cultivo de cicas en maceta, plantas decorativas tipo bonsái, cicas bajo invernadero o venta de follaje y venderlo para arreglos florales.

De estos mercados dependerá el tipo de cosecha que se realice. Si la cosecha es de hojas, se conserva la planta madre y solamente se le extraen las hojas; esta actividad se considera poco rentable, a menos que la extracción de hojas se realice como un subproducto, en donde se aprovechen las hojas que son cortadas al cosechar el bulbo. Productores de follaje se vieron en problemas debido a que en el 2005 hubo un brote de escama (*Aulacaspis yasumatsui*) la que acabó con plantaciones importantes de productores de hojas de cicas.

Si el mercado abastecido es el de cicas en pote, las plantas de igual manera se trasplantan a campo y se desarrollan allí hasta alcanzar el tamaño deseado para desarrollarlas en pote. Para este tipo de actividad es necesario que se cuente con infraestructura para ambiente protegido, en donde las plantas estén protegidas de



condiciones de alta humedad y precipitaciones, debido a que estas condiciones las hacen susceptibles a la chasparria o ser atacadas por escamas.

Cuando se cosecha el bulbo (principal actividad de la mayoría de productores), la planta debe tener una edad aproximada de dos a tres años y un diámetro del bulbo entre tres a seis pulgadas dependiendo del mercado de exportación. La cosecha se realiza graneada, midiendo el diámetro en campo y extrayendo únicamente las plantas que cumplen con el tamaño deseado.

En el campo, el personal extrae el bulbo que se encuentra sembrado en el lomillo, corta todas las hojas y elimina raíces que se encuentren fuera de sitio, luego es llevado a la planta de proceso en donde se lava en una pila (similar a la utilizada para lavar raíces y tubérculos) con un cepillo y abundante agua para remover residuos de suelo (Figura 10). Seguidamente se sumergen los bulbos en una solución con insecticida para eliminar escamas (*Aulacaspis yasumatsui*) y fungicida, las cuales se esconden debajo de la inserción de la hoja en el tallo y son una amenaza para la planta.



Fuente: Sánchez 2014.

Figura 43. Almacenamiento de bulbos para exportación de *C. revoluta*. Bulbos provenientes del campo, con restos de suelo, lavados con agua y sumergidos en un insecticida (Terbufos®) para eliminar restos de *A. yasumatsui*.

2.10 REPRODUCCIÓN

2.10.1 Reproducción asexual

Se da por medio de “hijos o hijuelos” (Figura 11), los cuales se extraen con cuidado a medida que van emergiendo al lado de la planta madre (Burch 1981; Popenoe 2005), es poco utilizado por productores ya que los hijuelos que se obtienen son desuniformes y no es posible que se haga una planificación de la



cosecha con plantas que presentan diferencias en crecimiento. El bulbo es otro tipo de reproducción asexual, se puede sembrar de cualquier edad, es el producto principal de exportación de productores de cicas, el cual debe cumplir con criterios de calidad como su calibre determinado según lo exijan los clientes. Sin embargo, otra manera de reproducir la planta es en pote o maceta pero exige un mayor control de enfermedades y estructuras de ambiente controlado. También se han realizado estudios para propagar *in vitro*, pero no se han tenido resultados satisfactorios (Rinaldi *et al.* 2005).



Fuente: Sánchez 2014

Figura 44. Hijos basales de *Cycas revoluta*, ambos fueron sembrados en macetas con suelo, el bulbo de la derecha no emitió raíces, mientras que el de la izquierda tardó 12 meses en emitir un brote de dos hojas.

C. revoluta, es una planta de lento crecimiento y difícil propagación, la cual se puede realizar de manera sexual o asexual. Al ser una planta dioica, las estructuras reproductivas se encuentran en plantas separadas en la parte apical del tallo y se les conoce como estróbilos (microstróbilo: masculino y megastróbilo: femenino) (Figura 12) (Pérez y Vovides 1997).

2.10.2 Reproducción sexual

En la Figura 12, se observa el dimorfismo sexual entre plantas de cicas macho (Figura 12-A) y hembra (Figura 12-B), en donde claramente se muestra en el caso del macho, un cono en la parte central, el cual sobresale, es de color amarillo cuando está activo e impregnado de polen, y de color café cuando llega a la senescencia. En el caso de la hembra, de igual manera muestra una estructura en la parte central, pero esta contiene las semillas en desarrollo y muestra el follaje con un ángulo de mayor grado debido al megastróbilo que soporta en la parte



central de la corona. Productores de cicas indican que una de las características que puede diferenciar hembras de machos en etapas tempranas, es que el macho muchas veces se bifurca en la parte superior y forma dos coronas de hojas por aparte, además presenta el follaje con un ángulo de menor grado.

La forma de reproducción principal de este tipo de plantas es por medio de semillas (Figura 12-D), las cuales se recolectan en cierto periodo y se pueden almacenar una vez abierto en un lugar fresco durante un periodo de cuatro a doce meses para que se dé la maduración (Poepenoe 2005); se puede acelerar el proceso de maduración, sometiendo a la semilla a un proceso de escarificación. El periodo de maduración es determinado por la especie de cicas, a menudo deben pasar largos periodos de maduración del embrión para que se dé la germinación. Sumado a esto, la germinación esperada no siempre se da, debido a que la semilla generalmente tiene un bajo porcentaje de viabilidad (Burch 1981). Es posible realizar una prueba de fertilidad en un balde con agua, las semillas que floten son infértiles debido a que no fueron polinizadas y no pudo formarse el embrión (Pérez y Vovides 1997).

No existe información suficiente en cuanto a procesos de producción de semilla, debido a que en Costa Rica no existen plantaciones comerciales dedicadas a la producción de semilla. Existen ciertas dificultades para producir la semilla, debido a que la planta de *C. revoluta* tiende a diferenciarse sexualmente después de largos periodos de años, además de que la polinización se debe hacer manual, colocando el polen procedente del cono del macho en la superficie de la flor de la hembra; de manera que la semilla se formará aunque el embrión no exista; por otro lado se debe recalcar que existe una viabilidad o germinación muy baja comparada con las semillas importadas, las cuales presentan diferencias de crecimiento y vigor entre ellas; esto se puede deber a factores como el tiempo de reposo que debe pasar la semilla antes de que sea sembrada, periodo requerido para que suceda el almacenamiento de sustancias dentro de la semilla, las cuales van a nutrir al embrión; a esto se le conoce como letargo por embrión no desarrollado (Perez y Vovides 1997).





Fuente: Sánchez 2014

Figura 45. Órganos reproductores de *Cycas revoluta*. microstróbilo: masculino (A y C), y megastróbilo: femenino (B y D).

3. Principales plagas

3.1 Cycad Aulacaspis Scale (CAS)

Es una escama, perteneciente al orden Hemiptera: Diaspididae, llamada *Aulacaspis yasumatsui*, es una plaga específica de las cicas a nivel mundial, es conocida como Cycad aulacaspis scale (CAS), los daños inician con puntos cloróticos sobre las hojas (Figura 13). Esta escama se encuentra cubierta por una armadura cerosa, la cual eventualmente cubrirá la planta incluyendo las raíces. Las hojas se muestran desecadas y se tornan color café y eventualmente la cica muere (Marler y Moore 2010). El SFE (2009), además de *A. yasumatsui*, reporta la escama *Chrysomphalus aonidum* (Hemiptera: Diaspididae) como plaga en *C. revoluta* cultivadas en Costa Rica.





Fuente: Sánchez 2014

Figura 46. Plantas de *C. revoluta* infectadas por escamas *Aulacaspis yasumatsui*, vista desde distintas perspectivas, nótese como envuelve el pedúnculo y los foliolos de la hoja hasta dejarlo color blanco.

Para el control de la escama, se pueden utilizar insecticidas con ingrediente activo Imidaclopir y Thiamethoxam (son sistémicos), también está Pyriproxifen que actúa como regulador de crecimiento, esteriliza las hembras, baja la viabilidad de los huevos y actúa sobre la metamorfosis. Sin embargo estos insecticidas son de amplio espectro y son necesarias varias aplicaciones (Emshousen *et al.* 2004; citados por Naranjo 2011). Se ha utilizado aceite agrícola aplicado por medio de aspersiones foliares, es efectivo y evita que la escama se establezca en la hoja; también se utilizan mezclas entre aceite agrícola y Dimetoato o Imidacloprid (Weissling *et al.* 1999; citados por Naranjo 2011).

Se han utilizado insectos parasitoides como *Coccobius fulvus* (Hymenoptera: Aphelinidae) y depredadores como *Cybocephalus binotatus* (Coleoptera: Nitidulidae) (Hodges 2006; citado por Naranjo 2011).

3.2 Virus CSNV (Cycad Necrotic Stunt Virus)

Es el único virus caracterizado para las gimnospermas, es un *Nepovirus* del subgrupo b, de la familia Comoviridae (Han *et al.* 2002), fue aislado y caracterizado en Japón en 1986, en unas plantas de *Cycas revoluta* con síntomas de necrosis y corrugamiento de hojas nuevas y puntos necróticos en hojas maduras (Luo 2012; Han *et al.* 2002). También se menciona en otras zonas del mundo donde se cultivan cicas (Australia, Nueva Zelanda, Italia) daños por el CNSV, es transmitido por semilla, nematodos y propagación vegetativa (Harris 2002; Luo 2012). Cicas es el único género de plantas al que se le conoce como



hospedero del CNSV, sin embargo puede ser transmitido a familias como Aizoaceae, Amaranthaceae, y Chenopodiaceae (Kreith *et al.* 1994; Citado por Han *et al.* 2002). Rodrigo Valverde, profesor virólogo de la Universidad Estatal de Luisiana LSU, realizó extracciones de ARN a plantas de *C. revoluta* de jardines internos de la Universidad, las cuales presentaban sintomatologías similares a la chasparria (Figura 14) e inoculó en plantas indicadoras para verificar la existencia de virus. No se obtuvieron resultados positivos, a la fecha, este virus no ha sido reportado en Estados Unidos.



Fuente: Valverde 2014

Figura 47. Lesiones encontradas en jardines de Luisiana State University (LSU), ambas lesiones fueron analizadas con extracción de ARN e inoculadas en plantas indicadoras por Valverde 2014. Sin embargo no se encontró relación con el CNSV.

3.3 Deficiencia de elementos como Mn y relación Fe:Mn.

Es muy común que se presenten manchas cloróticas y necróticas a nivel foliar en plantas de *Cycas revoluta* en regiones tropicales del mundo. Deghan *et al.* (1994), estudiaron la posible relación existente entre los síntomas presentados a nivel foliar y las deficiencias o desbalances nutricionales en el suelo debido a relación Fe:Mn ($r^2= 0,61$); determinaron que en suelos deficientes en Mn, es necesaria la aplicación de micronutrientes para suplir las necesidades de la planta, debido a que el Mn es un elemento de poca movilidad; además indicaron que la sintomatología de la clorosis puede variar debido a la variación genética de plantas.

Generalmente se da un cambio en la coloración que va desde amarillo hasta café, incluso en casos severos, más de la mitad o la planta entera se decolora y



muere (Popenoe 2005). En regiones donde existen pH básicos es generalmente donde ocurren este tipo de desórdenes nutricionales ya que en pH ácidos más bien existe toxicidad por elementos como el Hierro.

3.4 Necrosis foliar o chasparria

En muchas zonas donde se cultivan cicas se han observado síntomas de necrosis y clorosis en el tejido foliar, esto puede provocar la muerte de la planta y retarda el llenado del bulbo. Este problema no ha sido metódicamente estudiado, además no se ha logrado encontrar alguna respuesta relacionada a los posibles agentes causales (Deghan et al. 1994). Muchos productores en Costa Rica han abandonado la actividad debido al difícil manejo de esta enfermedad, especialmente cuando se dedican a la comercialización de follaje y cica en pote o maceta.

La chasparria puede ser causada por un complejo de patógenos de manera que unos actúan como patógenos primarios y otros como secundarios, se puede presentar la infección en plantas de cualquier edad, tanto en campo como en camas de germinación (Guzmán 2012), en la Figura 8 se observa que la enfermedad afecta la parte media o extrema de los folíolos y si el ataque es muy severo afecta la totalidad de la hoja.



Fuente: Sánchez 2013

Figura 48. (A) Tejido joven en campo afectado por chasparria. (B) Planta en condiciones de campo con tres hojas afectadas completamente por chasparria . (C) Plantas en semillero con los extremos lesionados.

Existen enfermedades reportadas para *C. revoluta* que se pueden asociar a la patología presentada a nivel foliar, entre las más destacadas se encuentran:












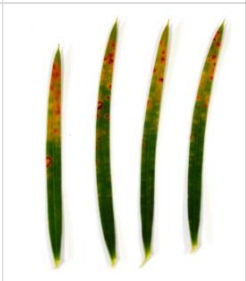
Alternaria sp., *Fusarium oxysporum*, *Pestalotia cycadis*, *Gloeosporium* sp., *Cercospora* sp., *Rhizoctonia* sp. (MAG 2009); otras como *Chaetomella cycadina*, *Sphaeropsis* sp., *Ascochyta* sp., *Cladosporium* sp. (Rao y Baheker 1964), *Colletotrichum* spp., *Cilindrocladium* sp.; todos los microorganismos mencionados anteriormente producen conidios, dañan el tejido foliar, provocan pérdidas en la cosecha y bajos rendimientos.

Sánchez (2015) describió la sintomatología asociada a cuatro principales hongos que se presentan en las lesiones de la necrosis foliar: *Colletotrichum proteae*, *Fusarium* sp., *Nigrospora sphaerica*, *Pestalotiopsis foedans* y *Sclerotium* sp, entre otros. Además de establecer una metodología para las inoculaciones bajo ambiente controlado, determinó que el agente causal de la necrosis foliar o chasparria, es *C. proteae*, después de haber sido comparadas fenotípicamente la colonia y la forma de los conidios, comprobando así, los postulados de Koch. Las inoculaciones realizadas con los demás patógenos, no fueron efectivas, esto se debió posiblemente a la dureza de la cutícula de la planta y la forma de penetración del patógeno; es posible que sean oportunistas y penetren ya una vez establecida la colonia de *C. proteae*.



Sánchez en el 2015, realizó una categorización de los síntomas presentados por la chasparria en *Cycas revoluta* (Figura 16), en donde se muestran los síntomas más comunes observados en campo, la descripción y el posible agente causal aislado de dichas lesiones. Solamente fueron comprobados por medio de los Postulados de Koch, los síntomas ocasionados por *C. proteae*.



Síntomas presentados por chasparria en campo

| Ilustración | | Caracterización | Patógeno presente en lesión |
|---|---|--|---|
|  |  | <p>A</p> <p>Se presenta como una desecación repentina o acelerada de foliolo jóvenes que avanza desde el ápice hacia la base del mismo. A diferencia del síntoma B, el tejido dañado tiende a corrugarse y puede haber abscisión de la totalidad o parte del mismo. Al igual que en B y en G, se observa en el tejido seco la formación de estructuras (cuerpos fructíferos del hongo) que semejan puntos negros.</p> | <p><i>Fusarium</i> sp. <i>Colletotrichum proteae</i> <i>Nigrospora sphaerica</i></p> |
|  |  | <p>B</p> <p>Lesión de apariencia seca, que inicia desde el extremo apical del foliolo y va avanzando hacia la base del mismo hasta secarlo por completo. El tejido se endurece, se tuesta y se observa la formación de estructuras (cuerpos fructíferos del hongo) que semejan puntos negros.</p> | <p><i>Nigrospora sphaerica</i> <i>Colletotrichum proteae</i> <i>Aspergillus</i> sp.</p> |
|  |  | <p>C</p> <p>La lesión inicia como un punto decolorado en la parte central o borde del foliolo. Con el tiempo un halo clorótico envuelve la lesión la cual al crecer causa deformación del tejido hacia el borde del foliolo. La lesión crece hasta unos 0,5 cm, su parte interna se seca y se hunde hasta que se forma una zona de tejido muerto. En otros casos se da la deformación del tejido hacia el borde del foliolo, puede tratarse de infecciones latentes o que han sido parcialmente controladas por aplicaciones de fungicidas.</p> | <p><i>Cochliobolus geniculatus</i> <i>Fusarium</i> sp. <i>Nigrospora sphaerica</i></p> |
|  |  | <p>D</p> <p>Consiste en un desecamiento del foliolo que va avanzando desde la punta hacia el peciolo, tiene color rojo - cobrizo y no necesariamente los foliolo afectados se encuentran cercanos entre si.</p> | <p><i>Pestalotiopsis foedans</i></p> |
|  |  | <p>E-F</p> <p>Lesiones redondeadas color café-marrón o cobre, dispersos de la parte media del foliolo hacia el ápice del mismo. No hay deformación de los foliolo y provocan una despigmentación gradual del foliolo o de la hoja entera.</p> | <p><i>Pestalotiopsis foedans</i> <i>Davidiella tassiana</i></p> |



| | | |
|---|---|--|
|  | <p>G Al principio la lesión es de color grisáceo, de apariencia húmeda, luego se torna café claro en los bordes y gris claro en su parte central y se forman círculos concéntricos con puntos negros en la superficie. Las lesiones se ubican principalmente en la parte media de los folíolos, secando su parte apical, la cual luego se dobla o retorce y pueden llegar a desprenderse de la hoja. En caso de abscisión una parte de la hoja y encrespamiento del extremo, puede ser similar al síntoma A.</p> | <p><i>Inoculado: Colletotrichum proteae</i></p> |
|  | <p>H Se presenta una lesión inicial en el raquis de la hoja, creando una especie de herida. También se da la deformación de la hoja por medio de un encorbamiento, ya sea hacia abajo, hacia arriba o a un lado y por último el raquis se quiebra en la lesión. Luego se desencadenan los síntomas presentados por el síntoma G.</p> | <p><i>Inoculado: Colletotrichum proteae</i></p> |
|  | <p>I Deformación y despigmentación verde claro de la parte media de un grupo de folíolos consecutivos de la hoja. Primero se deforma una parte del folíolo y luego va perdiendo la coloración verde oscuro. Se puede dar naturalmente el proceso de abscisión del folíolo en la parte afectada. Es posible que este síntoma esté relacionado con desórdenes nutricionales.</p> | <p>Posiblemente infección contrarrestada por fungicidas, desorden nutricional o virus.</p> |
|  | <p>J Despigmentación y leve deformación de la parte central de los folíolos de la hoja sin presencia de necrosis. Es probable que este síntoma esté relacionado con el I.</p> | <p>Posiblemente infección contrarrestada por fungicidas, desorden nutricional o virus.</p> |
|  | <p>K Decoloración y secamiento del tejido que inicia en la base del folíolo y avanza hacia el ápice del mismo. La lesión se seca, el tejido se mantiene firme y no hay presencia de puntos negros como en la lesión A, B y G. Se le atribuye a un desorden fisiológico o producto de un efecto fungicida y no a una patología como tal.</p> | <p>Posiblemente infección contrarrestada por fungicidas o de carácter fisiológico.</p> |
|  | <p>L Se presenta una fuerte despigmentación amarillo claro en partes de los folíolos a manera de manchas o rayas transversales. Algunas veces puede haber deformación, este síntoma se ha observado en plantas en semillero y adultas.</p> | <p>Posiblemente desorden fisiológico o virus</p> |

Fuente: Sánchez 2015

Figura 49. Sintomatología correspondiente a la “chasparria” en *Cycas revoluta*, presentados a nivel de campo.



Sánchez 2015 realizó un estudio para describir la sintomatología asociada a cuatro principales hongos que se presentan en las lesiones de la chasparria: *Colletotrichum proteae*, *Fusarium* sp., *Nigrospora sphaerica*, *Pestalotiopsis foedans* y *Sclerotium* sp, entre otros. Además de establecer una metodología para las inoculaciones bajo ambiente controlado, determinó que el agente causal de la necrosis foliar o chasparria, es *C. proteae*, después de haber sido comparadas fenotípicamente la colonia y la forma de los conidios, comprobando así, los postulados de Koch. Las inoculaciones realizadas con los demás patógenos, no fueron efectivas, esto se debió posiblemente a la dureza de la cutícula de la planta y la forma de penetración del patógeno; es posible que sean oportunistas y penetren ya una vez establecida la colonia de *C. proteae*. Durante las inoculaciones con *C. proteae*, se comprobó si existía alguna relación entre la severidad y la etapa de desarrollo de la planta, en donde se pudo observar (Figura 17) una mayor severidad en las etapas V2 y V3, pero de igual manera termina atacando todas las etapas de emisión foliar, solamente que lo hace lentamente.



Fuente: Sánchez 2015

Figura 50. Fase de desarrollo más susceptible al ataque de la chasparria en *Cycas revoluta*. Plantas fueron inoculadas en: Etapa V1 Infantil, Etapa V2 Formación, Etapa V3 Juvenil y Etapa V4 Madurez. Las fases más susceptibles son la V2 y V3. Foto tomada 15 – 24 días después de haber inoculado.



3.4.1 Desarrollo de la enfermedad

Sánchez 2014 realizó inoculaciones controladas con el agente causal de la necrosis foliar o chasparria en cicas para observar los síntomas de la enfermedad, periodo de incubación y latencia, en la Figura 22 se observa el avance de la enfermedad desde los dos días post inoculación, en donde a los tres días se da la aparición del primer síntoma, lo quiere decir se ha dado la penetración del haustorio en el tejido vegetal, esto se refleja en la lesión necrótica ocasionada; a los cuatro y cinco días se pueden observar estructuras reproductivas del hongo como los acérvulos de color negro, que reflejaría un inóculo secundario de la enfermedad, por lo que se ha cumplido el ciclo reproductivo de *C. proteae*; a los ocho días se puede observar que inicia una despigmentación del foliolo bajo la lesión inicial, se da el proceso necrótico pero esta vez presentando otro tipo de síntoma. La enfermedad es policíclica y de rápida diseminación, los conidios pueden viajar en gotas de agua y contagiar tejido cercano e incluso hojas nuevas en cualquier etapa.

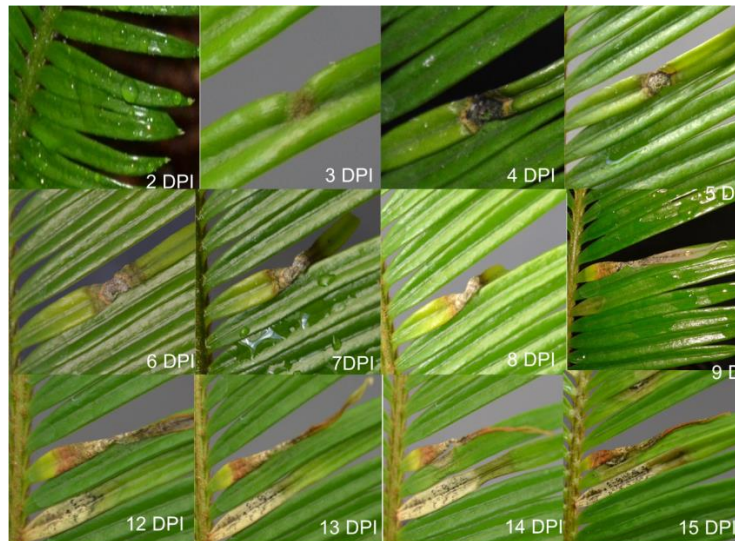


Figura 51. Orden cronológico del avance de una de las lesiones provocada por inoculaciones con *C. proteae* en plantas de *Cycas revoluta*, desde el segundo día post inoculación (DPI), hasta los quince días.











4. Estrategias para el manejo de la chasparria

Agrios (2005), recomienda una integración de tácticas de control de enfermedades en donde se aplique control químico, cultural y físico para una disminución del inóculo de enfermedades fungosas. Así mismo es importante el monitoreo en esta clase de enfermedades fúngicas, debido a que puede existir variabilidad entre los patógenos presentes, por ello es necesario el conocimiento del ciclo de vida y el comportamiento del agente causal, así como su capacidad de respuesta ante las condiciones del medio en el que se desarrolla, es decir la biología, etiología y epidemiología del patógeno.

Sánchez 2015, diseñó una escala diagramática de severidad para el monitoreo en campo de la chasparria en *C. revoluta*, en la Figura 19 se observa la escala compuesta por 8 grados, los cuales corresponden a un porcentaje de tejido afectado en una hoja. Gracias a dicha escala, fue posible la evaluación en campo de dos estrategias (fertilización y fungicidas) para el manejo de la chasparria.

Las escalas diagramáticas son representaciones ilustradas, que muestran síntomas de diferentes niveles de severidad (Bergamin y Amorim 1996, citados por Godoy *et al.* 2006), son utilizadas para facilitar la evaluación y dar mayor precisión en la medición de la enfermedad (Berger 1980, citado por Godoy *et al.* 2006). El diseño de una escala diagramática, es utilizada para la evaluación de la severidad en enfermedades, esto reduce la subjetividad con la que pueden ser evaluadas; estas escalas han sido utilizadas para una gran cantidad de patosistemas (Godoy *et al.* 1997; Leite y Amorim, 2002; Martins *et al.*, 2004; Godoy *et al.* 2006).



| Escala diagramatica para evaluar la severidad de la chasparria en <i>Cycas revoluta</i> | | | |
|---|--|--|--|
| 0 | 1 | 2 | 3 |
| Sana | Muy levemente afectada | Levemente afectada | Medianamente afectada |
|  |  |  |  |
| 0% | >0 - 5% | >5% - 15% | >15% - 25% |
| 4 | 5 | 6 | 7 |
| Altamente afectada | Muy altamente afectada | No funcional | Totalmente necrosada |
|  |  |  |  |
| >25% - 50% | >50% - 75% | >75% - 95% | >95% |
| | | | M Sánchez , 2014 |

Fuente: Sánchez 2015

Figura 52. Escala diagramática para la evaluación de la severidad de chasparria en *Cycas revoluta*.



4.1 Fertilización

Los métodos de control cultural ayudan a mejorar la resistencia del hospedante por medio de prácticas que generen un buen funcionamiento del sistema de la planta. La nutrición mineral de la planta juega un papel muy importante en la resistencia ante enfermedades fúngicas. Una adecuada fertilización, puede tener efectos sobre la pared celular, producción de sustancias de defensa, enzimas y energía para el funcionamiento de los procesos celulares que son afectados durante el desarrollo de una enfermedad (Agrios 2005).

Calcio (Ca)

Se ha demostrado que el calcio brinda dureza y estabilidad a la membrana, además genera un aumento en la rigidez del tejido, de manera que se hace más resistente ante la degradación y entrada de estructuras como el apresorio por parte del hongo (Delgado *et al.* 2006). La presencia de compuestos que no son fácilmente degradados por la acción enzimática del hongo hace que la planta adquiera un tipo de resistencia ante la enfermedad. Entre los compuestos complejos mencionados están los cationes monovalentes como el calcio o magnesio así como pectinas y proteínas (Agrios 2005).

Uno de los aspectos importantes que provoca una adecuada nutrición con calcio, es que se activa la división y elongación celular con paredes fuertes y rígidas. Se debe recalcar que el calcio es un elemento poco móvil dentro de la planta, por ello es necesario prestar atención a las deficiencias presentadas, para suplir las necesidades con anticipación para que esté disponible para la planta cuando lo necesite (Wild 1992).



Magnesio (Mg)

Es un elemento de importancia en regiones húmedas debido a que tiende a lixiviarse; en suelos ácidos es el segundo en importancia en cuanto a cantidad presente en la materia seca después del calcio. Es importante recordar que elementos como el Ca, Mg y K deben estar balanceados en el suelo debido a que es posible que se presente el bloqueo de posiciones de intercambio catiónico, debido a que tienen un efecto antagónico si existe abundancia de uno respecto a otro; así mismo el exceso de K puede ocasionar carencias de Mg, debido a la competencia entre cationes por acaparar las posiciones de intercambio para entrar a la raíz de la planta (Wild 1992).

El magnesio juega un papel importante en reacciones enzimáticas y de transferencia de energía, es el elemento central de la molécula de clorofila, además dentro de la célula tiende a unirse con moléculas orgánicas para formar compuestos importantes como el ácido málico. Entre los síntomas más comunes de la deficiencia de magnesio está la clorosis intervenal en hojas viejas inicialmente y luego se da un descenso en la fotosíntesis (Wild 1992). La deficiencia de Mg es muy común en suelos ultisoles; esto se debe principalmente a la escasa aplicación de fertilizantes que contienen Mg y la excesiva utilización de fertilizantes altos en K y Nitrogenados (Molina 1998).

Silicio (Si)

Es un elemento abundante en la litosfera (27,7%) y suelo (60%), en forma soluble como ácido salicílico (Epstein 1999; Fauteux *et al.* 2005). Epstein (1999), indica que el Silicio no es clasificado como un elemento esencial, no se incluye en la formulación de dosis de fertilizantes; sin embargo, se ha confirmado la importancia a través de numerosos estudios; es absorbido como ácido silícico (H_2SiO_3), es almacenado dentro del tejido de la planta, se aplica como fertilizante en la forma oxidada SiO_2 ; de manera, que se da la siguiente reacción al entrar en contacto con el agua: $SiO_2 + H_2O = H_2SiO_3$ (Wild 1992)



sin embargo Jones y Handreck (1976) citados por Kordorferr y Datnoff (1996), afirman que el Si es absorbido como ácido monosilícico Si(OH)_4 . Se ha comprobado que la falta de Silicio hace más propensas a las plantas ante el ataque de patógenos, por la debilidad en la pared celular (Epstein 1999; Hodson *et al.* 2005, citados por Aguirre *et al.* 2007). Es bien sabido que el grosor de la pared celular en una planta es fundamental para prevenir ataques de patógenos ya que interfiere en la penetración del hongo, hace que esta sea difícil o imposible (Agrios 2005).

Ha sido demostrado que la fertilización con Silicio, hace que la planta aumente la acumulación de fitoalexinas, compuestos fenólicos y lignina (Chérif y Belángér 1992, citado por Aguirre *et al.* 2007), esto genera una mayor resistencia ante el ataque de patógenos. Fauteux *et al.* (2005), defienden la propiedad de bioactivador del Silicio, afirman que dicha propiedad se debe a que se forman enlaces proteínicos que interfieren con cofactores catiónicos de enzimas que se relacionan con la patogenicidad.

En algunas plantas como gramíneas y cucurbitáceas, se da un aumento en la síntesis de peroxidasa, polifenoloxidasa, glucanasas y quitinasas; esto provoca lignificación del tejido. El Silicio es depositado en el retículo endoplasmático de las células y espacios intercelulares en la forma hidratada $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$, aunque también es depositado en células especializadas llamadas células silíceas, las cuales forman una capa gruesa bajo la cutícula de la hoja (Wild 1992; Fihlo *et al.* 2000).

Por otro lado el silicio y el calcio, actúan en conjunto favoreciendo la rigidez de las paredes celulares y brindan resistencia ante ciertos patógenos (Delgado 2006). Ha sido demostrado que el Silicio incrementa la tolerancia ante suelos ácidos y con altos contenidos de Al, Fe y Mn; esto se debe a que aumenta el intercambio catiónico y torna ligeramente básico el pH (Chérif y Belángér, 1992, citado por Delgado *et al.* 2006), además Kordorferr y Datnoff (1996) mencionan que el Si actúa reduciendo los niveles de Fe y Mn en suelos con niveles altos en estos elementos.



4.2 Poda sanitaria

Este tipo de control se refiere a actividades como la poda sanitaria que ayuda a proteger a las plantas del inóculo del secundario de la enfermedad que se encuentra en el campo; se considera como una actividad de saneamiento, la cual es capaz de disminuir la cantidad de inóculo presente y el grado de la enfermedad en la plantación afectada (Agrios 2005).

Agrios (2005), recomienda realizar este tipo de práctica, debido a que es importante extraer el inóculo de las zonas cercanas a la plantación, para evitar que se contagien hojas sanas y se siga propagando la enfermedad. El hecho de excluir el inóculo primario o secundario presente en el campo hace que disminuya la presión de la enfermedad y lo convierte en una práctica eficaz para patógenos monocíclicos y policíclicos. Además menciona que es importante que éste método se acompañe del control químico y que ayude a la disminución de la infección. En la Figura 20 se muestra la poda sanitaria realizada a una planta de *Cycas revoluta* en el campo.



Fuente: Sánchez 2014.

Figura 53. Efecto de la poda sanitaria sobre plantas afectadas de *C. revoluta*. (A) Planta afectada por la chasparria. (B) Planta después de realizada la poda sanitaria. (C) Recolección del inóculo en sacos para no distribuir el patógeno en el campo, luego se queman los restos y se les da un tratamiento con cal.



4.3 Ácido acético

Es posible disminuir el inóculo secundario por medio de aplicaciones de sustancias con poder anti-esporulante como el ácido acético, esto genera un efecto similar a la poda ya que elimina la fuente de inóculo y es de bajo costo comparado con la mano de obra requerida para realizar la poda de hojas enfermas.

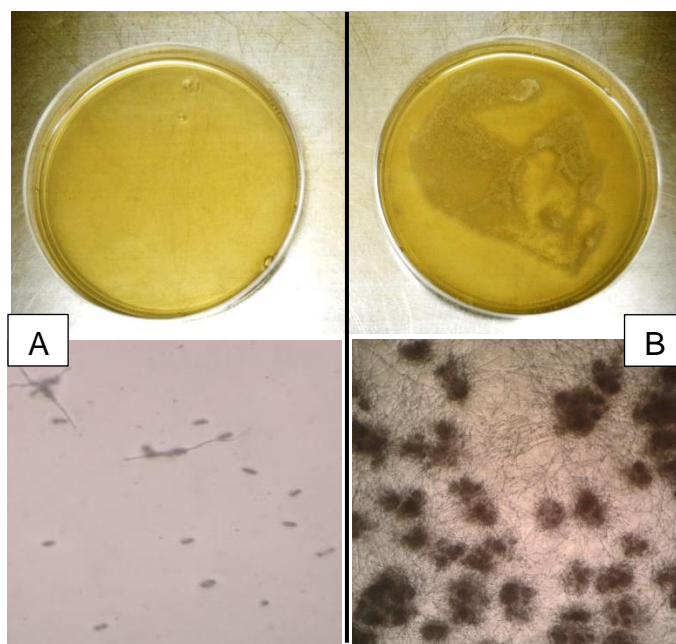
Se ha demostrado el efecto fungicida sobre los esclerocios de *Phymatotrichopsis omnívora* en concentraciones de 8,3 y 83,4 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido acético y concentraciones de 1,7 a 8,3 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ácido acético tienen un efecto fungistático; el mismo autor afirma que el ácido acético induce a la muerte apoptótica de las células al afectar la permeabilidad de la membrana cuando se asocia a las histonas (Samaniego *et al.* 2008).

En un estudio realizado evaluando ácido acético como antiesporulante en lesiones de *Micosphaerella fijiensis* en banano (Gómez 2013), publicó resultados que este compuesto inhibió la esporulación en más de 85% incluso hasta nueve días después de la aplicación. Este mismo compuesto logró reducir los peritecios en *Giberella zeae* (98% - 100%). Según indica Samaniego *et al.* (2008), se da una disminución en la permeabilidad de la pared celular del hongo, induce la apoptosis (Peñalva y Arst 2002, Ribeiro *et al.* 2006). El ácido acético pertenece a los AGV Ácidos Grasos Volátiles de cadena corta y algunas veces en cantidades pequeñas pueden servir más bien como nutrimento, pero también capaz de penetrar y acidificar el citosol de las células de la membrana (Uhre y Arneborg 1988).

Sánchez (2014), realizó unas pruebas en laboratorio en donde preparó dos suspensiones de conidios de *Colletotrichum proteae*; una con agua desionizada estéril y otra en una solución con ácido acético al 5%. En la Figura 21 se observa el crecimiento de micelio en el tratamiento sin ácido acético, mientras que en el tratamiento con ácido acético al 5% existió baja viabilidad de los conidios. Samandiego *et al.* (2008) y Sousa *et al.* (2012)



afirman que el ácido acético induce a la muerte apoptótica de las células, lo que quiere decir que puede conllevar a la muerte celular programada (Gewies 2003) o necrosis programada como se le suele llamar en algunos casos (Kromer *et al.* 2009) y está focalizada en el punto en donde sufre la lesión por parte del patógeno. Según Agrios (2005), la mayoría de plantas poseen estructuras de defensa que son provocadas como respuesta a la infección patogénica, esto lo hacen para contrarrestar la invasión posterior, estas estructuras pueden ser provocadas por un proceso al que se le denomina reacción necrótica o de hipersensibilidad, en donde el núcleo de las células invadidas recibe una señal de muerte programada y tiene como función aislar el patógeno de sustancias que necesita para el desarrollo.



Fuente: Sánchez 2014

Figura 54. A los dos días de la Siembra de suspensión de conidios de *Colletotrichum proteae* en PDA+AgriMycin 46 WP, A. Suspensión con 50 ml de ácido acético/L de agua estéril, B. Con agua estéril.



4.4 Fungicidas

La pared celular de los hongos está compuesta por polisacáridos (quitina, glucano y manano) y proteínas (unidas a polisacáridos, formando glicoproteínas); es una capa que protege la integridad de la membrana celular y genera resistencia mecánica, además es la primera estructura que entra en contacto con el hospedero; se considera el talón de Aquiles de los hongos, debido a que un daño causado en la pared celular puede causar la muerte del hongo (Pontón, 2008).

Entre los fungicidas utilizados para el control de chasparria en cítricos, se pueden clasificar por su mecanismo de acción, entre ellos los inhibidores de procesos enzimáticos relacionados con la biosíntesis del esteroide, el cual brinda estabilidad y permeabilidad a la pared de la membrana del hongo, entre ellos están los grupos químicos: triazoles e imidazoles, los cuales son inhibidores de la dimethylación DMI's (C14- demethylasa) (Orozco 2008).

Los ditiocarbamatos y triazoles son organosintéticos si son clasificados por su naturaleza química. Los triazoles son curativos pero no eliminan las lesiones ya visibles. Fungicidas como el Clorotalonil y mancozeb son multisitio, es más difícil crear una resistencia ante este tipo de moléculas (FRAC 2014). Los fungicidas cúpricos, contienen iones Cu^{2+} que son fijados por grupos químicos como imidazoles, carboxilos, fosfatos, sulfhidrilos, aminas o hidroxilos; la acción del cobre provoca una acumulación letal para las células presentes en bacterias y hongos, entre los principales procesos que afecta se identifican: el bloqueo del proceso respiratorio, inhibición de síntesis de proteínas, disminución en actividades de transporte de membrana (IQV AGRO 2011).

Cada clase química se caracteriza por tener un patrón de comportamiento de la resistencia. Clases de fungicidas como cobres, ftalamidas y ditiocarbamatos nunca se ha encontrado resistencia práctica. En cambio clases como benzimidazoles, fenilamidas y dicarboxiamidas, han



mostrado problemas de resistencia 2-10 años después de su introducción; en caso de fungicida de nuevo grupos que no han sido investigados se puede basar en la especificidad de su acción (Orozco 2008).

Protectantes

Forman una capa protectora en la cutícula de la planta para impedir que el hongo germine sobre el tejido vegetal, de esta manera se requieren aplicaciones preventivas por medio de fungicidas de contacto para evitar infecciones futuras debido a la colonización del hongo en tejido que no se encuentre protegido (Orozco 2008). Es importante mencionar que con la rápida diseminación de las enfermedades resulta difícil aplicar fungicidas protectantes que ejerzan un control anticipadamente, debido a que la enfermedad por lo general se encuentra afectando la planta y necesita más bien algún producto curativo o sistémico que controle el inóculo.

Sistémicos

Actúan sobre las enfermedades ya establecidas, eliminan o controlan la diseminación del hongo por otras plantas, además ejercen efecto sobre la germinación, penetración, crecimiento y reproducción del patógeno como por ejemplo los fungicidas del tipo antiesporulantes (Orozco 2008).

Se han realizado estudios en los que se ha determinado la sensibilidad de especies de *Colletotrichum* ante compuestos cupricos como dithiocarbamatos, benzimidazoles y traizoles; así como a fungicidas entre los cuales están clorotalonil, imidazoles y prochloraz (Waller *et al.* 1993, Citado por Phoulivong 2011).

Por otro lado, también se ha encontrado en especies de *Colletotrichum* que afectan frutos, alta efectividad ante fungicidas como estrobilurinas, sin embargo rápidamente pueden ejercer resistencia ante ciertos compuestos (Wharton & Deiguez-Uribeondo 2004). Citado por Phoulivong 2011. Sin



emabrgo, son frecuentes las aplicaciones con fungicidas como mancozeb, carbendazina, difenoconazole, dicolad y benomil (Phoulivong 2011).

En una investigación (Haddad *et al.* 2003; citado por Batisrta *et al.* 2009) en la que se realizaron análisis de sensibilidad a fungicidas en la germinación de conidios del hongo *C. gloesporioides*, se determinó que el clorotalonil fue el que obtuvo el mejor desempeño en todas las concentraciones testadas, esto demuestra una alta eficiencia ante la germinación de esporas y fue categorizado como fungicida de Alta sensibilidad. Kososki *et al.* (2001), obtuvo resultados semejantes para la especie *C. acutatum*, pero diferentes de los obtenidos por Tavares & Souza (2005), quienes lograron una germinación de 70,4% en conidios de *C. gloesporioides* a una concentración de 1 mg/L, sin embargo en las concentraciones de 50-100 mg/L la inhibición fue del 100%. De igual manera el mancozeb fue el ingrediente activo que presentó la menor eficacia en la germinación de esporas y coinciden con los que obtuvo Ferreira *et al.* (2005).

En un estudio realizado por Sánchez (2015), al evaluar diez ingredientes activos de fungicidas sistémicos y protectantes fueron categorizados según la concentración efectiva para inhibir el 50% de crecimiento micelial (CE50) propuesta por Edington (1971) en alta sensibilidad (AS) $<1 \text{ mgL}^{-1}$ (prochloraz, difenoconazole y propineb), Media Sensibilidad $1 - 10 \text{ mgL}^{-1}$ (pyrimethanil), Baja Sensibilidad $10 - 50 \text{ mgL}^{-1}$ (metiram) e Insensibilidad $>50 \text{ mgL}^{-1}$ (clorotalonil, azoxistrobin, boscalid, mancozeb y mancozeb + oxiclورو de Cobre); entre los protectantes que ejercieron un mayor porcentaje de inhibición mayor al 50% de la colonia fueron: propineb, metiram y clorotalonil; mientras que los sistémicos fueron prochloraz, difenoconazole y pyrimethanil.



5. Galería



Plantación adulta de *C. revoluta*.



Planta de *C. revoluta* recién trasplantada.



Preparación de terreno para la siembra de *C. revoluta*.



Camas de germinación de *C. revoluta*.



Diagnóstico de estado fitosanitario de plantación de *C. revoluta*.



Distribución de semillas de *C. revoluta* en camas de germinación.



Recorrido por la plantación de *C. revoluta*.



Preparación de camas de germinación para la semilla de *C. revoluta*.



Tratamiento previo con Vitavax® a la semilla de *C. revoluta*.



6. Las cicas en el mundo

Montgomery Botanical Center (MBC)



Montgomery Botanical Center, conocido como MBC por sus siglas, ubicado en Miami, Florida; nació gracias a una pareja americana amante de las plantas, antiguamente era la casa de campo durante el invierno de Eleanor y Robert Montgomery llamada “*Coconut Grove Palmetum*”, actualmente mantiene la más grande y fina colección del mundo de palmas (365 especies) y cicas (234 especies distintas hasta el 2012), cultivadas en casi 50 hectáreas; el centro botánico se dedica a la educación, investigación, conservación y manejo hortícola de estas plantas; por otro lado se realizan colectas de semillas por todo el mundo para germinarlas en los viveros y luego incorporarlas al jardín, después de tres o cuatro años según el tipo de planta. Es posible obtener acceso a documentación científica sobre las especies que se encuentran en el jardín botánico por medio de una base de datos, la cual está disponible para científicos, educadores y estudiantes que se encuentren interesados (MBC 2013).



The Cycad Society (TCS)

Fue fundada por el Dr. Walter Hartman de Louisiana State University, LSU en 1977; es un grupo de personas dedicadas a la conservación de cicas para la educación e investigación; para los miembros cuentan con un banco de semillas y además fascículos informativos periódicos sobre las cicas y prácticas hortícolas utilizadas. En la página web de TCS están disponibles una serie de vínculos para acceder a información acerca de investigaciones que se han realizado sobre cicas en el mundo, desde libros hasta artículos científicos (TCS 2012).



Cycad Specialist Group (UICN)



Forma parte de los grupos especializados de la UICN para la conservación de especies de cicas del mundo en peligro de extinción. Realizan expediciones y patrocinan investigaciones en conjunto con MBC y TCS. Cuentan con una base de datos de las especies alrededor del mundo, estudian aspectos como combate de plagas, conservación *ex situ*, polinización de cicas por medio de insectos, explotación sostenible y taxonomía entre otros temas (UICN/CSG 2013).

La comunidad científica dedicada al estudio de las cicas organiza la llamada “International Conference on Cycad Biology”, es realizada cada 3 años desde 1987, cada una se lleva a cabo en un lugar distinto en el mundo, organizado por Montgomery Botanical Center (USA), New York Botanical Garden (USA), IUCN Cycad Specialist Group; la próxima será la décima conferencia llamada CYCAD 2015 en Medellín, Colombia (UICN/CSG 2013).

Convención CITES



Es la Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres, se encarga de regular el comercio de este tipo de especies que generalmente tiene un precio elevado; también se otorgan los permisos de explotación y exportación a productores de las distintas regiones del mundo. La especie CITES de exportación de mayor peso en Costa Rica es *Cycas revoluta* (CCAD 2010).



7. Bibliografía

- Agrios, G. 2005. Fitopatología. 838 p.
- Aguirre, C; Chávez, T; García, P y Raya, J. 2007. El Silicio en los organismos vivos. INTERCIENCIA. 32(8): 504-509.
- Banerjee, M; Shanoo, B y Jhuma, J. 2005. Regulatory effect of light and oxygen on nitrogen fixation by *Anabaena cycadae* in *Cycas*. *Physiology and Molecular Biology of Plants* 11(1):93-97.
- Broome, T. 1997. What fertilizer should I use on my cycads?. (en línea). Consultado 15 septiembre de 2013. Disponible en <http://www.plantapalm.com/vce/horticulture/fertilizer.htm>
- Burch, D. 1981. The propagation of Cycads. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 94:216-218.
- CCAD (Comisión Centroamericana de Ambiente y Desarrollo). 2010. Informe de Valoración Económica del Proceso de Implementación de la Convención CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres). 34p.
- Deghan, B. 1983. Propagation and Growth of Cycads – a conservation strategy. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 96:137-139.
- _____ ; Durando, J y Yeager, T. 1994. Symptoms And Treatments of Manganese Deficiency in *Cycas revolute* Thunb. *Hortscience* 29(6):645-648.
- Delgado, I; Sandoval, M; Rodríguez, C y Cárdenas, E. 2006. Aplicaciones foliares de calcio y silicio en la incidencia de mildiú en lechuga. *TERRA Latinoamericana*. 24(1):91-98.
- Donaldson, J. 2003. *Cycads: Status Survey and Conservation Action Plan*. IUCN/SSC Cycad Specialist Group. Cambridge. 97p.
- Dong, J; Chi, Q.; Wang, L y Chen D. 1999. Rhythm of leaf expansion and control technique of leaf shape for potted *Cycas revoluta*. *Journal of Fujian College of Forestry* 19(2):157-159.
- Epstein, E. 1999. Silicon. *Annual Review Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 50: 641-664.



- Fauteux, F; Rémus, W; Menzies, J y Bélanger, R. 2005. Silicon and plant disease resistance against pathogenic fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 249:1-6.
- Fernández, O; Quesada, A. 2009. Nematodos Asociados a los Cultivos de Costa Rica. MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). (en línea). Consultado 16 de septiembre de 2013. Disponible en http://www.sfe.go.cr/documentos/Nematodos_asociados_a_los%20Cultivos_de_Costa_Rica.pdf
- Filho, B., M.P; Zinder, G.H; Prabhu, A.S; Datnoff, L.E; Kornörfer, G.H. 2000. Importancia do silício para a cultura do arroz. *Potafos. Encarte Técnico. Informações Agronômicas* (89) Marzo/2000.
- Finch, H. 1990. Los hongos comunes que atacan cultivos en América Latina. 2da Edición reimpresión 2004, Editorial Trillas. México.
- Flores, E. 1999. La Planta. II Volumen. Editorial LUR. Cartago, Costa Rica. 884p.
- Fungicide Resistance Action Committee, FRAC. 2014. FRAC Code List: Fungicides sorted by mode of action. 10p.
- Gilman, E. 1999. *Cycas revoluta*. University of Florida, Cooperative Extension Service. 3 p.
- Godoy, C; Koga, L y Canteri, M. 2006. Diagrammatic Scale for Assessment of Soybean Rust Severity. *Fitopatol. Bras.* 31(1): 63-68.
- Gómez, R; Rodríguez, M; Cárdenas, E y Sandoval, N. 2006. Fertilización foliar con silicio como alternativa contra la marchitez causada por *Fusarium oxysporum* (Sheld) en tomate de cáscara . *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 12(1): 69-75.
- Guzmán, M. 2012. Diagnóstico de patógenos en muestras foliares de *Cycas*. Correo electrónico impreso. Área de Fitopatología CORBANA.
- Han, s; Karasev, A; Ieki, H y Iwanami, T. 2002. Nucleotide sequence and taxonomy of *Cycas necrotic stunt virus*. *Archives of virology*.
- Harris, A. 2002. *Nepoviruses and their Diagnosis in Plants. Agriculture, Fisheries and Forestry – Australia*. Consultado el 30 octubre 2013. Disponible en <http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=2&ved=>



0CDQQFjAB&url=http%3A%2F%2Fwww.daff.gov.au%2F__data%2Fassets%2Fpdf_file%2F0017%2F27161%2Fnepovirus.pdf&ei=n_abUurlHoSukQflyYG4CQ&usg=AFQjCNEI90tTefXK1pNcGq2c86sefHcDnA&sig2=8E_bvA08Qv2j8Ovwc6UjkQ

IUCN (International Union for Conservation of Nature). 2013. The IUCN Red List of Threatened Species. Consultado el 30 agosto 2013. Disponible en <http://www.iucnredlist.org/details/42080/0>

IUCN /CSG (IUCN Cycad Specialist Group). 2013. CSG Meetings & International Cycad Conferences. Consultado el 25 Diciembre. Disponible en: <http://www.cycadsg.org/pages/meetings.htm>

Janick, J y Paull, R. 2008. The Encyclopedia of Fruits and Nuts. CABI Publishing. USA. 954p.

Joiner, J. 1981. Foliage Plant Production. Ed. Prentice Hall. 614p.

Kreih S, Strunk G, Cooper JI (1994) Sequence analysis and location of capsid proteins within RNA2 of strawberry latent ringspot virus. J Gen Virol 75: 2527–2532

Kordorferr, G y Datnoff, L. 1996. Fertilización con silicio: una alternativa para el control de enfermedades en caña de azúcar y arroz. Informaciones Agronómicas (22): 6-8.

Kosowski, R; Furlanetto, C yTomita, C. 2001. Efeito de Fungicidas em Colletotrichum acutatum e Controle da Antracnose do Morangueiro. Fitopatologia Brasileira. 26(3): 662-666. Consultado en línea en febrero 2015. Disponible en: <http://www.scielo.br/pdf/fb/v26n3/a16v26n3.pdf>

Kyoda, S y Setoguchi, H. 2010. Phylogeography of *Cycas revoluta* Thunb. (Cycadaceae) on the Ryukyu Islands: very low genetic diversity and geographical structure. Plant Syst Evol. 288:177-189.

Laqueur, G y Spatz, L. 1968. Toxicology of Cycasin. CANCER RESEARCH 28: 2262-2267.

Luo, H. 2012. Using new tools to detect and characterise plant viruses. Tesis Ph.D.Murdoch University, Australia. 244h.

MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería). 2007. Caracterización Cadena Local Plantas Ornamentales. Dirección Regional Huetar Norte Agencia de Servicios Agropecuarios La Tigra. 86p.



Marler, T; Lee, V y Shaw, C. 2005. Cycad toxins and neurological disease. HortScience 40(6):1598-1606.

_____ ; Lindstrom, A y Fisher, J. 2010a. Stem Tissue Dimensions Correlate with Vulnerability to Injury for Six Cycas Species. HortScience. 45(8):1293–1296.

_____ y Moore, A. 2010b. Cryptic Scale Infestations on Cycas revoluta Facilitate Scale Invasions. HortScience. 45(5):837–839.

MBC (Montgomery Botanical Center). 2013. Montgomery's History. Consultado el 25 Diciembre 2013. Disponible en: <http://www.montgomerybotanical.org/Pages/history.htm>

MobileReference. 2009. Encyclopedia of Trees and Shrubs of the World. (en línea). Consultado 2 de octubre de 2013. Disponible en http://books.google.co.cr/books?id=mZEHZMOFLiQC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false

Molina, E. 1998. Encalado para la corrección de la acidez del suelo. Asociación Costarricense del Suelo (ACCS). 1era Edición. San José Costa Rica. 45p.

Nishida, K; Kobayashi, A y Nagahama, T. 1956. Studies of Cycasin, a New Toxic Glycoside, of Cycas revoluta Thumb. Bulletin of the Chemical Society of Japan. 20(3):122-126.

Orozco, M. 2008. Nuevos Mecanismos de acción de Fungicidas en la Agricultura. Reunión de Agricultura Protegida 10 y 11 de Abril del 2008 Mazatlán, Sinaloa, México. Consultado el 14 septiembre 2013. Disponible en <http://es.scribd.com/doc/130258776/Modos-de-Accion-de-Fungicidas>.

Osborne, R; Calonge, M; Hill, K; Stanberg, L y Stevenson, D. 2012. World List of Cycads. 8th International Conference of Cycad Biology. 30p.

Pérez, M y Vovides, A. 1997. Manual para el cultivo y propagación de cicadas. México. 36 p.

Pontón, J. 2008. La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. Revista Iberoamericana de Microbiología. (25): 78-82.

Popenoe, J. 2005. Sago Cycas revoluta. IFAS Extension. University of Florida. (en línea). Consultado 15 de septiembre de 2013. Disponible en <http://cfextension.ifas.ufl.edu/documents/Sago.pdf>



- PROCOMER (Promotora de Comercio Exterior). 2012. Sector plantas, flores y follajes. Consultado en línea 29 agosto 2013. Disponible en <http://www.procomer.com/contenido/sector-plantas-flores-y-follajes.html>
- Rao, R. Baheker, V. 1964. Fungi on *Cycas revolute* Thunb. *Mycopathologia* 23(4):266-268.
- Rinaldi, L; Margheri, M y Ena, A. 2005. Fertilizer-N Effects on *Cycas-Nostoc* Symbiosis. Poster session abstracts. 102nd Annual International Conference of the American Society for Horticultural Science. *HortScience* 40(4):1061
- Seckbach, J. 2012. *Symbiosis: Mechanisms and model Systems*. Kluwer Academic Publishers. 796p.
- Stevenson, D. 2001. *Orden Cicadales*. Trad. Favio González. Instituto de Ciencias Naturales. Bogotá, Colombia. 91p.
- Sánchez, M. 2014. Fotografías tomadas durante la investigación titulada: Estudio de la etiología de la Chasparria en *Cycas revoluta* y evaluación de estrategias para el manejo de la enfermedad. Tesis Lic. Ing. Agr. Tecnológico de Costa Rica.
- _____. 2015. Estudio de la etiología de la necrosis foliar (chasparria) en *Cycas revoluta* y evaluación de estrategias para el manejo de la enfermedad. Tesis Lic. Ing. Agrónomo, ITCR.
- Tavares, G y Souza, P. 2005. Efeito de fungicidas no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da Antracnose do Mamoeiro (*Carica papaya* L.). *Ciência e Agrotecnologia*, Lavras 29(1):52-59.
- Taylor, A; Haynes, J; Stevenson, D; Holzman, G y Mendieta, J. 2012. *Biogeographic Insights in Central American Cycad Biology*. Edited by Lawrence Stevens. 98p.
- Thieret, J. 1958. *Economic Botany of the Cycads*, Chicago Natural History Museum. 12(1): 3-41.
- TCS (The Cycad Society). 2012. *The Cycad Society: General Information*. Contado el 25 Diciembre 2013. Disponible en: <http://www.cycad.org/TCS-info.htm>



- University of Florida. 1999. *Cycas revoluta*. Cooperative Extension Service. Institute of Food and Agricultural Sciences. Consultado el 29 agosto 2013. Disponible en http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CC0QFjAA&url=http%3A%2F%2Fhort.ifas.ufl.edu%2Fdatabase%2Fdocuments%2Fpdf%2Fshrub_fact_sheets%2Fcycrev.pdf&ei=a--bUpKSHYS7kQfmmlCwAw&usg=AFQjCNF1P_a66CU2rq6cx1Gnfdlv-GfbMA&sig2=nz7mt0Qd8GKepTsJ8LjNWg&bvm=bv.57155469,d.eW0
- Vessey, J; Pawlowsky, K y Bergman, B. 2004. Root-based N₂-fixing symbioses Legumes, actinorhizal plants, *Parasponia* sp. and cycads. *Plant and Soil* 266: 205–230.
- Wild, A 1992. Condiciones del suelo y desarrollo de las plantas según Russell. Mundi-Prensa. Madrid. 1045p.
- Yamada, S; Ohkubo, S.; Miyashita, H. y Setoguchi, H. 2012. Genetic diversity of symbiotic cyanobacteria in *Cycas revoluta* (Cycadaceae). *FEMS Microbiology Ecology* 81(3):696-706.

