

AGRONOMÍA COSTARRICENSE

REVISTA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
COLEGIO DE INGENIEROS AGRÓNOMOS
MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA

www.cia.ucr.ac.cr
www.mag.go.cr/rev_agr/index.html



AGRONOMÍA COSTARRICENSE

Revista semestral de Ciencias Agrícolas de la
Universidad de Costa Rica,
El Colegio de Ingenieros Agrónomos,
y el Ministerio de Agricultura y Ganadería

DIRECTOR

Nevio Bonilla Morales
Ministerio de Agricultura y Ganadería
San José, Costa Rica.

EDITORA

Silvia Elena Arce Quesada
Escuela de Economía Agrícola y Agronegocios
Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

ASISTENTE EDITORIAL

Rosibel Serrano Gómez
Centro de Investigaciones Agronómicas
Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

PORTADA

En relación con el artículo “Patogenicidad de hongos asociados a plantas de fresa (*Fragaria ananassa*) y descripción ultraestructural del patosistema” de Granados-Montero *et al.*



Los miembros del Consejo Editorial y el Consejo Editorial Asesor Internacional realizan un arbitraje permanente de los trabajos publicados en la Revista Agronomía Costarricense.

CONSEJO EDITORIAL

Floria Bertsch Hernández
Universidad de Costa Rica. Costa Rica.
Elizabeth Arnáez Serrano
Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica.
Fernando Mojica Betancur
Colegio de Ingenieros Agrónomos. Costa Rica.
Primo Luis Chavarría
Colegio de Ingenieros Agrónomos. Costa Rica.
Daniel Zúñiga van der Laat
Ministerio de Agricultura y Ganadería. Costa Rica.
Jorge Alberto Elizondo Salazar
Universidad de Costa Rica. Costa Rica.
Mario Villatoro Sánchez
Universidad de Costa Rica. Costa Rica.

CONSEJO EDITORIAL ASESOR INTERNACIONAL

Aixa Ofelia Rivero Guerra
European Centre for Applied Statistics S. L., Spain
Alcido Elenor Wander
Embrapa Rice and Beans, Brasil
André Mendes Jorge
Universidade Estadual Paulista – UNESP, Brasil
Beatriz Irene Eibl
Universidad Nacional de Misiones, Argentina
Danilo Pezo
Tropical Agriculture Research and Training Center (CATIE), Perú
Francisco Paulo Chaimsohn
Instituto Agronômico do Paraná, Brasil
Guadalupe Valdovinos Ponce
Colegio de Postgraduados, México
Gustavo J. Lascano
Clemson University, USA
Héctor Horacio Murcia Cabra
Universidad de Santo Tomás (USTA), Colombia
Héctor Mario Andrade Montemayor
Universidad Autónoma de Querétaro, México
Hugo Antonio Tobias Vásquez
Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala
Jorge Etchevers Barra
Colegio de Posgraduados, México
Jorge Hernán Chiriboga Pareja
Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), Brasil
Laura Berta Reyes Sánchez
Universidad Nacional Autónoma de México, México
Martha Nascimento Castro
Faculdade Araguaia, Brasil
Mónica Matilde Barbazán Pacheco
Universidad de la República, Uruguay
Olegario Muñiz Ugarte
Instituto de Suelos del Ministerio de la Agricultura (MINAG), Cuba
Patrice Cannavo
Agocampus Ouest, Francia
Renato de Mello Prado
Universidade Estadual Paulista–UNESP, Brasil
Rogelio Nogales Vargas-Machuca
Estación Experimental del Zaidín, España
Raúl E. Jaramillo Velastegui
International Plant Nutrition Institute, Ecuador

Revista Agronomía Costarricense / Centro de Investigaciones Agronómicas.

Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Teléfono 2511 2080, fax 2234 1627. Correo electrónico: rac.cia@ucr.ac.cr

ISSN 0377-9424

AGRONOMÍA COSTARRICENSE

REVISTA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

COLEGIO DE INGENIEROS AGRÓNOMOS

MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA

Volumen 46

2022

Número 2



REVISORES ESPECIALIZADOS

Revisores Nacionales

Adrian Pinto
Adriana Murillo
Alexandra Urbina
Alfredo Alvarado H.
Alfredo Bolaños
Alfredo Durán
Allan González
Alonso Acuña
Álvaro Castro
Álvaro Jiménez C.
Álvaro Ramírez
Amelia Paniagua
Ana Abdelnour
Ana Cecilia Segreda
Ana Gabriela Pérez
Andrés Hernández P.
Anthony Valverde
Antonio Bogantes
Argerie Cruz
Arturo Brenes A.
Bernal Azofeifa
Bernal Herrera
Bernal Rodríguez
Bernal Valverde
Bernardo Vargas
BK Singh
Bryan Alemán
Carlos Alfaro
Carlos Alpizar
Carlos Henríquez
Carlos Luis Loria
Carlos Luna T.
Carlos Méndez
Carlos Pomareda
Carlos Ramírez M.
Carlos Rodríguez V.
Carmela Velásquez
Claudia Charpentier
Claudia Fernández
Claudia Martínez
Cristina Chinchilla
Cristina Vargas
Cristobal Villanueva
Daniel Saborio
David Mora
Denis Hine
Dennis León
Diego Berrocal
Diógenes Cubero
Dora Flores
Douglas Marín
Edgar Aguilar
Edgar Alvarado
Edgar Gutiérrez
Edgar Vidal
Eduardo Alpizar
Eduardo Barrantes
Edwin Esquivel
Edwin Orozco
Elizabeth Arnáez
Eloy Molina
Emerson Herrera
Enrique Ulloa
Eric Mora N.
Eugenio Corea
Eugenio González
Federico Albertazzi
Felipe Arauz C.
Felipe Arguedas
Fermin Subirós R.
Florencia Antillón
Francisco Mesén
Francisco Romero
Francisco Saborio
Franklin Herrera

Freddy Soto
Geiner Matamoros
Geovanny Garro
Gerardina Umaña
Gerardo Ávalos
Gilbert Barrantes
Gilberto Cabalceta
Gloria Meléndez
Guillermo Araya
Gustavo Fallas
Gustavo Quesada
Héctor Medrano
Helga Blanco M.
Hernán Castro E.
Hugo Aguilar
Ileana Moreira
Isabel Carpio M.
Ismael Hernández
Jenny Reynolds
Johan Lotz A.
Johnny Montenegro
Jorge Camacho
Jorge C. Rodríguez
Jorge Elizondo
Jorge Leiva
Jorge Mora B.
Jorge Sandoval
Jorge Segura
José Bejarano
Jose L. Corrales
José P. Jiménez
José Valerín
Juan Araya
Juan Carlos Madrigal
Juan José Romero
Juan Luis Fallas
Juan Luis Morales
Juan Manuel Hernández
Juan Mora
Juan R. Navarro
Julieta Carranza
Julio Arias
Julio Mata
Julio Rodríguez
Karolina Villagra
Kenneth Largaespada
Kenneth Madriz
Laura Segura
Laura Solís
Lea Wexler
Leida Castro
Leslie Medina
Lidieth Uribe
Lisela Moreira
Lolita Durán
Lorena Flores
Lorena Uribe
Luis Barboza
Luis Brenes Q
Luis Calvo
Luis Carrera
Luis Diego Arroyo
Luis Vargas
Luis Villalobos
Luko Hilje
Manuel Camacho
Manuel Masís
Marco Adamson
Marco Lobo
Marco V. Sáenz
Marcos Chaves
María Isabel González
Maricruz Ramírez
Mario Araya
Mario Arias

Revisores Internacionales

Abellino Pitty (Honduras)
Adriana Escudero (España)
Adriana Murillo (EE.UU.)
Ana Scopel (Argentina)
André Finkler (Brasil)
Andrés Búcaro (Guatemala)
Aura Morales (El Salvador)
Beatriz Eibl (Argentina)
Bernardo Villegas (Colombia)
Carolina Zamorano (Colombia)
Cesáreo Rodríguez H. (México)
Corina Bernigaud (Uruguay)
Consuelo Estevez (Puerto Rico)
Daniel Carreira (Argentina)
Edgar Amezcua (Colombia)
Emilio Olivares Sáenz (México)
Florencia Montagnini (EE.UU.)
Francisco Coll (Cuba)
Francisco Ibarra (México)
Francisco P. Chaimsohn (Brasil)
Guadalupe Valdovinos (Puerto Rico)
Guillermo Reyes (Nicaragua)
Héctor Mario Andrade (México)
Hernán Chiriboga (Ecuador)
Hugo del Cid H. (Guatemala)
Ildefonso Pla Sentis (España)
Jaime Garzón (Colombia)
Jorge Etchevers (México)
José L. Barrera Violet (Colombia)
José M. Tapia (México)
José Moure (España)
Juan Carlos Rosas (Honduras)
Juan F. Gallardo (España)
Juan Francisco Barrera (México)
Juan Pedro Agostini (Argentina)
Julián F. Becerra (Colombia)
Kellen Gatti (Colombia)
Lérica Almaguel (Cuba)
Leopoldo Álvarez (Argentina)
Luis Castresana (España)
Luis Felipe Lata (Brasil)
Manuel Reigosa (España)
Manuel Sandoval (México)
Marcela Guerrero (Colombia)
Marta Nascimento (Brasil)
Mauricio Arango (Colombia)
Miguel Marchamalo (España)
Nolver Arias Arias (Colombia)
Olegario Muñiz Ugarte (Cuba)
Óscar A. Guzmán P. (Colombia)
Óscar G. Campos (Guatemala)
Patrice Cannavo (Francia)
Ramiro Ramírez P. (Colombia)
Raúl Zapata (Colombia)
Reynaldo Mendoza (Nicaragua)
Roberto Fernández (Argentina)
Roberto Ferreira (Brasil)
Rolando Cifuentes (Guatemala)
Ronald Ochoa (EE.UU.)
Rubén Cabanillas Cruz (México)
Santiago M. Sáenz (Colombia)
Sergio Hernández (México)
Tania Mulkay (Cuba)
Thomas J. Smyth (EE.UU.)
Victor Hugo Porras (Colombia)
Victor Ordaz Chaparro (México)
Yisa María Ochoa (México)
Yolanda Moguel (México)

AGRONOMÍA COSTARRICENSE

REVISTA EN LÍNEA

Si desea visitar la Revista Agronomía Costarricense puede hacerlo a través del

Ministerio de Agricultura y Ganadería http://www.mag.go.cr/rev_agr/index.html

y el **Portal de Revistas Académicas de la Universidad de Costa Rica** <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost>

Centro de Investigaciones Agronómicas www.cia.ucr.ac.cr

También puede encontrarla en los siguientes índices internacionales:

	LATINDEX (Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal)
	REDALYC (Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal)
	SciELO (Scientific Electronic Library Online)
	SIDALC (Sistema de Información y Documentación Agropecuaria de las Américas)
	INIS Atomindex (International Nuclear Information System)
	Base AGROC
	DIALNET
	DOAJ (Directory of Open Access Journals)
	AGRIS
	REDIB (Red Iberoamericana de Innovación y Conocimiento Científico)
	PERIÓDICA (Índice de Revistas Latinoamericanas de Ciencias)
	Ulrich's
	OCLC World Cat

	CAB Abstracts
	COPAC
	ROAD (Directory of Open Access Scholarly Resources)
	FAO Online Catalogues
	SHERPA/RoMEO
	Organization for tropical studies
	Gale (Cengage Company)
	DGB UNAM
	CONRICyT (Consortio Nacional de Recursos de Información Científica y Tecnológica)
	CEPAL (Comisión Económica para América Latina y el Caribe)
	LA Referencia (Red de repositorios de acceso abierto a la ciencia)
	Zoological Record
	Academic Search Complete
	MIAR (Matriz de Información para el Análisis de Revistas)
	SABIO
	SUDOC

CANJES

Universidad de Costa Rica
Sistema de Bibliotecas, Documentación e Información
Unidad de Selección y Adquisiciones
-CANJE
Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
Costa Rica

DIRECCIÓN

REVISTA AGRONOMÍA COSTARRICENSE

Centro de Investigaciones Agronómicas
Universidad de Costa Rica
San José, Costa Rica
Teléfono 2511-2080
Fax 2234-1627
Correo electrónico: rac.cia@ucr.ac.cr

CORRESPONDENCIA Y SUSCRIPCIONES

Editorial Universidad de Costa Rica
administracion.siedin@ucr.ac.cr
www.editorial.ucr.ac.cr
Apartado Postal 11501
2060 Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
Costa Rica

Número suelto:

Costa Rica ₡ 3060.00 incluye el 2% de IVA

Suscripción anual:

Costa Rica ₡ 8160.00

América Latina, US\$ 20.40

Asia y África US\$ 20.40

Resto del mundo US\$ 71.40

AGRONOMÍA COSTARRICENSE

Revista semestral de ciencias agrícolas de la Universidad de Costa Rica, el Colegio de Ingenieros Agrónomos y el Ministerio de Agricultura y Ganadería.

VOLUMEN 46

2022

NÚMERO 2

Artículos científicos

- Patogenicidad de hongos asociados a plantas de fresa (*Fragaria ananassa*) y descripción ultraestructural del patosistema 9-28
Milagro Granados-Montero, Mariam Zúñiga-Castañeda, Priscila Chaverri-Echandi, Efraín Escudero-Leyva y Melissa Mardones-Hidalgo
- Evaluación de metodologías para determinar las características físicas de un sustrato de fibra de coco 29-45
Freddy Soto-Bravo y Alejandro Betancourt-Flores
- Efecto de la inoculación con *Trichoderma* sobre el crecimiento vegetativo del tomate (*Solanum lycopersicum*) 47-60
Daniela Rodríguez-García y Jorge Vargas-Rojas
- Microorganismos asociados a la enfermedad conocida como pudrición suave del fruto de banano (*Musa* sp.) y alternativas de control microbiológicas y químicas a nivel in vitro 61-76
Jose Pablo Vargas-Fernández, Amy Wang-Wong y Miguel Muñoz-Fonseca
- Frecuencias de aplicación de bioproducto en el desarrollo y el control de enfermedades de café ... 77-84
Yusdel Ferrás-Negrín, Marianny Portal-Rodríguez, Carlos Alberto Bustamante-González y Ciro Sánchez-Esmori
- Crotalaria spectabilis* Roth como cobertura en café (*Coffea arabica* L) para el manejo de malezas 85-100
Robin Gómez-Gómez, Eric Chaves-Sánchez y María Isabel González-Lutz
- Tolerancia de varias leguminosas de cobertura a herbicidas pre y posemergentes. 101-116
Robin Gómez-Gómez y María Isabel González-Lutz

Caracterización fenotípica, genotípica y ensayos de autopolinización en 18 accesiones de achiote (<i>Bixa orellana</i> L.) en Costa Rica	117-134
<i>Enio Remberto Duque-Y Duque, Milena Belén Aguirre-Saltos y Ana Cristina Tamayo-Domínguez</i>	

Notas técnicas

Comunidad de aves y daños que generan en la producción agrícola en Alajuela, Costa Rica . . .	135-146
<i>Carol Sánchez-Núñez y Javier Monge-Meza</i>	
Análisis del comportamiento de tres híbridos de pimiento bajo 2 diferentes sistemas de riego	147-158
<i>Bertha Holguín-Burgos, Allan Alvarado-Aguayo, Danilo Delgado-Delgado y Mónica Munzón-Quintana</i>	

PATOGENICIDAD DE HONGOS ASOCIADOS A PLANTAS DE FRESA (*Fragaria ananassa*) Y DESCRIPCIÓN ULTRAESTRUCTURAL DEL PATOSISTEMA

Milagro Granados-Montero^{1/*}, Mariam Zúñiga-Castañeda²,
Priscila Chaverri-Echandi³, Efraín Escudero-Leyva⁴, Melissa Mardones-Hidalgo⁵

Palabras clave: Microscopia electrónica; fitopatógenos; *Fusarium oxysporum*; *Neonectria* sp; *Dactylonectria* sp; *Sydowia polyspora*.

Keywords: Electron microscopy; phytopathogens; *Fusarium oxysporum*; *Neonectria* sp; *Dactylonectria* sp; *Sydowia polyspora*.

Recibido: 08/10/2021

Aceptado: 25/03/2022

RESUMEN

Introducción. El cultivo de fresa (*Fragaria ananassa*) es importante en Costa Rica por su alta demanda como fruta fresca y para elaboración de mermeladas. En 2015 empezaron reportes de muerte de plantas, presumiblemente, asociada a complejos de hongos habitantes en el suelo. Los síntomas eran enrojecimiento y necrosis de hojas, coronas, raíces y luego, el desplome de las plantas. Con pérdidas hasta del 90% en plantaciones nuevas. **Objetivo.** Determinar la patogenicidad de hongos asociados a plantas de fresa enfermas y describir la micro morfología del patosistema. **Materiales y métodos.** Se colectaron plantas enfermas variedad Festival, y se realizaron aislamientos a partir de corona y raíz. Se clasificaron los morfotipos recuperados,

ABSTRACT

Pathogenicity of fungi associated with strawberry plants (*Fragaria ananassa*) and ultrastructural description of the pathosystem.

Introduction. Strawberries are important in Costa Rica due to their high demand as fresh fruit and for making jams. In 2015, reports of plant death began, presumably associated with soil-dwelling fungal complexes. The symptoms were redness and necrosis of leaves, crowns, and roots, then the collapse of the plants. With losses of up to 90% in new plantations. **Objective.** To determine the pathogenicity of fungi associated with diseased strawberry plants and to describe the micromorphology of the pathosystem. **Materials and methods.** Diseased Festival variety plants were collected, and isolations

* Autora para correspondencia. Correo electrónico: maria.granadosmontero@ucr.ac.cr

1 Universidad de Costa Rica, Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit y Centro de Investigaciones en Estructuras Microscópicas (CIEMic), San José Costa Rica.

 0000-0002-0321-7729.

2 Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica, (MAG-DRCO), Cartago, Costa Rica.

 0000-0003-3416-820X.

3 Universidad de Costa Rica, Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA), Costa Rica y University of Maryland, Department of Plant Sciences and Landscape Architecture, College Park, Maryland, U.S.A.

 0000-0002-8486-6033.

4 Universidad de Costa Rica, Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) y Escuela de Biología, San José, Costa Rica.

 0000-0003-4440-4296.

5 Universidad de Costa Rica, Escuela de Biología, San José, Costa Rica.

 0000-0002-4402-7817.

se eligieron 3 para secuenciación del espaciador interno transcrito del ADN nuclear ribosomal (nrDNA ITS por sus siglas en inglés) y ejecución de los Postulados de Koch, con $3,5 \times 10^5$ conidios/ml inoculados en gránulos de alfalfa. Las plantas se mantuvieron 19 semanas en ambiente protegido. Luego, se realizó el reaislamiento y la secuenciación de los hongos inoculados y se describió el patosistema por medio de microscopía electrónica de barrido. **Resultados.** Se obtuvieron 10 aislamientos de hongos de corona y 22 de raíz, que se clasificaron en 9 morfotipos. Se eligieron 3 que de acuerdo con el ITS, se ubicaron en las unidades taxonómicas operativas *Fusarium oxysporum*, *Neonectria/Dactylonectria* y *Sydowia polyspora*. Se registró 100% de incidencia en todas las plantas inoculadas y los síntomas coincidieron con los de campo, mientras que el testigo permaneció sano. Los porcentajes de similitud de las secuencias de ITS de los hongos aislados de plantas enfermas provenientes de campo y de los hongos recuperados de la prueba de patogenicidad, fueron $> 99\%$. A nivel ultraestructural se observó que las raíces pierden la epidermis y son colonizadas por los hongos. **Conclusión.** Los hongos inoculados fueron patógenos a plantas de fresa variedad Festival; además, tuvieron la capacidad de dañar la epidermis radical y multiplicarse internamente.

were made from crown and root. The recovered morphotypes were classified, three were chosen for sequencing of the internal transcribed spacer of nuclear ribosomal DNA (nrDNA ITS) and execution of Koch's Postulates, with 3.5×10^5 conidia/ml inoculated in alfalfa granules. The plants were kept for 19 weeks in a protected environment. Then, reisolation and sequencing of the inoculated fungi was performed, and the pathosystem was described by means of scanning electron microscopy. **Results.** Ten isolates of crown and 22 root fungi were obtained, which were classified into 9 morphotypes. Three were chosen, which, according to the ITS, were in the operational taxonomic units *Fusarium oxysporum*, *Neonectria/Dactylonectria* and *Sydowia polyspora*. The 100% incidence was recorded in all the inoculated plants and the symptoms coincided with those in the field, while the control remained healthy. The similarity percentages of the ITS sequences of the fungi isolated from diseased plants, from the field, and of the fungi recovered from the pathogenicity test, were $> 99\%$. At the ultrastructural level, it was observed that the roots lose the epidermis and are colonized by fungi. **Conclusion.** The inoculated fungi were pathogenic to Festival variety strawberry plants, they had the ability to damage the root epidermis and multiply internally.

INTRODUCCIÓN

La planta de fresa [*Fragaria ananassa* (Weston) Roziersp.] produce frutos de vida útil muy corta, la cual depende de la temperatura de almacenamiento, Acosta (2019) indicó que el período varía entre 2 y 8 días, a 37°C y 4°C , respectivamente. Los frutos son considerados como un alimento funcional, debido a su alto contenido de vitamina C, taninos y antioxidantes, ya que proporcionan beneficios a la salud humana, como protección contra eventos cardiovasculares (Do Carmo *et al.* 2015).

En Costa Rica, el cultivo es permanente y está en manos de pequeños productores, repartidos en 342 fincas, la mayoría (39%) ubicadas en la provincia de Cartago, seguida de Alajuela y San José, con 21% cada una, y finalmente, Heredia con el 16%. Además, se reportan 9 fincas productoras de fresa, en la provincia de Puntarenas (INEC 2015).

Según datos generados en los censos locales realizados por las Agencias de Extensión del Ministerio de Agricultura y Ganadería, que dan apoyo a los productores de las zonas de Poás y

Llano Grande, se registró una reducción de 93 ha de cultivo entre 2016-2017 (Avendaño 2017, Zuñiga 2017).

Esta disminución en área se asume que se debió principalmente a la aparición de una enfermedad de etiología desconocida, que provoca la muerte de lotes enteros. La sintomatología que describen los productores es marchitez y muerte de plantas en estado reproductivo, la cual inicia con coloración anormal de las hojas bajas, que se tornan rojizo-púrpura, desde el margen hacia la lámina con deshidratación hasta senescer. El sistema radical es pobre, con zonas necróticas y reducido sistema absorbente.

Al disectar las plantas enfermas fue posible observar diversos grados de decoloración de la médula de la corona, que van desde puntados rojizos en tejido compacto, hasta áreas extensas de consistencia friable con tonalidades cobre-rojizas.

Desde 2005, se han reportado problemas fitosanitarios en fresa en el ámbito mundial, que se denominaron pudrición de raíz y corona y que han sido asociados a diferentes especies de hongos. En Australia, se definió que los agentes asociados a la muerte de plantas eran *Fusarium oxysporum* f.sp. *fragariae* (FOF) y *Phytophthora cactorum*, aislados de corona y raíces, respectivamente. También, reportaron la presencia de *Pythium* spp., *Phoma* spp., *Rhizoctonia* spp., *Colletotrichum* spp. y *Macrophomina* spp. (Golzar *et al.* 2007). *Fusarium oxysporum* se ha reportado en otros países como Corea, China, España, Estados Unidos, Japón y México (Suga *et al.* 2013; Bracénas-Santana *et al.* 2019) y la enfermedad se conoce como marchitez por *Fusarium* o secadera de la fresa.

En España y Estados Unidos se observó colapso y secamiento de plantas de fresa de distintas variedades, denominada pudrición carbonosa; se concluyó por medio de pruebas de patogenicidad, que el causante de la enfermedad era *Macrophomina phaseolina*. Al parecer, la aparición del daño está relacionada al desuso del bromuro de metilo y a condiciones de estrés por

clima cálido y riego escaso (Avilés *et al.* 2008, Koike *et al.* 2013).

De acuerdo con los mismos autores, los síntomas de marchitez y pudrición carbonosa son indistinguibles en el campo, ya que ambos ocurren en las mismas zonas, por lo que cualquier finca puede tener las 2 enfermedades.

En 2016, España reportó al hongo *Neopestalotiopsis clavispora* como el causante de la pudre de corona y raíz en fresa (Chamorro *et al.* 2016). Finalmente, en 2017, Weber y Entrop indicaron que anamorfos tipo *Cylindrocarpon* tenían un rol importante en el complejo denominado muerte negra de las raíces de fresa y frambuesa en Alemania.

Por lo expuesto, en 2017 se inició una investigación con el fin de determinar la patogenicidad de hongos asociados a plantas de fresa enfermas en Costa Rica; así como, describir morfológicamente la relación hospedero-patógeno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal y aislamientos. Se recolectaron 6 plantas enfermas de fresa variedad Festival, provenientes de 3 fincas ubicadas en el distrito de Llano Grande, Cartago. Se trasladaron al Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMic) de la Universidad de Costa Rica; luego se procedió a describir los síntomas (Figura 1) y a realizar aislamientos a partir de raíces y coronas en medio de cultivo agar agua rosa de bengala (AARb). Los aislamientos se incubaron a 24°C en oscuridad por 7 días. Luego, se realizaron cultivos de punta de hifa en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). Una vez desarrollados, se determinaron los morfotipos recuperados de acuerdo con la coloración del cultivo y características microscópicas como tipo de conidioma, conidióforo y conidio. Se eligieron 3 para la prueba de patogenicidad, de acuerdo con la posible capacidad patogénica informada en la literatura.

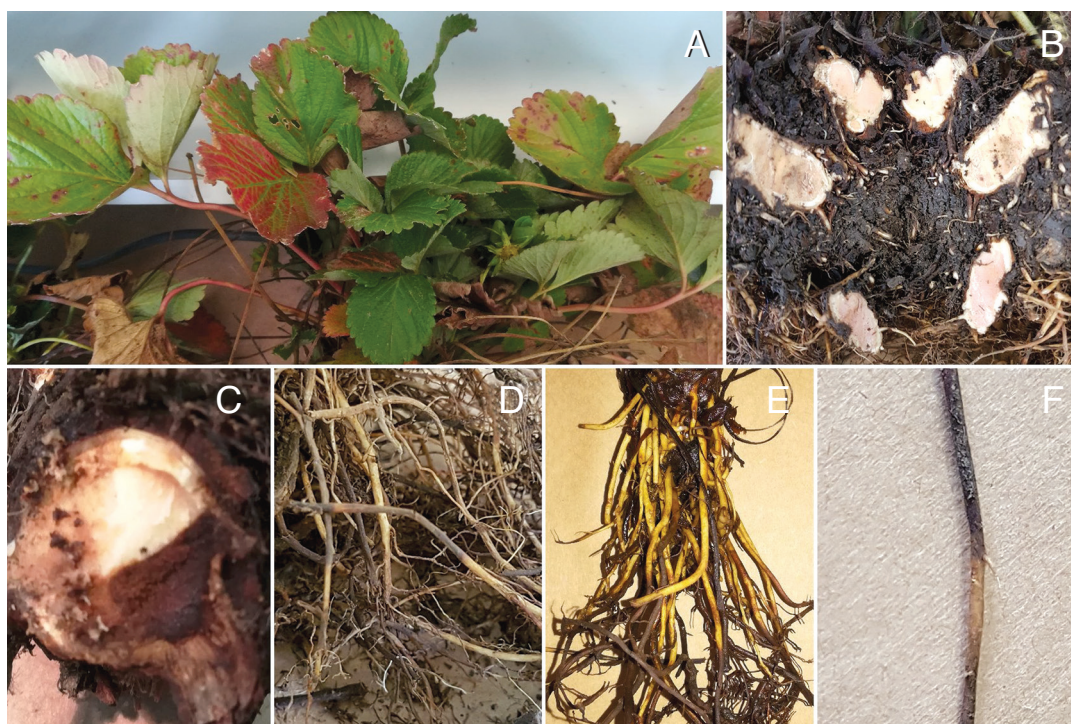


Figura 1. Síntomas de colapso de plantas de fresa variedad Festival recolectadas en campo. A. Síntomas en follaje. B y C. Síntomas en corona. D, E y F. Síntomas en raíz.

En el Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA) de la Universidad de Costa Rica, se extrajo el ADN de los morfotipos seleccionados, por medio del kit Prepman Ultra (Applied Biosystems™). Se realizó PCR de la región del espaciador interno transcrito del ADN nuclear ribosomal (nrDNA ITS por sus siglas en inglés), código de barras fúngico (Schoch *et al.* 2012), con los imprimadores ITS 5 e ITS 4 (White *et al.* 1990). Los productos se enviaron a Macrogen (USA) para su purificación y secuenciación. Las secuencias obtenidas se editaron y alinearon con el programa Geneious 11.1.5., y luego se compararon con las bases de datos del NCBI mediante BLAST. Se consideró en el rango de especie aquellas secuencias que obtuvieron similitudes de 100%. Si el porcentaje fue del 99% se definió como posible especie (cf.) y si se obtuvo entre 96-98% se determinó como

especie relacionada (aff.) (Hofstetter *et al.* 2019). Con respecto al rango de género se consideró una similitud del 97% (López *et al.* 2017). Las secuencias de ITS de los morfotipos seleccionados fueron depositadas en GenBank.

Prueba de patogenicidad. Se preparó inóculo a base de alimento para caballo de “Forraje completo”, compuesto de gránulos de alfalfa. Se usó la metodología de Leslie y Summerell (2007). Se manejaron suspensiones de $3,5 \times 10^5$ conidios/ml de cada morfotipo para la inoculación del sustrato.

Se utilizaron 25 plantas de fresa variedad Festival, producidas en invernadero, bajo sistema hidropónico, para cada hongo a evaluar y 25 como control, para un total de 100 plantas. Todas se sembraron en bolsas negras de polietileno de 3L con granza quemada esterilizada y mezclada con 10g de sustrato inoculado con las

suspensiones conidiales, excepto el sustrato de las plantas control.

Las plantas se mantuvieron durante un ciclo completo de producción de 19 semanas, para exponerlas tanto a la etapa vegetativa como reproductiva.

La prueba se ubicó bajo invernadero, no hubo precipitación desde enero hasta marzo. En abril se registraron 26 mm, en mayo 450 mm y junio 83 mm. El sitio alcanzó una temperatura

máxima de 26,2°C y una temperatura mínima de 17,9°C; la humedad relativa varió entre 31,6 y 87,6 (Figura 2).

Trascurrido ese período, se trasladaron al laboratorio para realizar el registro de síntomas internos a nivel de corona y raíz. Se realizaron aislamientos a partir de tejidos con y sin síntomas visibles. Además, se tomó muestra de tejido sintomático para el procesamiento en microscopía electrónica de barrido.

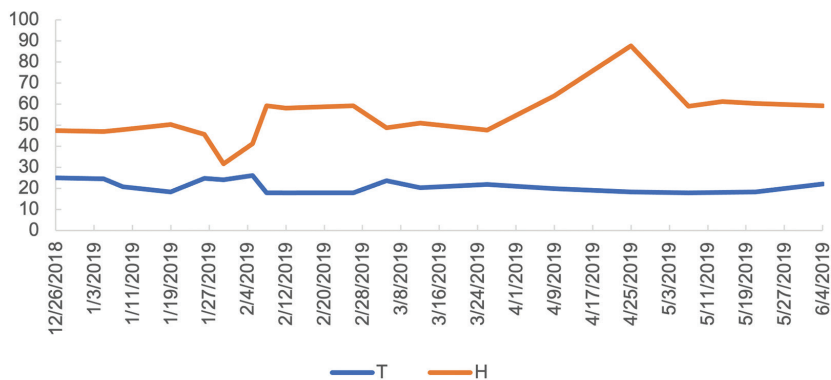


Figura 2. Temperatura (T) en °C y porcentaje de humedad relativa (H) registrada semanalmente durante el período de la prueba de patogenicidad de *Fusarium oxysporum*, *Neonectria* sp. y *Sydowia polyspora* en plantas de fresa (*Fragaria ananassa* (Weston) Roziersp.) variedad Festival bajo invernadero.

Los aislamientos, extracción y secuenciación de ADN se realizaron de la misma manera que para los aislamientos originales. Las secuencias de ITS de los hongos inoculados fueron depositadas en GenBank. Luego se procedió a comparar las identidades de los hongos inoculados con las de los hongos recuperados.

Descripción ultraestructural del pato-sistema. Se tomaron secciones de raíz de las plantas enfermas como producto de la prueba de patogenicidad, y se colocaron en solución fijadora de Karnovsky compuesta por glutaraldehído 2,5%, paraformaldehído 2%, sacarosa al 4% en amortiguador de fosfatos de sodio 0,1M pH 7,4. Posteriormente, las muestras se lavaron con amortiguador y se post-fijaron con tetraóxido de osmio 2%. Después se deshidrataron con un

gradiente ascendente de etanoles (30°, 50°, 70°, 80°, 90°, 95°, 100°, 100°) y se secaron por punto crítico. Una vez secas, se cubrieron con una capa de 200nm de oro y se observaron con el microscopio electrónico de barrido Hitachi S-3700N.

RESULTADOS

Aislamientos iniciales e identificación molecular. Se obtuvieron 10 aislamientos de tejido proveniente de coronas con manchas de apariencia corchosa, y 22 aislamientos de raíces, a partir de diversos síntomas como necrosis, manchas naranjas y café, que fueron clasificados en 9 morfotipos (Tabla 1), nombrados de acuerdo con las características del cultivo en PDA, como coloración, tipo de conidioma, conidióforos y conidios.

Tabla 1. Características y cantidad de morfotipos recuperados a partir de corona y raíz de plantas de fresa cv. Festival enfermas. Llano Grande, Cartago, Costa Rica. 2017.

Morfotipo	Coloración del cultivo*	Conidioma	Conidióforos	Conidios	Cantidad de aislamientos según órgano de la planta	
					Corona	Raíz
<i>Cladosporium</i>	gris-oliva	ausente	libres	polimórficos, amero y didimo	0	1
^a <i>Cylindrocarpon</i> **	café-ambar	ausente	fiálides	macro y micro	1	3
^b <i>Fusarium</i> **	blanco-rosa-violeta	ausente	polifiálides	macro y micro	0	2
<i>Dothideomycete</i> **	gris oscuro-oliva	picnidios	célula conidiógena	amero	5	2
Mucoral	gris	ausente	esporangióforo-columela	unicelular	0	1
No identificado	blanco-beige	ausente	libres	amero	0	4
<i>Penicillium</i>	verde-gris	ausente	libres-penicilados	amero	1	1
<i>Pestalotiopsis</i>	blanco	acérvulos	célula conidiógena	fragmo	3	5
<i>Trichoderma</i>	verde	ausente	libres	amero	0	3

aAnamorfos tipo *Cylindrocarpon*

bProdujeron clamidosporas

*Siete días de crecimiento en PDA a la oscuridad, $\pm 24^{\circ}\text{C}$

**Morfotipos seleccionados para la prueba de patogenicidad

La prueba de patogenicidad se realizó con los aislamientos: F2 del morfotipo *Fusarium*, F33 del morfotipo anamorfo tipo *Cylindrocarpon*, ambos recuperados de raíz, y el aislamiento F238 del morfotipo *Dothideomycete*, proveniente de corona. La secuenciación del producto de

amplificación del ITS indicó que las unidades taxonómicas operativas para esos aislamientos corresponden a *Fusarium oxysporum* (F2), *Neonectria* sp. (F33) y *Sydowia polyspora* (F238), respectivamente (Tabla 2).

Tabla 2. Código de aislamiento, morfotipo, identificación molecular, número accesoión en GenBank, accesoión de comparación y % de similitud, de la secuencia de ITS de individuos aislados a partir de plantas enfermas de fresa (*Fragaria ananassa* (Weston) Roziersp.) variedad Festival. Llano Grande, Cartago, Costa Rica. 2018.

Código aislamiento	Morfotipo	Identificación molecular	Número de accesoión en GenBank	Accesoión de comparación	% de similitud
F2	<i>Fusarium</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	MW622035	EU849584	99,6
F33	<i>Cylindrocarpon</i>	<i>Neonectria</i> sp.	MW622037	JX243950	99,2
F238	Dothideomycete	<i>Sydowia polyspora</i>	MW622039	KF993419	99,8

Prueba de patogenicidad. La sintomatología del follaje fue inespecífica, ya que todas las plantas a nivel foliar expresaron los síntomas de enrojecimiento, manchas foliares, quema de bordes y senescencia, incluso se presentó en las plantas control (Figura 3A).

En las coronas el daño se presentó de distintas maneras, en las plantas inoculadas con *Sydowia polyspora*, 58% de las coronas presentaba puntos cafés o amarillos en el centro o hacia los lados, el 42% restante no presentó síntomas visibles. Las plantas inoculadas con *F. oxysporum* presentaron 55% de lesiones cafés con aspecto corchoso y el 45% restante no presentó síntomas. En las inoculadas con *Neonectria* sp. los síntomas en la corona fueron de un 50% con puntos cafés de aspecto corchoso y la otra mitad no presentaba síntomas visibles. Las plantas sin

inocular no presentaron síntomas visibles (Figura 3B, D, F, H).

Las plantas inoculadas con *F. oxysporum* presentaron raíces secundarias abundantes, lesiones cobrizas aleatorias y coloración rojiza generalizada. Las plantas inoculadas con *Neonectria* sp. perdieron importante volumen radical (no cuantificado), las raíces que permanecieron mostraron necrosis intensa tipo tizón y muy poco sistema absorbente. Por su parte, las plantas inoculadas con *S. polyspora* mostraron daños radicales intermedios, siempre con presencia de necrosis y coloración rojiza; además las plantas en general se observaron de menor tamaño. Mientras que, las plantas sin inocular tenían raíces abundantes y asintomáticas (Figura 3C, D, G, I).



Figura 3. Apariencia de plantas de fresa (*Fragaria ananassa* (Weston) Roziersp.) variedad Festival, luego de 19 semanas en invernadero. A. Síntomas en follaje. B–C. Corona y sistema radical de planta control (sin inocular). D–E. Corona y sistema radical de planta inoculada con *Fusarium oxysporum* s.l (F2). F–G. Corona y sistema radical de planta inoculada con *Neovectria* sp. (F33). H–I. Corona y sistema radical de planta inoculada con *Sydowia polyspora* (F238).

De los aislamientos obtenidos a partir de tejido enfermo de plantas inoculadas, se recuperaron aislamientos con los mismos morfotipos inoculados (Figura 4). Se eligieron 3 aislamientos: F2_52, F33_50 y F238_49 (Tabla 3) para realizar la identificación molecular, la cual

indicó que los aislamientos F2_52 y F238_49 corresponden a los mismos organismos aislados de las plantas de campo, *F. oxysporum* y *S. polyspora*, respectivamente. En el caso del aislamiento F33_50, la secuencia del ITS lo asoció con una especie de *Dactylonectria*.

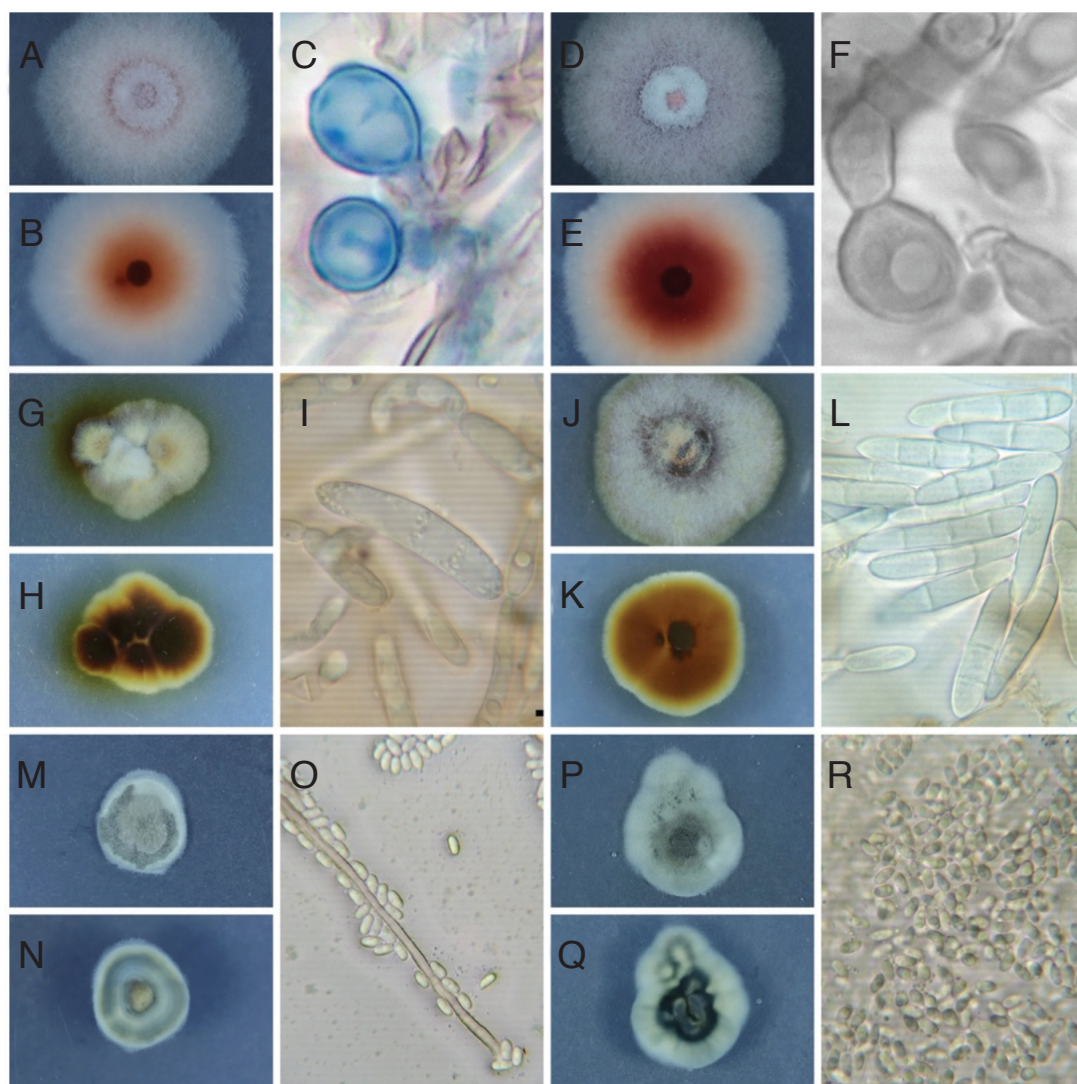


Figura 4. Características morfológicas de los aislamientos inoculados y recuperados a partir de plantas de fresa (*Fragaria ananassa* (Weston) Roziersp.) variedad Festival, luego de 19 semanas en invernadero. A, B y C. Aislamiento F2, *Fusarium oxysporum* s.l., luego de 7 días de crecimiento en PDA. A Colonia anverso. B Colonia reverso. C Clamidosporas. D, E y F. Aislamiento F2_52, *Fusarium oxysporum* s.l., luego de 7 días de crecimiento en PDA. A Colonia anverso. B Colonia reverso. C Clamidosporas. G, H e I. Aislamiento F33, *Neonectria* sp. luego de 7 días de crecimiento en PDA. A Colonia anverso. B Colonia reverso. C Macroconidios. J, K y L. Aislamiento F33_50, *Dactylonectria* sp., luego de 7 días de crecimiento en PDA. A Colonia anverso. B Colonia reverso. C Macroconidios y un microconidio. M, N y O. Aislamiento F238, *Sydowia polyspora*, luego de 7 días de crecimiento en PDA. A Colonia anverso. B Colonia reverso. C Hifa y conidios. P, Q y R. Aislamiento F238_49, *Sydowia polyspora*, luego de 7 días de crecimiento en PDA. A Colonia anverso. B Colonia reverso. C Conidios.

Tabla 3. Código de aislamientos a partir de plantas inoculadas, identificación molecular, número de accesión en GenBank, accesión de comparación y % de similitud, de las secuencias de ITS de individuos de los morfotipos recuperados a partir de plantas de fresa (*Fragaria ananassa* (Weston) Roziersp.) variedad Festival inoculadas para la prueba de patogenicidad.
Llano Grande, Cartago, Costa Rica. 2018.

Código de aislamientos a partir de plantas inoculadas	Identificación molecular	Número de accesión en GenBank	Accesión de comparación	% de similitud
F2_52	<i>Fusarium oxysporum</i>	MW622036	EU849584	99,6
F33_50	<i>Dactylonectria</i> sp.	MW622038	JX244050	99,4
F238_49	<i>Sydowia polyspora</i>	MW622040	KF993419	99,8

Descripción ultraestructural. Las observaciones en el microscopio electrónico de barrido mostraron que las raíces de plantas enfermas presentaron desintegración de la epidermis, lo que deja al descubierto la corteza radical, además adherencia y germinación de esporas, así como colonización del parénquima cortical (Figuras 5, 6 y 7).

En el caso de las plantas inoculadas con *Fusarium oxysporum* y anamorfos tipo *Cylindrocarpon* fue posible observar la presencia de

conidióforos tipo fiálides (Figuras 5C y 7C). Para *S. polyspora* se apreció el desarrollo de una densa red de hifas (Figura 6B). En todas se notó la presencia de material tipo granular.

En plantas colonizadas por el aislamiento F33 (anamorfos tipo *Cylindrocarpon*) se observó desprendimiento de la corteza y exposición de la endodermis cerca de la caliptra (Figura 7A), el daño se pudo observar tanto en raíces primarias como en pelos absorbentes (Figura 7A, D).

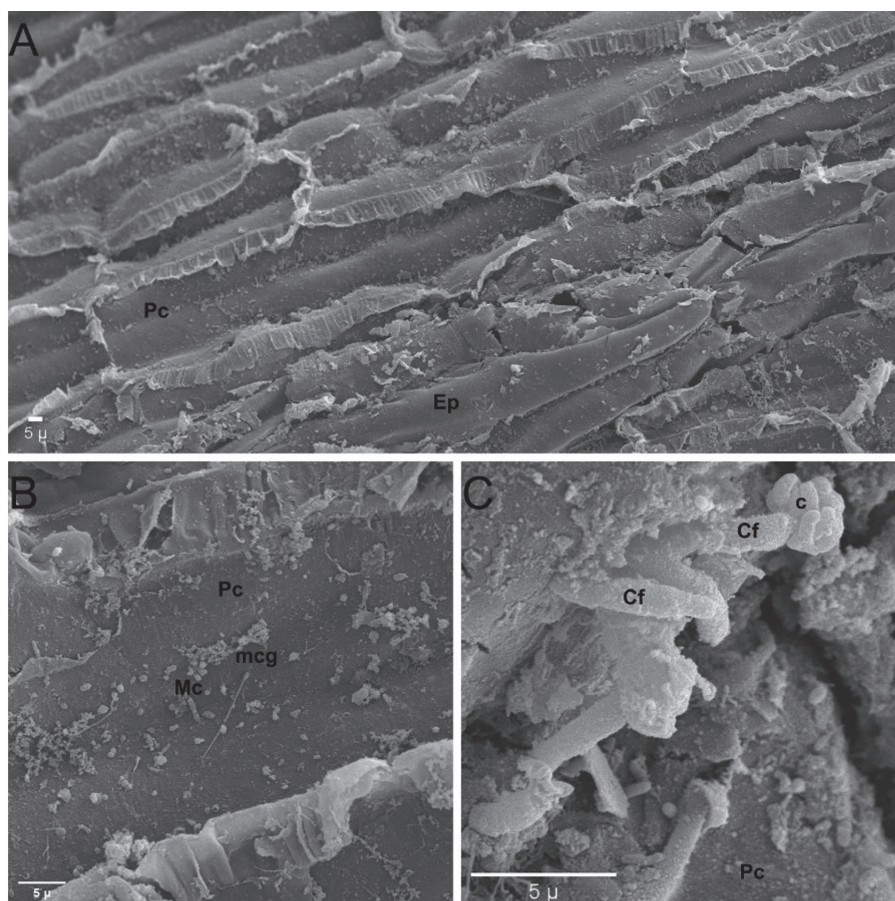


Figura 5. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de raíces de plantas de fresa (*Fragaria ananassa* (Weston) Roziersp.) variedad Festival inoculadas con el aislamiento F2 (*Fusarium oxysporum* s.l.), luego de 19 semanas en invernadero. A. Raíz principal con pérdida casi total de epidermis (Ep) y exposición del parénquima cortical (Pc). B. Presencia de macroconidios (Mc) y microconidios (mc) en las zonas sin epidermis, algunos en proceso de germinación (mcg). C. Presencia de conidióforos tipo monofiálide (Cf) con cabeza de microconidios (c).

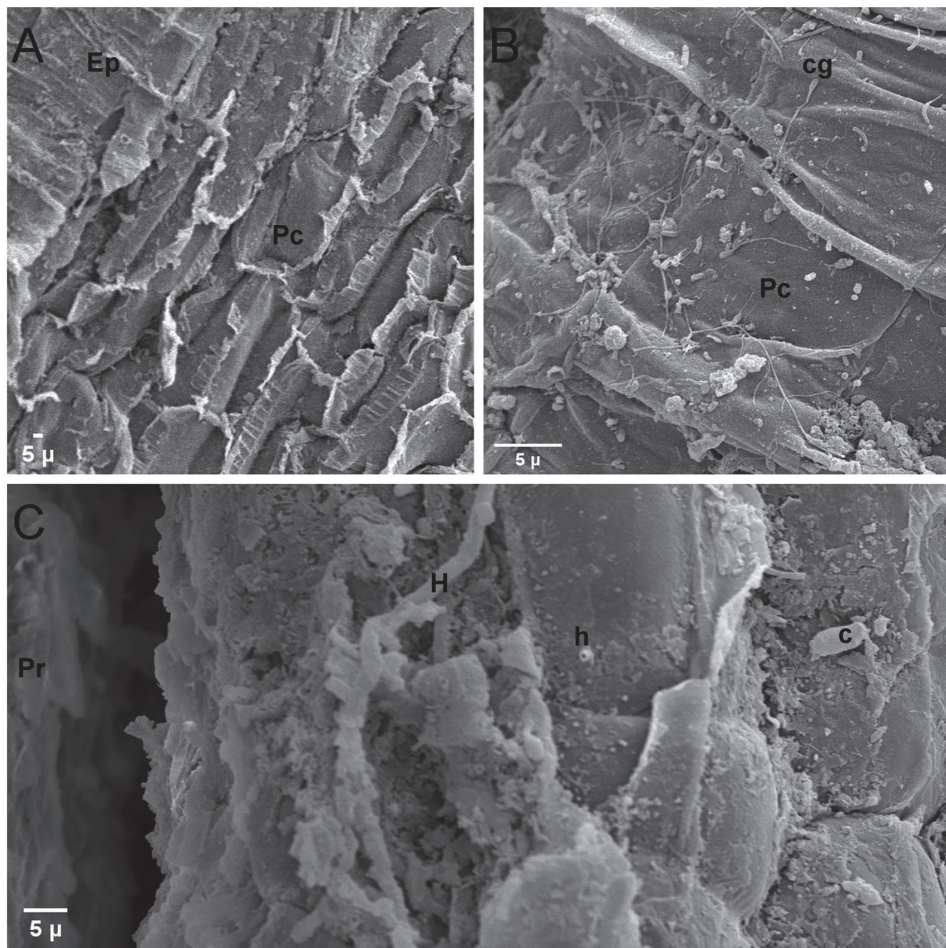


Figura 6. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de raíces de plantas de fresa (*Fragaria ananassa* (Weston) Roziersp.) variedad Festival inoculadas con el aislamiento F238 (*Sydowia polyspora*), luego de 19 semanas en invernadero. A. Pérdida de epidermis (Ep) y exposición del parénquima cortical (Pc). B. Germinación de conidios (cg) sobre parénquima cortical. C. Desarrollo de hifas (H y h) cerca del punto de inserción de un pelo radical (Pr). Presencia de un conidio (c).

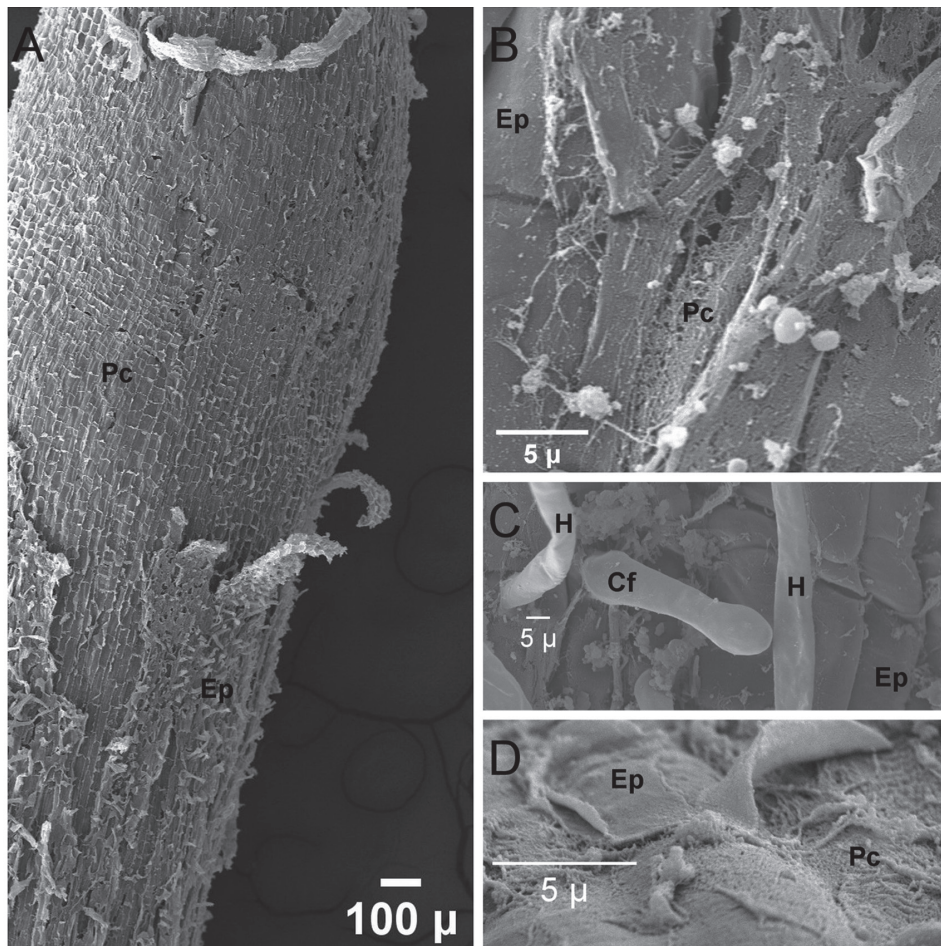


Figura 7. Microscopía electrónica de barrido (MEB) de raíces de plantas de fresa (*Fragaria ananassa* (Weston) Roziersp.) variedad Festival inoculadas con el aislamiento F33 (*Neonectria* sp./*Dactylonectria* sp.), luego de 19 semanas en invernadero. A. Ápice radical con pérdida de epidermis (Ep), exposición de parénquima cortical (Pc). B. Detalle del área dañada. C. Presencia de hifas (H) y conidióforo (Cf) en la epidermis. D. Daño en la superficie de un pelo radical.

DISCUSIÓN

Las pruebas de patogenicidad realizadas en invernadero demostraron la reproducibilidad de los síntomas observados en campo. Mostró que es posible diferenciar por medio de la sintomatología a nivel de corona cual hongo está asociado a una sintomatología en particular; mientras que, los síntomas expresados en follaje, no son decisivos, ya que incluso para las plantas

no inoculadas, fue posible registrar la aparición de enrojecimiento, bordes quemados y senescencia prematura (Figura 3).

Esto indica que, dichas alteraciones están más relacionadas a algún tipo de estrés abiótico que a un hongo de forma específica, aunque la infección puede acrecentar los síntomas. Weber y Entrop (2017) indicaron que plantas expuestas a estrés por sequía o saturación de humedad presentan síntomas más severos.

También, se comprobó que los 3 hongos inoculados provocan el deterioro del sistema radical y que hay algunas diferencias en la magnitud de la sintomatología expresada de acuerdo con el género de hongo que cause la infección. El aporte en las plantas inoculadas con anamorfos tipo *Cylindrocarpon* (*Neonectria/Dactylonectria*) y *S. polyspora* se notó mayor disminución en el volumen del sistema radical, lesiones más severas y pérdida casi total de los pelos absorbentes, en comparación con las inoculadas con *F. oxysporum* y las no inoculadas (Figura 3C, E, G, I).

La sintomatología observada, tanto en campo como en la prueba de patogenicidad, concordó con los síntomas documentados por varios autores. Al respecto, Koike (2008) y Hutton *et al.* (2013) mencionaron que pueden deberse a *Macrophomina phaseolina*; además, Williamsom *et al.* (2012) y Koike *et al.* (2013) indican que los síntomas se asocian a *Fusarium oxysporum* f.sp. *fragariae*, mientras que Adhikari *et al.* (2013), así como, Weber y Entrop (2017) señalan que anamorfos tipo *Cylindrocarpon* son responsables de estos síntomas. En igual forma, CABI (2019) informa que *Neonectria radicola* provoca la podredumbre negra del fresal, con síntomas como plantas pequeñas, crecimiento pobre a nivel radical, decoloración y retraso en el crecimiento de los tallos y las coronas.

En esta investigación se determinó que los aislamientos recuperados de campo y clasificados como morfotipos de *Fusarium* (F2), *Cylindrocarpon* (F33), y *Dothideomycete* (F238) corresponden a las unidades taxonómicas operativas *Fusarium oxysporum*, *Neonectria/Dactylonectria*, y *Sydowia polyspora*, respectivamente. Esto concuerda en parte por lo expuesto anteriormente, referente a los posibles agentes causales de la enfermedad. Fang *et al.* (2011) mencionan que tanto *Fusarium oxysporum* como *Cylindrocarpon destructans* pueden ser recuperados a partir de raíces y coronas de plantas de fresa. Para *S. polyspora*, no hay reporte en el cultivo de fresa en ninguna parte del mundo, por lo que esta sería la primera vez que se registre este hongo que causa daño en el cultivo.

Fusarium oxysporum ha sido relacionado a marchitez de fresa desde 1965 por Winks y Williams, desde entonces, se han realizado caracterizaciones morfológicas, bioquímicas y moleculares del patógeno y se ha mantenido vigente que es la forma especial *fragariae* la causante de la pudrición de corona y raíz de la fresa (Henry *et al.* 2021).

Sin embargo, existen diferencias en susceptibilidad por parte de las variedades, como Fang *et al.* (2012a y b, 2013) y Paynter *et al.* (2014, 2016) indican que la variedad Festival es resistente a FOF, por lo que es posible que el aislamiento utilizado en esta investigación no corresponda a esta forma especial. Incluso, es posible que ni siquiera corresponda a la especie *F. oxysporum* en el sentido estricto, y más bien sea otra especie dentro del complejo de especies “*Fusarium oxysporum*” (FOSC) o que pertenezca a otro complejo.

Cabe decir que, en 2018 Salazar *et al.*, determinaron por medios bioquímicos (BIOLOG) que los aislamientos identificados morfológicamente como *F. oxysporum* correspondieron no solo a esta especie, sino también a cepas de *F. lateritium*, *F. udum* y *F. sacchari*, así como a otras no identificadas. Por otro lado, mediante los marcadores *tef-a1* y β -tubulina, Ayoubi y Soleimani (2016) reportaron que las especies *F. solani*, *F. acuminatum*, *F. equiseti* y el complejo *F. incarnatum-equiseti* tienen la capacidad de infectar plantas de fresa en Irán.

Lo que indica la necesidad de realizar una identificación molecular más precisa, con el uso de varios marcadores como *tef-a1*, *rpb2* y β tubulina. Se deberían utilizar adicionalmente, marcadores específicos para FOF como FofraF y FofraR diseñados por Suga *et al.* (2013), para corroborar si se trata de *F. oxysporum* f. sp. *fragariae*.

Sin embargo, también existe la posibilidad de que efectivamente se trate de FOF, y que el aislamiento inoculado haya tenido la posibilidad romper la resistencia de la variedad. Recientemente, Henry *et al.* (2021) especula acerca de la posibilidad de razas para este patógeno, basados

en que las plantas de fresa solamente tienen un locus que confiere resistencia a *Fusarium oxysporum* f.sp. *fragariae*, el gen *FW1*, por lo que es factible que el patógeno supere la resistencia de un cultivar específico.

Esto podría explicar por qué los conidios del aislamiento F2 (*F. oxysporum sensu lato*) tuvieron la capacidad para germinar, desarrollarse, penetrar y desintegrar la epidermis radical y colonizar el parénquima cortical de las raíces de plantas variedad Festival (Figura 4) considerada resistente a la infección por este hongo, sin embargo, en esta investigación la variedad se comportó como susceptible al aislamiento de *F. oxysporum* inoculado.

Según observaciones por medio de microscopía electrónica de barrido (MEB) realizadas por Fang *et al.* (2012b) en la variedad Festival la penetración de FOF se restringió a la epidermis radical y el patógeno no ingresó al tejido vascular, por lo que no se presentó decoloración de la corona ni marchitamiento de plantas, comportamiento opuesto al hallado en este trabajo. Estos investigadores indican que en la variedad Festival la germinación de las esporas, la penetración, crecimiento de las hifas y colonización de la superficie radical fue impedida debido a que las plantas exudan metabolitos secundarios, compuestos fenólicos y enzimas que inhiben estos procesos, mientras que en la variedad susceptible Camarosa se produjo menor cantidad de metabolitos inhibitorios, lo que permitió la colonización de las raíces y los haces vasculares, que provocan enfermedad.

Otras observaciones realizadas por los mismos autores indican que las uniones y depresiones de la epidermis son los sitios preferidos de acumulación de esporas y penetración de este hongo y que esta tendencia puede deberse a la acumulación de nutrientes en estas zonas. Por el contrario, Yuan *et al.* (2014), en observaciones realizadas por medio de microscopía de fluorescencia, mencionan que las esporas se pueden adherir de forma aleatoria en cualquier zona de la raíz, comportamiento evidenciado en esta investigación.

En otros patosistemas, por ejemplo, en arveja–*F. oxysporum* f.sp. *pisi* raza 2, se ha encontrado que las accesiones resistentes establecen barreras estructurales que impiden la penetración del hongo, como reforzamiento de las paredes, formación de papilas y acumulación de diversas sustancias a nivel radicular (Bani *et al.* 2018).

Otro caso del proceso de penetración relacionado a patosistemas raza específicos es el de banano–*F. oxysporum* f.sp. *cubense* raza 1 y raza 4. En estos sistemas patológicos se observó por medio de MEB que la raza 4 (FOCR4) tiene la capacidad de ingresar a las raíces de banano (*Musa* AAA) variedad Cavendish a través de heridas y de espacios intercelulares; mientras que FOCR1 solo puede hacerlo mediante heridas (Li *et al.* 2017), lo que está directamente relacionado con la susceptibilidad de la variedad, según la raza presente.

Según lo expuesto, se hace relevante definir con exactitud la identidad del aislamiento de *Fusarium* utilizado en esta investigación, y de esta forma entender mejor el patosistema y las posibilidades de manejo.

De igual manera, se debe profundizar en la identificación de los aislamientos F33 y F238, ya que aunque se utilizó el código de barras para hongos (ITS), este no permitió resolver las especies de géneros crípticos como *Cylindrocarpon*. Al respecto, Cabral *et al.* (2012) usaron además del ITS, β tubulina, histona y el factor de elongación 1- α para discriminar entre especies de este género. En este sentido, Lombard *et al.* (2014) hicieron una re-evaluación minuciosa de la familia Nectriaceae, la cual posee gran cantidad de anamorfos tipo *Cylindrocarpon*, por medio de análisis multigénico, usaron 10 marcadores, LSU, ITS, *act1*, *rpb1*, *rpb2*, *act*, *tub2*, *cmdA*, *his3* y *tef-1* para distinguir entre géneros.

Cylindrocarpon y las especies tipo *Cylindrocarpon* son organismos con distribución mundial, mayormente patógenos de suelo, que sobreviven en residuos de cosecha y sustratos en descomposición, aunque también, pueden mantenerse como endófitos. Normalmente causan

podre basal y radical, algunas ocasionan canchales en árboles. Las formas asexuales de *Cylindrocarpon* fueron asociadas con la forma sexual conocida como *Neonectria* Wollenw. (Gordillo y Decock 2017, Lawrence *et al.* 2019).

De acuerdo con Chaverri *et al.* (2011) *Neonectria* sp. es un género cosmopolita y capaz de provocar pudriciones radicales. Estos autores ubican el género dentro de los grupos 1 y 4 de *Cylindrocarpon* según la clasificación de Booth (1966), y en el mismo clado que *Ilyonectria*. En 2013, Rosmann *et al.* propusieron mantener el nombre genérico de *Neonectria* sobre el de *Cylindrocarpon*. De acuerdo con Jayawardena (2019) tanto *Cylindrocarpon* sensu stricto como *Neonectria* sensu stricto pertenecen a la familia Nectriaceae, al igual que *Dactylonectria*. Indicaron también que, este último es similar morfológicamente a *Ilyonectria* y *Neonectria*.

Lawrence *et al.* (2019) identificaron, por medio de análisis filogenético (ITS+*tub2*+*tef-1*), a partir de 12 aislamientos con morfología tipo *Cylindrocarpon* (provenientes de pie negro de la uva) especies tanto de *Neonectria* sensu stricto como de *Dactylonectria* sensu stricto, lo que confirmó que es posible recuperar ambos géneros asociados a morfotipos de *Cylindrocarpon* y que es necesario un análisis multigénico para determinar con certeza la identidad de los aislamientos.

De acuerdo con estas personas autoras, las especies tipo *Cylindrocarpon* causan pudriciones necróticas tanto en coronas como en raíces. En las coronas se observa decoloración y daño vascular, mientras que en las raíces se producen lesiones hundidas y pérdida de biomasa, en general se produce disminución progresiva del vigor del cultivo. Síntomas análogos a los observados en esta investigación y en plantas de campo, hace pensar que podría ocurrir lo mismo en el cultivo de fresa en Costa Rica.

Al respecto, Jayawardena (2019) anota como hospedero de *Dactylonectria* al género *Fragaria* L., y concuerda con Lawrence *et al.* (2019) en la sintomatología que este patógeno provoca en uva, describen severas necrosis

radicales, marchitamiento, clorosis, pardeamiento y senescencia prematura del follaje.

Habibi y Ghaderi (2020), Chen *et al.* (2021), así como, Erper *et al.* (2021), comprobaron que las especies *D. torresensis*, *D. macrodyma*, *D. novezealandica* y *D. pausiseptata* son las responsables de la pudrición radical necrótica en fresa. También mencionaron que provoca severos daños radicales, decoloración de coronas y colapso de plantas, lo que reafirma la idea de que en Costa Rica este hongo tiene la capacidad de provocar los daños obtenidos a partir de la prueba de patogenicidad.

Adicionalmente, y aunque para *Sydowia polyspora* solo se hallaron reportes de identificación molecular con ITS (Talgø *et al.* 2010, Thambugala *et al.* 2014, Silva *et al.* 2020), es importante ratificar su identidad debido a que no ha sido reportado con anterioridad como patógeno de fresa. Este hongo ha sido mayormente asociado a especies de coníferas (Pan *et al.* 2018), que ha causado daños en plantaciones forestales.

En BLAST hay varias secuencias de ITS cercanamente relacionadas a las secuencias depositadas en esta investigación y a secuencias identificadas como *S. polyspora* que fueron aisladas a partir de infecciones necróticas en varias angiospermas, e incluyen gramíneas y especies leñosas. Otra razón, para corroborar la identidad, es que el sinanamorfo hifal (conocido como *Hormonema dematioides*) está reportado como patógeno en humanos (Coldiron *et al.* 1990, Jong Hee Shin *et al.* 1998), lo que podría representar un riesgo para la salud de los productores.

El aislamiento F238, colectado de coronas enfermas en campo, fue capaz de colonizar las raíces primarias y secundarias (Figura 5) y de causar enfermedad en plantas de fresa variedad Festival (Figura 2H, I). El hongo degradó la epidermis radical y colonizó el parénquima cortical, lo que provocó lesiones necróticas y pérdida de pelos absorbentes, así como, necrosamiento de los haces vasculares, amarillamiento foliar y menor crecimiento de las plantas.

Asimismo, las raíces de plantas colonizadas por el aislamiento F33 también mostraron

desintegración de la epidermis, tanto en raíces primarias como pelos absorbentes, hasta el punto de dejar expuesta la endodermis de la caliptra de raíces principales, además, se evidencia la digestión de las paredes celulares epidérmicas (Figura 6), lo que indica la capacidad del hongo para penetrar de forma directa por medio de la secreción de enzimas.

Todo lo anterior, comprueba la capacidad de estos 3 hongos para inducir enfermedad en plantas de fresa variedad Festival. Los daños observados tienen impacto en la producción, ya que tanto las alteraciones en la parte aérea como radical, disturban la producción de asimilados y la adquisición de agua y nutrientes requeridos para el desarrollo de las plantas, debido a la pérdida de área fotosintéticamente activa y raíces absorbentes. Dicho aspecto cobra relevancia cuando la planta entra en estado reproductivo.

En este sentido, los productores indican que en la etapa de reproducción es donde se observa la enfermedad con mayor intensidad, fenómeno que se observó también en esta investigación y fue confirmado por Husaini y Neri (2016) al indicar que, síntomas como marchitamiento del follaje, secado de las hojas viejas y retraso del crecimiento de las plantas, provocan disminución en la producción de frutos.

La diferenciación de síntomas expresados en corona de acuerdo con el hongo inoculado podría suministrar información en condiciones de campo, ya que, los productores al disectar la planta tendrían un acercamiento al posible agente causal, lo que permitiría elegir la estrategia de manejo de forma más acertada. Sin embargo, no todas las plantas expresan sintomatología en corona, como se registró en este estudio, lo que puede afectar el diagnóstico.

Finalmente, se debe mencionar que existe la posibilidad de que las plantas hijas desarrolladas a partir de estolones de plantas enfermas, puedan transmitir la enfermedad, ya que el fenómeno fue observado en esta investigación (datos no suministrados). Al respecto, Pastrana *et al.* (2019) encontraron que las raíces y los peciolos de plantas hijas de la segunda generación,

presentaron infección con *Fusarium oxysporum* f.sp. *fragariae* (FOF) aunque no con síntomas. Se observó en las plantas inoculadas en esta prueba de patogenicidad, que alrededor del 50% de las plantas no presentaban síntomas en la corona, aunque estaban colonizadas por los hongos; lo que significa que mediante observación visual se subestima la incidencia real de la enfermedad. Esto es sumamente riesgoso, debido a que los productores pueden usar este material para iniciar nuevas plantaciones al asumir que se encuentra sano.

CONCLUSIÓN

Estos hallazgos permiten asociar la muerte de plantas de fresa a los hongos estudiados, ya que tuvieron la capacidad de dañar la epidermis radical, multiplicarse internamente y provocar síntomas visibles; sin embargo, es relevante continuar con investigaciones tendientes a comprender la relación que existe entre estos patógenos y posibles condiciones de estrés que predisponen las plantas al ataque.

Adicionalmente, se sientan las bases de próximos estudios destinados a conocer la diversidad e interacciones de otros patógenos de fresa, así como, la posibilidad de identificar especies poco estudiadas asociadas a estos complejos que podrían representar enfermedades emergentes con alto potencial patogénico.

AGRADECIMIENTOS

A la Fundación para el Fomento y Promoción de la Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria de Costa Rica (FITTA-CORI) por el financiamiento parcial de la investigación por medio del proyecto F04-18, a la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica por el financiamiento parcial por medio del proyecto B7A16 inscrito en el Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas, al Centro de Investigación en Protección de Cultivos por permitir el uso de las instalaciones del Laboratorio de Fitopatología. Al Ministerio de

Agricultura y Ganadería por el apoyo mediante las Agencias de Extensión y del Servicio Fito-sanitario del Estado en la recolecta del material.

LITERATURA CITADA

- Adhikari, TB; Hodges, CS; Louws, FJ. 2013. First report of *Cylindrocarpon* sp. associated with root rot disease of strawberry in North Carolina (en línea). Plant Disease 97(9):1251-1251. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-01-13-0116-PDN>
- Avendaño, L. 2017. Cultivo de fresa en área de Poás y alrededores. (Presentación Powerpoint PITTA-FRESA). San José, Costa Rica. 5 diapositivas. (en línea) Consultado 25 jun. 2018. Disponible en http://www.snitta.org/web/pittas.php?p=32&s=PUBLICACIONES_PROYECTOS
- Avilés, M; Castillo, S; Bascon, J; Zea-Bonilla, T; Martín-Sánchez, PM; Pérez-Jiménez, RM. 2008. First report of *Macrophomina phaseolina* causing crown and root rot of strawberry in Spain. Plant Pathology 57(2):382.
- Ayoubi, N; Soleimani, M. J. 2016. Morphological and molecular identification of pathogenic *Fusarium* spp. on strawberry in Iran. Sydowia 68:163-171.
- Bani, M; Pérez-de-Luque, A; Rubiales, D; Rispail, N. 2018. Physical and chemical barriers in root tissues contribute to quantitative resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *pisi* in Pea. Frontiers in Plant Science 9:1-16.
- Bárcenas-Santana, D; Guillén-Sánchez, D; Yazmín-Basaldúa, C; Ramos-García, MDL; Valle-de la Paz, M. 2019. Etiología de la secadera de la fresa (*Fragaria* spp.) en Morelos, México. Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology 37(3):454-463.
- Booth, C. 1966. The genus *Cylindrocarpon*. Mycological Papers 104:1-56.
- CABI. 2019. *Neonectria radicola* (black root of strawberry). Datasheet. Additional resources. Invasive species compendium. (en línea). Consultado 13 oct. 2020. Disponible en <https://www.cabi.org/isc/datasheet/35974>
- Cabral, A; Groenewald, JZ; Rego, C; Oliveira, H; Crous, PW. 2012. *Cylindrocarpon* root rot: multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicola* species complex. Mycological Progress 11(3):655-688.
- Chamorro, M; Aguado, A; De los Santos, B. 2016. First report of root and crown rot caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on strawberry in Spain. Plant Disease. (en línea). Consultado 13 oct. 2020. Disponible en <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-11-15-1308-PDN>
- Chaverri, P; Salgado, C; Hirooka, Y; Rossman, AY; Samuels, GJ. 2011. Delimitation of *Neonectria* and *Cylindrocarpon* (Nectriaceae, Hypocreales, Ascomycota) and related genera with *Cylindrocarpon*-like anamorphs. Studies in Mycology 68:57-78.
- Chen, Q; Yin, SL; Zhang, XG; Ma, XY; Zhong, S; Zhang, GZ. 2021. *Dactylonectria* species associated with black root rot of strawberry in China. Australasian Plant Pathology 50(5):501-511.
- Coldiron, BM. 1990. Cutaneous phaeohyphomycosis caused by a rare fungal pathogen, *Hormonema dematioides*: successful treatment with ketoconazole. Journal of the American Academy of Dermatology 23(2):363-367.
- Do Carmo, E; Viana, M; Morais, A. 2015. Coprodutos da agroindústria processadora de polpa de fruta congelada *Fragaria* sp. como fonte de alimento funcional. C&D-Revista Eletrônica da Fainor, Vitória da Conquista 8(2):108-113.
- Erper, I; Ozer, G; Alkan, M; Zholdosbekova, S; Turkkan, M. 2021. First report of *Dactylonectria torresensis* causing black root rot of strawberries in Kyrgyzstan. Journal of Plant Pathology 103(1):379-380.
- Fang, X; Phillips, D; Verheyen, G; Li, H; Sivasithamparan, K; Barbetti, MJ. 2011. Severity of crown and root diseases of strawberry and associated fungal and oomycete pathogens in Western Australia. Australasian Plant Pathology 40:109-119.
- Fang, X; Phillips, D; Verheyen, G; Li, H; Sivasithamparan, K; Barbetti, MJ. 2012a. Yields and resistance of strawberry cultivars to crown and root diseases in the field, and cultivar responses to pathogens under controlled environment conditions. Phytopathologia Mediterranea 51(1):69-84.
- Fang, X; Kuo, J; You, MP; Finnegan, PM; Barbetti, MJ. 2012b. Comparative root colonisation of strawberry cultivars Camarosa and Festival by *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. Plant and Soil 358 (1-2):75-89.
- Fang, X; Jost, R; Finnegan, PM; Barbetti, MJ. 2013. Comparative proteome analysis of the strawberry-*Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* pathosystem reveals early activation of defense responses as a crucial determinant of host resistance. Journal of Proteome Research 12(4):1772-1788.
- Golzar, H; Phillips, D; Mack, S. 2007. Occurrence of strawberry root and crown rot in Western Australia. Australasian Plant Disease Notes 2(1):145.
- Gordillo, A; Decock, C. 2017. *Cylindrocarpon*-like (Ascomycota, Hypocreales) species from the amazonian rain forests in Ecuador: additions to *Campylocarpon* and *Dactylonectria*. Cryptogamie Mycologie 38(4):409-434.

- Habibi, A; Gadheri, F. 2020. First record of *Dactylonectria macrodidyma* causing black root rot on strawberry. *Mycologia Iranica* 7:241-246.
- Henry, PM; Pincot, DDA; Jenner, BN; Borrero, C; Aviles, M; Nam, MH; Epstein, L; Knapp, SJ; Gordon, TR. 2021. Horizontal chromosome transfer and independent evolution drive diversification in *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. *New Phytologist* 230(1):327-340.
- Hofstetter, V; Buyck, B; Eyssartier, G; Schnee, S; Gindro, K. 2019. The unbearable lightness of sequenced-based identification. *s.l., s.e.*, 96:243-284 p. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13225-019-00428-3>
- Husaini, AM; Neri, D. 2016. Strawberry: growth, development and diseases. Massachusetts, USA, CAB International. 313 p.
- Hutton, DG; Gomez, AO; Mattner, SW. 2013. Macrophomina phaseolina and Its association with strawberry crown rot in Australia. *International Journal of Fruit Science* 13(1-2):149-155.
- INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censos). 2015. VI Censo Nacional Agropecuario: Cultivos agrícolas, forestales y ornamentales. 285 p.
- Jayawardena, RS; Hyde, KD; McKenzie, EHC; Jeewon, R; Phillips, AJL; Perera, R H; de Silva, NI; Maharachchikumbura, SSN; Samarakoon, MC; Ekanayake, AH; Tennakoon, DS; Dissanayake, AJ; Norphanphoun, C; Lin, C; Manawasinghe, IS; Tian, Q; Brahmanage, R; Chomnunti, P; Hongsanant, S; ...Wang, Y. 2019. One stop shop III: taxonomic update with molecular phylogeny for important phytopathogenic genera. *Fungal Diversity* 98(1):51-75.
- Jong Hee Shin; Sang Ku Lee; Soon Pal Suh; Dong Wook Ryang; Nam Ho Kim; Rinaldi, MG; Sutton, DA. 1998. Fatal *Hormonema dematioides* peritonitis in a patient on continuous ambulatory peritoneal dialysis: Criteria for organism identification and review of other known fungal etiologic agents. *Journal of Clinical Microbiology* 36(7):2157-2163. DOI: <https://doi.org/10.1128/jcm.36.7.2157-2163.1998>
- Koike, ST. 2008. Crown rot of strawberry, caused by *Macrophomina phaseolina*, in California. *Plant Dis.* 92:1253.
- Koike, ST; Gordon, TR; Daugovish, O; Ajwa, H; Bolda, M; Subbarao, K. 2013. Recent developments on strawberry plant collapse problems in California caused by *Fusarium* and *Macrophomina*. *International Journal of Fruit Science* 13(1-2):76-83.
- Lawrence, DP; Nouri, M; Trouillas, F. 2019. Taxonomy and multi-locus phylogeny of *Cylindrocarpon*-like species associated with diseased roots of grapevine and other fruit and nut crops in California. *Fungal Systematics and Evolution* 4:59-75.
- Leslie, J; Summerell, B. 2007. The *Fusarium* laboratory manual. Blackwell Publishing. 387 p.
- Li, C; Yang, J; Li, W; Sun, J; Peng, M. 2017. Direct root penetration and rhizome vascular colonization by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* are the key steps in the successful infection of Brazil Cavendish. *Plant Disease* 101(12): 2073-2078.
- Lombard, L; Merwe, A; Groenewald, JZ; Crous, PW; Lombard, L; Merwe, N; Groenewald, JZ; Crous, PW. 2014. Lineages in Nectriaceae: re-evaluating the generic status of *Ilyonectria* and allied genera. *Phytopathologia Mediterranea* 53(3):515-532.
- López-González, RC; Gómez-Cornelio, S; De la Rosa-García, SC; Garrido, E; Oropeza-Mariano, O; Heil, M; Partida-Martínez, LP. 2017. The age of lima bean leaves influences the richness and diversity of the endophytic fungal community, but not the antagonistic effect of endophytes against *Colletotrichum lindemuthianum*. *Fungal Ecology* 26:1-10.
- Pan, Y; Ye, H; Lu, J; Chen, P; Zhou, XD; Qiao, M; Yu, ZF. 2018. Isolation and identification of *Sydowia polyspora* and its pathogenicity on *Pinus yunnanensis* in Southwestern China. *Journal of Phytopathology* 166(6):386-395.
- Paynter, ML; Czislawski, E; Herrington, ME; Aitken, EAB. 2016. Differences in pathogenicity, genetic variability and cultivar responses among isolates of *Fusarium oxysporum* from strawberry in Australia. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 141(6):645-652.
- Paynter, ML; De Faveri, J; Herrington, ME. 2014. Resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* and predicted breeding values in strawberry. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 139(2):178-184.
- Pastrana, AM; Watson, DC; Gordon, TR. 2019. Transmission of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* through stolons in strawberry plants. *Plant Disease* 103(6):1249-1251.
- Rossmann, AY; Seifert, KA; Samuels, GJ; Minnis, AM; Schroers, H-J; Lombard, L; Crous, PW; Pöhlmaa, K; Cannon, PF; Summerbell, RC; Geiser, DM; Zhuang, W; Hirooka, Y; Herrera, C; Salgado-Salazar, C; Chaverri, P. 2013. Genera in Bionectriaceae, Hypocreaceae, and Nectriaceae (Hypocreales) proposed for acceptance or rejection (en línea). *IMA Fungus* 4(1):41-51. DOI: <https://doi.org/10.5598/imafungus.2013.04.01.05>
- Schoch, CL; Seifert, KA; Huhndorf, S; Robert, V; Spouge, JL; Levesque, CA; Chen, W; Bolchacova, E; Voigt, K; Crous, PW; Miller, AN; Wingfield, MJ; Aime, MC; An, KD; Bai, FY; Barreto, RW; Begerow, D; Bergeron, MJ; Blackwell, M; Boekhout, T; Bogale, M; Boonyuen, N; Burgaz, AR; Buyck, B; Cai, L; Cai, Q; Cardinali, G; Chaverri, P; Coppins, BJ; Crespo, A; Cubas, P; Cummings, C; Damm, U; de Beer, ZW; de Hoog, GS; Del-Prado, R; Dentinger, B; Diéguez-Uribeondo, J; Divakar, PK;

- Douglas, B; Dueñas, M; Duong, TA; Eberhardt, U; Edwards, JE; Elshahed, MS; Fliegerova, K; Furtado, M; García, MA; Ge, ZW; Griffith, GW; Griffiths, K; Groenewald, JZ; Groenewald, M; Grube, M; Gryzenhout, M; Guo, LD; Hagen, F; Hambleton, S; Hamelin, RC; Hansen, K; Harrold, P; Heller, G; Herrera, C; Hirayama, K; Hirooka, Y; Ho, HM; Hoffmann, K; Hofstetter, V; Högnabba, F; Hollingsworth, PM; Hong, SB; Hosaka, K; Houbraken, J; Hughes, K; Huhtinen, S; Hyde, KD; James, T; Johnson, EM; Johnson, JE; Johnston, PR; Jones, EBG; Kelly, LJ; Kirk, PM; Knapp, DG; Kõljalg, U; Kovács, GM; Kurtzman, CP; Landvik, S; Leavitt, SD; Ligenstoffer, AS; Liimatainen, K; Lombard, L; Luangsa-ard, JJ; Lumbsch, HT; Maganti, H; Maharachchikumbura, SSN; Martin, MP; May, TW; McTaggart, AR; Methven, AS; Meyer, W; Moncalvo, JM; Mongkolsamrit, S; Nagy, LG; Nilsson, RH; Niskanen, T; Nyilasi, I; Okada, G; Okane, I; Olariaga, I; Otte, J; Papp, T; Park, D; Petkovits, T; Pino-Bodas, R; Quaedvlieg, W; Raja, HA; Redecker, D; Rintoul, TL; Ruibal, C; Sarmiento-Ramírez, JM; Schmitt, I; Schüßler, A; Shearer, C; Sotome, K; Stefani, FOP; Stenroos, S; Stielow, B; Stockinger, H; Suetrong, S; Suh, SO; Sung, GH; Suzuki, M; Tanaka, K; Tedersoo, L; Telleria, MT; Tretter, E; Untereiner, WA; Urbina, H; Vágvolgyi, C; Vialle, A; Vu, TD; Walther, G; Wang, QM; Wang, Y; Weir, BS; Weiß, M; White, MM; Xu, J; Yahr, R; Yang, ZL; Yurkov, A; Zamora, JC; Zhang, N; Zhuang, WY; Schindel, D. 2012. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(16):6241-6246.
- Salazar, S; Bayas-Morejón, F; Niño, Z; Guevara, J; Ruilova, M; Merino, O; Donato, W; Guamán, J. 2018. Morphological and biochemical indicators of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae* in strawberry crops (*Fragaria x ananassa* Duch) in the province of Pichincha, Ecuador. *Agronomy Research* 16(4):1854-1861.
- Silva, AC; Henriques, J; Diogo, E; Ramos, AP; Bragança, H. 2020. First report of *Sydowia polyspora* causing disease on *Pinus pinea* shoots. *Forest Pathology* 50(1):27-30.
- Suga, H; Hirayama, Y; Morishima, M; Suzuki, T; Kageyama, K; Hyakumach, M. 2013. Development of PCR primers to identify *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. *Plant Disease* 97(5):619-625.
- Talgø, V; Chastagner, G; Thomsen, IM; Cech, T; Riley, K; Lange, K; Klemsdal, SS; Stensvand, A. 2010. *Sydowia polyspora* associated with current season needle necrosis (CSNN) on true fir (*Abies* spp.) *Fungal Biology* 114(7):545-554.
- Thambugala, KM; Ariyawansa, HA; Li, YM; Boonmee, S; Hongsanan, S; Tian, Q; Singtripop, C; Bhat, DJ; Camporesi, E; Jayawardena, R; Liu, ZY; Xu, JC; Chukeatirote, E; Hyde, KD. 2014. Dothideales. *Fungal Diversity* 68(1):105-158.
- Weber, RWS; Entrop, AP. 2017. *Dactylonectria torresensis* als wichtigste Komponente der Schwarzen Wurzelfäule an Erdbeeren und Himbeeren in Norddeutschland. *Erwerbs-Obstbau* 59(3):157-169.
- White T; Bruns S; Taylor J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In Innis, M; Gelfand DH; Sninsky, JJ; White, TJ (eds) *PCR Protocols: a guide to methods and applications*. Academic Press, Inc., New York, p. 315-322.
- Williamson, M; Fernández-Ortuño, D; Schnabel, G. 2012. First report of *Fusarium* Wilt of strawberry caused by *Fusarium oxysporum* in South Carolina (en línea). *Plant Disease* 96(6):911-911. DOI: <https://doi.org/10.1094/PDIS-02-12-0164-PDN>
- Winks, B; Williams, Y. 1965. A wilt of strawberry caused by a new form of *Fusarium oxysporum*. *Queensland Journal of Agricultural and Animal Science* 22:475-479.
- Yuan, H; Ling, X; Liu, T; Chen, T; Yang, Y; Yao, S; Zhang, B. 2014. Microscopic observations of strawberry plant colonization by a GFP-labelled strain of *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. *Canadian Journal of Plant Pathology* 36(4):501-508.
- Zúñiga, M. 2017. Producción de fresa. Llano Grande de Cartago. (Presentación Powerpoint PITTA-FRESA). San José, Costa Rica. 7 diapositivas. (en línea). Consultado 25 jun 2018. Disponible en http://www.snitta.org/web/pittas.php?p=32&s=PUBLICACIONES_PROYECTOS



Agronomía Costarricense. Universidad de Costa Rica. Se encuentra licenciada con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr

EVALUACIÓN DE METODOLOGÍAS PARA DETERMINAR LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICAS DE UN SUSTRATO DE FIBRA DE COCO

Freddy Soto-Bravo^{1/*}, Alejandro Betancourt-Flores²

Palabras clave: Cultivo sin suelo; capacidad de contenedor; capacidad de aireación; agua total disponible.

Keywords: Soilless crops; container capacity; aeration capacity; total available water.

Recibido: 03/11/2021

Aceptado: 22/02/2022

RESUMEN

Introducción. El incremento en la demanda de sustratos como medio de cultivo alternativo a suelos contaminados con complejos de fitopatógenos, plantea la necesidad de validar metodologías para la evaluación agronómica de sus características físicas y químicas. Aunque existen diferentes métodos, la falta de validación y homologación entre y dentro de países, dificulta el control de calidad de materiales nacionales e importados, lo que limita el éxito de cultivos en sustrato. **Objetivo.** Evaluar 3 distintas metodologías para determinar las características físicas de un sustrato de fibra de coco. **Materiales y métodos.** Se evaluaron los métodos de porómetro, contenedor “in situ” y caja de arena para determinar la densidad aparente (DA) y los porcentajes de componente sólido (CS), de humedad (θ) a capacidad de contenedor (θ_{CC}), de capacidad de aireación (CA) y de porosidad total (PT). Adicionalmente, la caja de arena permitió determinar los contenidos de humedad a diferentes potenciales mátricos desde θ_{CC} hasta punto de marchitez permanente (PMP). **Resultados.** Los valores de CA, θ_{CC} , PT y CS no fueron

ABSTRACT

Evaluation of methodologies to determine the physical characteristics of a coconut fiber substrate. Introduction. The increase in the demand for substrates as an alternative growing medium to soils contaminated with phytopathogen complexes, raises the need to validate methodologies for the agronomic evaluation of their physical and chemical characteristics. Although there are different methods, the lack of validation and standardization between and within countries makes it difficult to control the quality of national and imported materials, which limits the success of substrate crops. **Objective.** To evaluate 3 different methodologies for the evaluation of the physical characteristics of coconut fiber substrate. **Materials and methods.** The porometer, “in situ” container and sandbox methods were evaluated to determine apparent density (AD) and the percentages of solid component (SC), volumetric water content (θ) at container capacity (θ_{CC}), aeration capacity (AC) and total porosity (TP). Additionally, the sandbox method allowed determining moisture contents

* Autor para correspondencia. Correo electrónico: freddy.sotobravo@ucr.ac.cr

1 Universidad de Costa Rica, Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno, Alajuela, Costa Rica.
 0000-0003-1959-9597.

2 Universidad de Costa Rica, Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno, Alajuela, Costa Rica.
 0000-0002-7757-5967.

estadísticamente diferentes ($p>0,05$) entre métodos, y únicamente la DA fue ligeramente inferior ($p<0,05$) en el método del porómetro. Conforme incrementó la θ_{CC} desde 74,9% en el método de contenedor hasta 77,18% en la caja de arena, al mismo tiempo la CA tuvo un comportamiento inverso al disminuir desde 16,33% hasta 15,13%. Consecuentemente, la PT y el CS fueron similares entre métodos, con valores promedio de 91,67% y 8,47%, respectivamente. El método de caja de arena, a diferencia de los otros, permitió construir la curva de desorción de agua:aire y así determinar los contenidos de agua fácilmente disponible (AFD: 23,6%), de agua de reserva (AR: 2,3%) y de agua no disponible (AND: 49,9%). **Conclusión.** Todos los métodos permitieron determinar las características físicas de DA, CA, θ_{CC} , PT y CS de la fibra de coco. Los métodos de porómetro y contenedor “in situ”, presentan las ventajas de ser muy prácticos a un bajo costo, sin embargo, en comparación al método de caja de arena no permiten la elaboración de la curva de liberación de agua y aire y la determinación de los diferentes tipos de agua en el sustrato.

INTRODUCCIÓN

Un sustrato es todo material sólido distinto del suelo “in situ”, natural de síntesis o residual, mineral u orgánico, que colocado en un contenedor en forma pura o en mezcla, tiene funciones de anclaje radicular como sostén, protege las raíces y almacena el aire, el agua y los nutrientes necesarios para la planta (Ansorena 1994, Riviére y Caron 2001, Castro *et al.* 2019).

La aplicación excesiva o el déficit de agua en el sustrato afectan con igual magnitud el crecimiento del cultivo, el rendimiento y calidad de frutos. El exceso de riego favorece la contaminación ambiental con nitratos y metales pesados e incrementa los costos de producción. De aquí

at matric potentials from θ_{CC} to permanent wilting point (PWP). **Results.** The values of AC, θ_{CC} , TP and SC were not statistically different ($p>0.05$) between methods, and only DA was slightly lower ($p<0.05$) in the porometer method. As the θ_{CC} increased from 74.9% in the container method to 77.18% in the sandbox, and at the same time the AC had an inverse behavior decreasing from 16.33% to 15.13%. The PT and CS were very similar in the three methods, with average values of 91.67% and 8.47%, respectively. The sandbox method, unlike the others, made it possible to construct the water:air desorption curve and to determine the contents of readily available water (AFD: 23.6%), reserve water (AR: 2.3%) and water not available (AND: 49.9%). **Conclusion.** All the methods allowed to determine the physical characteristics of AD, AC, θ_{CC} , PT and CS of the coconut fiber. The “in situ” porometer and container methods have the advantages of being very practical at a low cost, however, compared to the sandbox method, they did not allow the elaboration of the water and air release curve and the determination of the different types of water in the substrate.

se desprende la premisa de que para una óptima nutrición del cultivo es indispensable realizar un manejo preciso del riego, para lo cual es imprescindible conocer las características físicas del sustrato (Chamindu Deepagoda *et al.* 2013a).

En cultivos sin suelo, antes de sembrar, es muy importante asegurarse que el sustrato tenga las características físicas óptimas, ya que una vez establecido no es posible mejorarlas. Por tanto, uno de los principales factores que determinan el éxito de un cultivo sin suelo es la calidad física del sustrato, lo cual permite una correcta dosificación y programación del riego y la nutrición del cultivo. Por el contrario, la mayoría de las propiedades químicas es posible enmendarlas. Por ejemplo, un exceso de sales se puede corregir

mediante lavado; altos o bajos niveles de uno o varios nutrientes puede solucionarse al ajustar las concentraciones en la solución nutritiva (Carlile *et al.* 2015).

En los últimos años a nivel mundial, el uso de sustratos para la producción agrícola ha incrementado sustancialmente, desde pequeños huertos familiares de autoconsumo hasta unidades productivas comerciales (Bracho *et al.* 2009). En algunos sistemas de producción convencional en suelo bajo invernadero, como es el caso de la fresa en Costa Rica, el mal manejo nutricional y fitosanitario del suelo trae como consecuencia su agotamiento nutricional y la contaminación con complejos fitopatógenos, lo que ha conllevado a un aumento en la aplicación de pesticidas, que, junto al monocultivo, promueve un círculo vicioso que agrava la problemática y hace imposible la producción. Lo anterior ha provocado que productores emigren hacia el cultivo hidropónico, quienes utilizan principalmente la fibra de coco como sustrato (González *et al.* 2015).

Para el cultivo de plantas sin suelo se pueden utilizar diferentes tipos de materiales importados como el peatmos y la fibra de coco o locales como arena, piedra pómez, carbón vegetal, fibra de coco y cascarilla de arroz, entre otros. Sin embargo, la variabilidad en cuanto a la naturaleza, el origen y la granulometría de los diferentes materiales, genera una alta inestabilidad en las propiedades físicas e hídricas tanto de materiales comerciales o como de los preparados en finca. El desconocimiento de las características físico-hídricas de los sustratos dificulta el manejo del riego, principalmente cuando se cambia a nuevos lotes de sustratos, ya que la variabilidad físico-hídrica dificulta la estandarización del volumen y la frecuencia de riegos. Por el contrario, un sustrato con una selección estandarizada de tamaños de partículas permite mayor estabilidad en las características físicas del sustrato, lo cual consecuentemente facilita el manejo del riego (Quesada y Méndez 2005, Ortega *et al.* 2016).

La necesidad de conocer las características físico-hídricas de un sustrato con el objetivo

de realizar un adecuado manejo del riego y por tanto de la nutrición de los cultivos sin suelo, crea la necesidad de contar con metodologías estandarizadas que permitan una correcta evaluación agronómica de estos. Por tal razón, en algunos países como por ejemplo la Unión Europea, se han estandarizado metodologías mediante la norma UNE-EN-13041 (2007) que permite una homologación de criterios entre países miembros para una correcta interpretación de la información técnica de materiales importados o locales.

La problemática actual es que, en Costa Rica, actualmente no existen metodologías validadas y homologadas, para evaluar las características físicas y así el control de calidad de sustratos agrícolas. Esto limita el éxito del cultivo sin suelo y hace que los productores incurran en pérdidas durante la curva de aprendizaje.

En este estudio se evaluaron 3 distintas metodologías para determinar las características físicas de un sustrato: i- el porómetro (Fonteno y Harden 2003), iii- la caja de arena y ii- un método local denominado contenedor "in situ". Diversos estudios han evaluado las características físicas mediante la comparación de diferentes tipos de sustratos (Cayosso-Rodríguez *et al.* 2018, Acuña *et al.* 2013, Castro *et al.* 2019, López-Baltazar *et al.* 2013), sin embargo, la variabilidad entre referencias metodológicas dificulta la estandarización y homologación de métodos. Por tanto, el objetivo del presente estudio fue evaluar 3 distintas metodologías para determinar las características físicas de un sustrato de fibra de coco, con el fin de disponer de metodologías alternativas sencillas y estandarizadas, para los productores de cultivos en sustratos.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la Estación Experimental Fabio Baudrit Moreno (EEFBM), ubicada en San José de Alajuela, Costa Rica (10° 01' N y 84° 16' W, 840 msnm), con valores promedios de precipitación anual, temperatura y humedad relativa de 1940 mm, 22°C y 78%, respectivamente.

Análisis granulométrico. Para realizar el análisis granulométrico se utilizó una columna de tamices (Geotech) que consta de un soporte plástico con escala porcentual (1 a 100), 4 frascos con sus respectivas cribas de $> 2,0$ mm (72 OPN), $> 1,0 - < 2,0$ mm (40 OPN), $> 0,5 - < 1,0$ mm (20 OPN) y $> 0,25 - < 0,5$ mm (9 OPN), respectivamente, y un último frasco que recoge las partículas finas de $< 0,25$ mm (Figura 1). Para el análisis granulométrico se utilizaron 8 repeticiones de la fibra de coco, que se colocaron en el primer cilindro con la criba de 2,0 mm, la cual se agitó manualmente hasta obtener la separación de partículas en cada uno de los 5 frascos. Seguidamente, se determinó para cada fracción de tamaño de partículas, la distribución porcentual en base a volumen ($v.v^{-1}$) según la escala del texturómetro. Además, cada fracción fue pesada por separado para determinar su distribución porcentual en base a peso ($p.p^{-1}$).

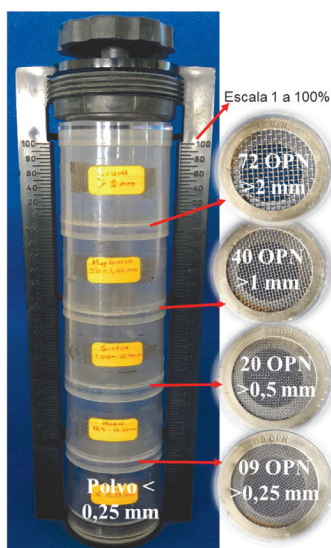


Figura 1. Columna de tamices formada por soporte plástico con escala porcentual (1 a 100) y 5 frascos con sus respectivas cribas, utilizado para determinar distribución de tamaños de partículas en sustratos.

Metodologías de análisis físico. Para determinar la DA, PT, CS, CA y el contenido de θ_{CC} se utilizaron 3 distintas metodologías: i- el porómetro, ii- el contenedor "in situ" y iii- caja de arena. La recolección de las muestras del sustrato de fibra de coco se realizó con el procedimiento de la norma europea UNE-EN 12579 (2000).

El porómetro. En este estudio se hizo una adaptación al método de North Caroline State University descrito por Fonteno y Harden (2003), el cual consistió en un recipiente plástico de aproximadamente 500 mL y con una proporción altura y diámetro 1:1. En la parte inferior del recipiente se hicieron 5 perforaciones, donde se insertaron microtubos (4 mm) sellados con silicón y con tapones de goma que permitieron cerrar y abrir los orificios (Figura 2a).

Se utilizaron 16 repeticiones colocadas cada una en su respectivo porómetro (Figura 2b). Seguidamente, se procedió a saturar con agua destilada hasta alcanzar la marca de aforo, cuando se observó el brillo metálico del agua (Figuras 2c, 2d), sin que haya excesos sobre la superficie del sustrato.

El proceso de saturación para cada repetición consistió en 3 ciclos de saturación y drenaje con agua destilada, con el fin de mejorar la capacidad de hidratación, desplazar burbujas de aire en el interior del sustrato y obtener una saturación más homogénea. Se cuantificó el peso del sustrato saturado e inmediatamente se quitaron los tapones de los agujeros ubicados en la base del porómetro para proceder a cuantificar el volumen de agua drenada (V_d) hasta cesar completamente el drenaje (Figura 2e). La duración del proceso de humectación y drenaje puede variar según la granulometría y tipo de material. Para el caso de la fibra de coco se presentó una duración de aproximadamente 30 minutos.

A cada porómetro se le midió el volumen a rellenar con sustrato (V_s : 350 mL) y se cuantificó su peso (g) sin sustrato (P_p) con una balanza analítica (BOECO, BPS 40 plus). Después de cesar el drenaje, se cuantificó el peso (g) del porómetro con sustrato húmedo (P_{pSh}). A continuación, las muestras de P_{pSh} se secaron en estufa a 105°C hasta alcanzar peso seco constante, para obtener así el peso del porómetro con sustrato seco

(P_{pSs}). Finalmente, se determinó el peso del sustrato húmedo (P_{Sh}) y el peso del sustrato seco (P_{Ss}) según las ecuaciones:

Ecuación 1

$$P_{Sh} (g) = [P_{pSh} (g) - P_p (g)]$$

Ecuación 2

$$P_{Ss} (g) = [P_{pSs} (g) - P_p (g)]$$



Figura 2. Recipiente plástico utilizado como porómetro con una proporción 1:1 de altura y diámetro (a), colocación de muestras en el recipiente (b), saturación de muestras (c), brillo metálico del agua (d) y recolección y medición de drenajes (e).

La DA, CA, θ_{CC} , PT y CS de la fibra de coco, se determinaron según el procedimiento descrito a continuación, según normas UNE-EN-13041 (2007). Para determinar el porcentaje de θ (V.V⁻¹) a diferentes potenciales mátricos, primero se determinó el contenido de humedad gravimétrica (g.g⁻¹) con la ecuación:

$$\theta_g = \frac{PSh(g) - PSs(g)}{PSs(g)}$$

Seguidamente se calculó el porcentaje de θ volumétrica como el producto de la θ_g por la DA por 100.

El porcentaje de CA se obtuvo al dividir el volumen drenado (Vd) entre el Vs según la ecuación:

$$CA = \frac{Vd(mL)}{Vs(mL)} \times 100.$$

La DA (g.cm⁻³) se obtuvo como el cociente entre el peso seco de sustrato (PSs) a 105°C y el volumen total de la muestra del sustrato (Vs) según la ecuación:

$$DA(g.cm^{-3}) = \frac{PSs(g)}{Vs(cm^3)}.$$

La DR se obtuvo por el método del picnómetro según Ansorena (1994), ya que dicho método considera únicamente la porosidad efectiva, la cual es un factor determinante para efectos de manejo del riego en los cultivos. Otros métodos como el de las cenizas, considera la

porosidad ocluida o cerrada, que no interfiere en la dinámica de desorción de agua y aireación en el sustrato.

Para el cálculo de la porosidad total se utilizó la Ecuación PT = (1 – DA.DR⁻¹) x 100, según la recomendación de Ansorena (1994). La DA depende de la granulometría y de la naturaleza del sustrato, mientras que la DR puesto que no considera el volumen de poros totales, depende básicamente del tipo y naturaleza de las partículas de material. Finalmente, el porcentaje CS fue obtenido como la resta entre 100 menos la PT.

Método de contenedor “in situ”. Este método es útil para evaluar DA, CA, θ_{CC} , PT y CS de un sustrato “in situ”, colocado directamente en el contenedor de cultivo antes de sembrar, independientemente del tipo de contenedor. Los orificios de drenaje en el fondo del contenedor de cultivo deben ser impermeabilizados o sellados temporalmente para poder saturar el sustrato.

En este estudio, el sustrato de fibra de coco tenía una presentación en tablas comprimidas, que una vez hidratadas alcanzaron dimensiones de 14,5 cm de alto por 13 cm de ancho y 100 cm de largo, para un volumen de 18,2 L, las cuales se colocaron en recipientes (repeticiones) de acero inoxidable con las mismas medidas. A cada contenedor se le realizaron 3 perforaciones en la parte inferior a un lado, donde se colocaron llaves de paso plásticas (1/2”) selladas en su base con silicón para evitar fugas. A cada contenedor se le midió el volumen real con agua (Vc) y se le cuantificó el peso sin sustrato (Pc) (Figura 3).



Figura 3. Recipiente metálico con sus respectivos drenajes (a) que contiene una tabla de fibra de coco saturada de un volumen aproximado de 18,2 L (b).

Se seleccionaron al azar 16 tablas de fibra de coco dentro de un lote de 408 tablas. A cada una se les removió el empaque plástico, se colocaron en el contenedor y se hidrataron mediante riegos cortos y frecuentes hasta alcanzar el tamaño equivalente al volumen de 18,2 L. Una vez hidratado el sustrato, se procedió al proceso de saturación, mediante el mismo procedimiento descrito para el porómetro, y se cubrió la superficie con plástico para evitar la evaporación de agua. Seguidamente, se determinó el peso del sustrato saturado (PSs). Posteriormente, se abrieron las llaves de drenaje y se midió el volumen drenado. A continuación, después de cesar el drenaje, se cuantificó el peso del contenedor con el sustrato húmedo (PcSh), las cuales se secaron en estufa a 105°C hasta peso constante, para obtener así el peso de contenedor con sustrato seco (PcSs). La determinación de la DA, DR, CA, θ_{CC} , PT y CS de la fibra de coco, se realizó por medio del mismo procedimiento descrito para el porómetro.

Método de caja de arena. Este método se basa en el principio de la dinámica hídrica en la planta, que extrae agua del sustrato mediante una succión o potencial mátrico (ψ_m), por medio de la columna de transpiración que fluye desde las raíces hasta las hojas en la interacción sustrato-planta-clima. Dicha dinámica hídrica puede ser representada a través de la curva de desorción de agua, al someter submuestras de sustrato a ψ_m crecientes, en las cuales se determina el contenido de θ respectivo.

Para ello se utiliza un equipo denominado “caja de arena” (Figura 4), compuesto por un reservorio con arena sílica, un depósito de agua destilada, tuberías internas interconectadas a una manguera transparente (12,5 mm) que funge

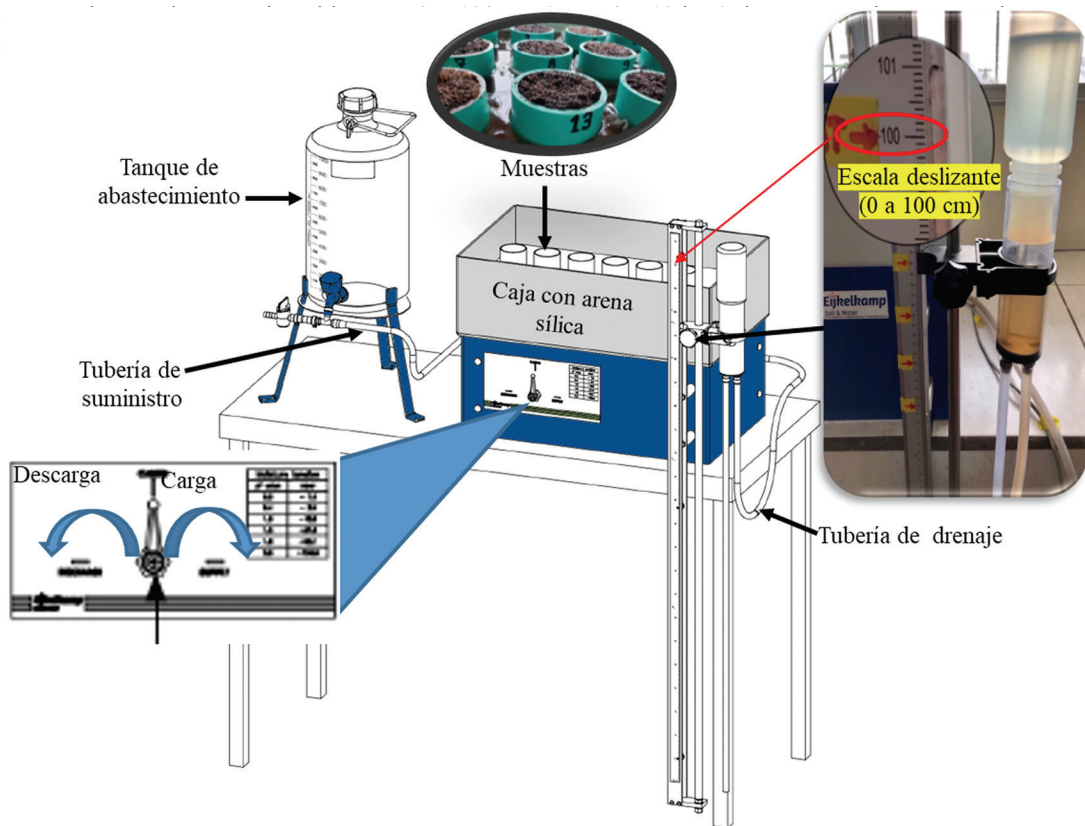


Figura 4. Equipo de “caja de arena” sílica, con una columna de agua ajustable (0-100 cm) que permite someter muestras de sustrato a diferentes succiones (ψ_m).

Para extraer las muestras de fibra de coco se utilizó un tubo metálico (52,5 mm) con bordes afilados (Figura 5a), el cual se hacía girar de forma circular y constante para cortar las fibras más largas y evitar su compactación y disturbación. La muestra se tomó horizontalmente en la parte media del perfil del sustrato (Figura 5b).

En este método se recolectaron 16 muestras de fibra de coco que se colocaron en cilindros estándar de 52,5 mm de diámetro y 46 mm de alto con un volumen de 97,691 mL, se enrasaron a la altura de cada cilindro con una navaja, y se cubrió con una malla 45 mesh sujeta con una liga en la base de los cilindros, para evitar la pérdida de

sustrato durante el pesado (Figura 5c). Los cilindros con las muestras se colocaron en una bandeja de plástico donde se realizaron 3 ciclos de saturación y drenaje (Figura 5d) para llenar los micro, meso y macroporos y así desplazar burbujas de aire. Finalmente, las muestras se dejaron con drenaje durante un periodo de 24 horas.

Después de saturar y drenar las muestras, se colocaron en la caja de arena, para hacer coincidir la columna de agua a 100 cm (10 kPa) con la altura media de los cilindros (23 mm) y se dejó estabilizar por una hora (Figura 6). Las succiones de la columna de agua de 0 a 100 cm se expresaron en kPa (10 a 100 cmca = 1 a 10 kPa).



Figura 5. Equipo de muestreo (a), toma de muestra (b), colocación de la muestra en el cilindro (c) y saturación de la muestra (d).

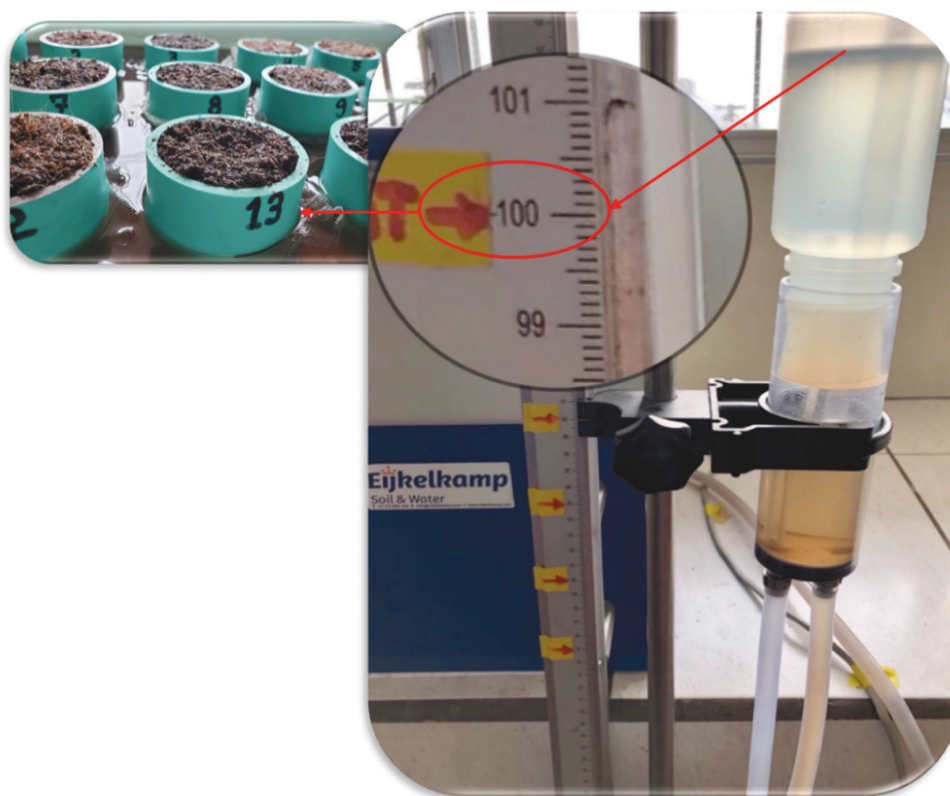


Figura 6. Estabilización de las muestras en la caja de arena, que coinciden con la columna de agua a 100 cm y la altura media de los cilindros.

Las muestras fueron progresivamente sometidas a 10 diferentes succiones (ψ_m): 0,25 kPa; 0,5 kPa; 1,0 kPa; 1,5 kPa; 2,0 kPa; 2,5 kPa; 3,0 kPa; 5,0 kPa; 7,5 kPa y 10 kPa, coincidente con un día por cada ψ_m para un periodo de evaluación de 10 días. Para cada ψ_m se utilizaron 16 repeticiones. Cada día las muestras se pesaban en una balanza analítica (BOECO, BPS 40 plus), se ajustaba la columna de agua al siguiente ψ_m y se dejaban en estabilización para al día siguiente volver a determinar el peso húmedo, y así sucesivamente hasta completar los 10 puntos de ψ_m a los 10 días.

Al finalizar el periodo de 10 días de pesado de las muestras de sustrato húmedo sometidas a las diferentes succiones, estas fueron secadas en estufa (105°C) hasta peso constante. Seguidamente se determinó la DA, PT, CS y los porcentajes de θ volumétrica (V.V⁻¹) de las muestras sometidas a las 10 diferentes ψ_m desde 2,5 hasta 10 kPa, con el procedimiento descrito para el porómetro. La CA para cada ψ_m se obtuvo a partir de la diferencia entre PT (saturado a 0 kPa) menos el respectivo contenido de θ en cada ψ_m .

Para determinar los distintos tipos de agua en el sustrato, se asumió que el contenido de θ a 1 kPa correspondió a la θ_{CC} y la θ a 10 kPa al punto de marchitez permanente (θ_{PMP}). Adicionalmente, para verificar si el contenido de θ a ψ_m de 1 kPa correspondió a la θ_{CC} del sustrato, se colocaron 6 cilindros con muestras de sustrato dentro de la caja de arena sin ser sometidas a succión, al evitar el contacto de las muestras con la arena sílica.

El agua fácilmente disponible (AFD) se obtuvo a partir de la resta entre θ_{CC} menos la humedad a 5 kPa (θ_5) mientras que el agua de reserva (AR) se estimó por la diferencia entre θ_5 menos θ_{PMP} . La sumatoria de AFD más el AR totalizan el agua total disponible (ATD) para la planta (ATD = AFD + AR).

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de homogeneidad y heterocedasticidad y si se cumplían dichos supuestos, se procedió

a realizar un análisis de varianza. Cuando se detectaron diferencias significativas entre métodos, se procedió a la prueba de medias de Tukey a un nivel de significancia de 0,05. Para los análisis se utilizó el programa estadístico InfoStat Di Rienzo *et al.* (2008).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Granulometría. El porcentaje acumulado de partículas gruesas según la escala porcentual de la columna de tamices basada en volumen (> a 2 mm) fue superior (54,2% v.v⁻¹) que la distribución basada en peso (28,1% p.p⁻¹; Figura 7). Consecuentemente, se presentó un comportamiento similar con el IG (tamaño > 1 mm), que fue mayor con base a volumen (80% v.v⁻¹) y menor en base a peso (55% p.p⁻¹).

El comportamiento anterior, probablemente se debió a que el sustrato es una mezcla de partículas granulares y fibras de diferente longitud que como mezcla tiene características propias. Sin embargo, al agitar el material y separar las fibras del material granular, estas por ser largas no atraviesan fácilmente los tamices y se quedan en la primera criba. Dicho comportamiento en cuanto a la variabilidad en la longitud de las fibrillas en sustratos a base de fibra de coco ha sido descrito por Sengupa y Basu (2016).

Al separar las fibras largas y el material granular en las diferentes cribas, la sumatoria de sus volúmenes individuales es mayor que cuando estos se encuentran en mezcla, debido al reacomodo de partículas de menor tamaño entre las fibras largas. Lo anterior sugiere que la distribución de partículas según escala de la columna de tamices (%V.V⁻¹), según el tipo de sustrato, puede ser una medición subjetiva y consecuentemente inducir a interpretaciones erróneas. Por tanto, en el caso particular de la fibra de coco, sería recomendable utilizar la distribución porcentual en base al peso de los diferentes tamaños de partículas que quedan en las cribas.

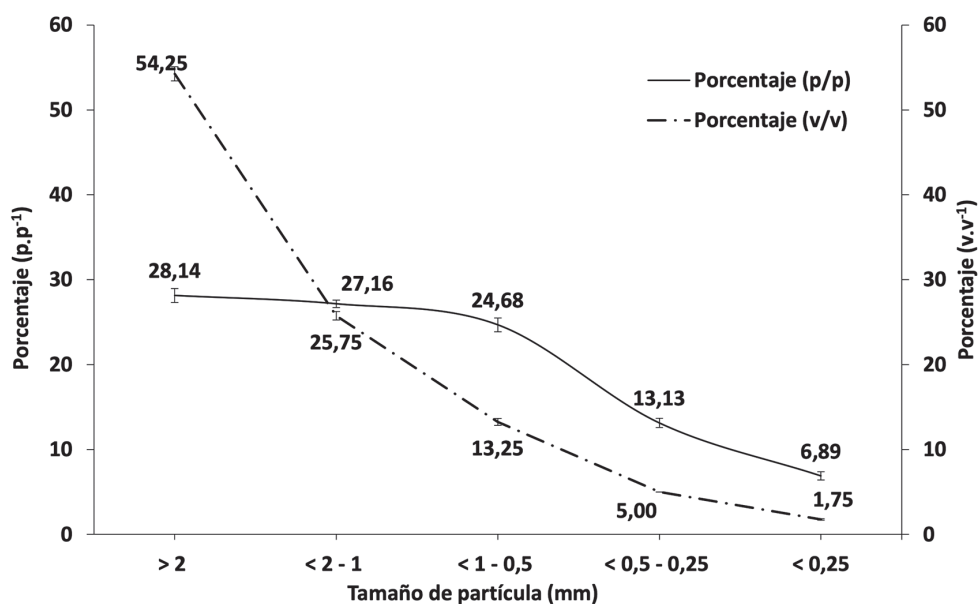


Figura 7. Distribución de tamaños de partículas en base a peso (%p.p⁻¹) y según escala del texturómetro (%v.v⁻¹) de un sustrato de fibra de coco (n = 8). Alajuela, Costa Rica.

Un IG alto, indica un mayor porcentaje de partículas gruesas que incrementa el contenido de macroporos y disminuye los microporos, lo que consecuentemente aumenta la CA y el drenaje, al disminuir la retención de θ . Por otra parte, un bajo IG implica mayor porcentaje de partículas finas lo cual afecta drásticamente la CA y aumenta la retención de agua hasta afectar las raíces por hipoxia (Vargas-Tapia *et al.* 2008).

Un IG de 55% (p.p⁻¹) en la fibra de coco, evidencia que hay un aceptable contenido de macroporos que le proveen una buena CA, aspecto importante para una adecuada oxigenación y el reacomodo de una gran masa de raíces en un contenedor con volumen reducido de sustrato, característico del sistema de cultivo sin suelo. Simultáneamente, una óptima CA favorece un adecuado drenaje de los aportes excesivos de agua. Sin embargo, aunque el IG permite visualizar la capacidad potencial de aireación y de drenaje del sustrato, este parámetro no permite conocer las cualidades hídrico-físicas tales como

la capacidad de retención de agua (θ_{CC}) y los diferentes tipos de agua (Gayosso-Rodríguez *et al.* 2018).

Otro parámetro que depende directamente de la granulometría es la capilaridad, la cual favorece el movimiento horizontal y vertical del agua que permite una distribución homogéneamente en todo el volumen del sustrato colocado en el contenedor. Para un sustrato grueso el agua aplicada drena por gravedad sin llegar a humedecer horizontalmente los bordes del sustrato; mientras que para un sustrato de una granulometría adecuada, la humedad se distribuye a lo ancho y profundo del contenedor para garantizar una buena uniformidad de humedecimiento y por tanto una buena colonización de las raíces en todo el volumen del sustrato (Martínez y Roca 2011).

Propiedades físico-hídricas. Los 3 métodos evaluados para el análisis físico del sustrato de fibra de coco, presentaron valores similares ($p < 0,05$) de Da, CA, CC, PT y CS, que a la vez fueron comparados con valores óptimos (Tabla 1).

Tabla 1. Valores promedio de las variables evaluadas con los 3 métodos de análisis de características físicas de sustratos. 2020, Alajuela, Costa Rica.

Característica física	Contenedor "in situ"	Porómetro	Caja de arena	Óptimo
Densidad aparente (DA= g.cm-3)	0,083 (a)	0,075 (b)	0,096 (a)	0,4 ¹
Capacidad de aireación (CA= %)	16,33 (a)	15,46 (a)	15,13 (a)	15–30% ²
Capacidad de contenedor (θ_{CC} = %)	74,98 (a)	75,56 (a)	77,18 (a)	55–70 ²
Porosidad total (PT= %)	91,32 (a)	91,03 (a)	92,25 (a)	>85% ²
Componente sólido (CS= %)	8,68 (a)	8,97 (a)	7,75 (a)	<15% ²

¹Abad *et al.* (1993), ²Ansorena (1994).

Únicamente, el método de caja de arena obtuvo una θ_{CC} ligeramente superior ($\pm 1,62\%$) a los otros métodos, pero sin diferencias estadísticas ($p > 0,05$), lo cual desde el punto de vista práctico no tendrían mayor efecto sobre el manejo del riego del cultivo. Las variaciones observadas pueden ser atribuidas a una mayor evaporación desde la superficie húmeda y expuesta de las muestras de sustrato en el porómetro y contenedor in “situ” donde la evaporación no es totalmente controlable. En la caja de arena al ser un sistema cerrado con tapa, la pérdida de agua por evaporación es mínima.

Por otra parte, deben tenerse en cuenta i- la forma y tamaño del contenedor y ii- la alteración de la estructura del sustrato al recolectar la muestra, ya que el potencial hídrico total (ψ_t) de un sustrato es la suma de ψ matricial de las partículas sólidas (ψ_m), ψ osmótico (ψ_o), ψ de presión (ψ_p) y ψ gravitacional (ψ_g). En un sustrato estabilizado después de cesar el drenaje, bajo condiciones atmosféricas y calidad de agua equivalente, el ψ_o y el ψ_p es similar en todas las muestras independiente de la forma del recipiente, mientras que, por el contrario, el ψ_g incrementa a mayor altura del contenedor (Fonteno 1993, Cannavo y Michel 2013).

Diferentes estudios han demostrado que la morfología del recipiente puede afectar la θ_{CC} (Arguedas *et al.* 2006, Gómez *et al.* 2019), debido al efecto de la gravedad sobre el contenido de agua en el perfil del sustrato conforme varía la forma del contenedor. Para un mismo tipo y

volumen de sustrato, hay un mayor ψ_g conforme incrementa la altura del sustrato en el contenedor, lo anterior se evidencia en un gradiente de mayor θ desde el estrato superior hacia las capas inferiores, hasta alcanzar una zona saturada en el estrato más bajo.

Dicha saturación ocurre debido a que, en el cultivo en contenedor, a diferencia de suelo, se corta la columna de agua al tener un límite del contenedor en la parte inferior. La altura del perfil saturado es prácticamente constante, por lo que al pasar de un contenedor alto y angosto a otro más bajo y ancho, el contenido de agua almacenada incrementa (Handreck y Black 2002).

En este estudio, la forma de los recipientes utilizados en cada uno de los 3 métodos probablemente tuvo poco efecto sobre los resultados de las propiedades físicas de los sustratos, ya que la proporción entre altura y ancho se mantuvo constante en 1:1. Sin embargo, es un factor esencial para considerar cuando se evalúan las características físicas de un sustrato, ya que puede inducir a errores importantes cuando al renovar un cultivo se cambia el tipo de contenedor.

Adicionalmente, es imprescindible tener un protocolo definido para la toma de la muestra, ya que una fuerte manipulación del sustrato puede afectar los parámetros físicos del sustrato. En el método de caja de arena al utilizar cilindros estándar (Eijkelpamp Soil & Water 2019), la recolección y posterior colocación de muestra en los cilindros, implica mayor manipuleo, lo que podría alterar la estructura del sustrato. En

el caso del contendor in situ, la tabla de coco comprimida se colocó entera en el contenedor y se hidrató sin manipular el sustrato.

La DR obtenida ($1,45 \text{ g.cm}^{-3}$) por el método del picnómetro (Ansorena (1994), relaciona el peso seco de las partículas sólidas con el volumen del CS de la fibra de coco, sin incluir, el volumen total de poros (macroporos + microporos + ultramicroporos), por lo cual es característica según la naturaleza del sustrato. El valor obtenido ($1,45 \text{ g.cm}^{-3}$) fue similar a otros valores para fibra de coco reportados por Abad *et al.* (1993) y Vargas-Tapia *et al.* (2008) y a otros valores reportados por la marca comercial (Fico) de las tablas de fibra de coco utilizadas en este estudio.

La DA representa la relación entre el peso seco y el volumen total del sustrato que incluye la PT y el CS. Los valores de DA de la fibra de coco evaluada fueron bajos, con variaciones leves ($p > 0,05$) desde $0,075 \text{ g.cm}^{-3}$ con el porómetro hasta $0,096 \text{ g.cm}^{-3}$ con la caja de arena (Tabla 1). Por tanto, indistintamente del método, los bajos valores de DA afectaron directamente la proporción entre PT y CS, que favoreció el incremento del contenido de macroporos ($>$ aireación) y una reducción en el CS. Además, valores bajos de DA, representan una ventaja desde el punto de vista práctico, ya que está directamente relacionada con un menor peso del sustrato, lo que facilita su manipulación durante el establecimiento del cultivo (Gayosso-Rodríguez *et al.* 2018), sobre todo cuando son grandes áreas de cultivo. Cabe mencionar que la DA obtenida mediante los 3 métodos fue muy similar a la reportada en otros estudios para este tipo de material orgánico (Rhie y Kim 2017).

Al ser un material liviano como consecuencia de una baja DA, no hubo diferencias estadísticas ($p > 0,05$) entre métodos en los valores de PT, CA y CS, con variaciones $< 1\%$ entre CA y de $< 1,5\%$ en PT (Tabla 1). Esto demuestra que los 3 métodos son fiables para evaluar dichas variables. La PT promedio de los 3 métodos (91,5%) incluyó el volumen total de poros (macroporos, mesoporos, microporos y ultramicroporos)

correspondientes a los componentes promedio de aireación (15,64%) y de agua (75,91%).

Cuando el sustrato alcanzó progresivamente la saturación, el aire que ocupaba los poros grandes entre partículas fue desplazado por el agua, la cual posteriormente drena por efecto de la gravedad mediante desalojo progresivo de los macroporos, y así nuevamente al aire pasa a ocupar dichos poros, hasta cesar el drenaje. En ese momento, el agua almacenada a capacidad de contenedor (θ_{CC}) en los mesoporos, microporos, ultramicroporos, alcanzó un promedio de 75,91%.

Para realizar un buen manejo del riego es importante el equilibrio entre capacidad de aireación y retención de agua, ya que facilita el manejo del riego y minimiza los efectos de aplicaciones deficientes o excesivas de agua. Para determinar esta relación, se utilizan la curva de liberación de aire-agua en el sustrato (Figura 8), la cual relaciona la succión de retención del agua (kPa) con el contenido de θ (%) en el sustrato (Soto 2018).

El dato de agua total almacenada en un sustrato (θ_{CC}) no es suficiente información para realizar un manejo eficiente del riego, y por tanto se requiere conocer su distribución en los diferentes tipos de agua. Al respecto, el método de caja de arena, comparado con los otros métodos, permitió construir la curva de desorción de agua y de aire del sustrato desde θ_{CC} (77,18%) hasta θ_{PMP} (52,35%) y con ello determinar los diferentes tipos de agua en el sustrato (Figura 2). De esta forma se obtuvo el AFD (23,62%) para la planta almacenada en los mesoporos, el AR (2,37%) que se aloja en los microporos y el AND (51,28%) para la planta retenida con alta succión en los ultramicroporos. Altos contenidos de AND se presentan en sustratos muy finos, los cuales, a pesar de retener mucha agua, la mayor parte no es disponible para la planta, aunado a una condición de hipoxia que induce a la muerte de las raíces (Drzal *et al.* 1999, Gayosso-Rodríguez *et al.* 2018).

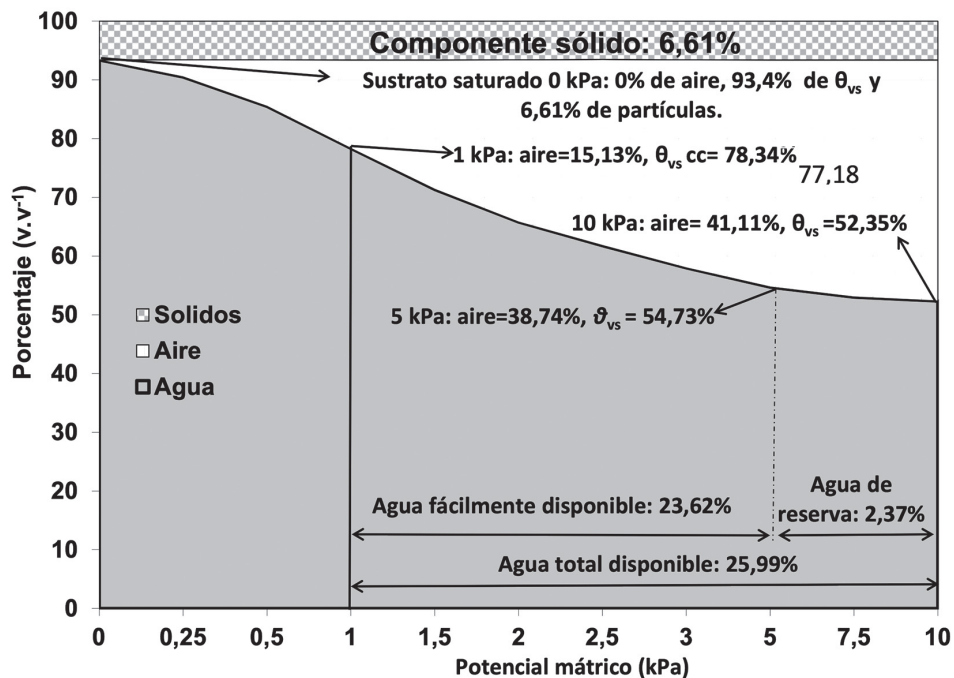


Figura 8. Curva de liberación de agua y aire de un sustrato de fibra de coco, evaluado mediante el método de "caja de arena". Alajuela, Costa Rica, 2020.

La θ_{CC} de la fibra de coco (77,18%, Figura 8) fue superior al rango óptimo (50 - 70%) según Ansorena (1994). El contenido de agua total disponible (ATD= 25,9%) para la planta, almacenada entre θ_{CC} (1 kPa) y θ_{PMP} (10 kPa) se distribuyó en AFD (23,6%= $\theta_{CC} - \theta_5$) y AR (2,37%= $\theta_5 - \theta_{10}$).

A continuación, se describe la dinámica de agua en la interacción sustrato-planta-atmósfera según una curva de liberación de θ y aire obtenido por el método de caja de arena (Figura 8). Durante el proceso de saturación del sustrato, el agua desplazó el aire que ocupa los espacios entre partículas (macroporos) hasta alcanzar la saturación completa. En este punto, el contenido de agua es equivalente a la PT (92,25%) y ocupó la totalidad de poros (macro, meso y microporos y ultramicroporos), por lo que la CA

es 0% mientras que el CS (7,75%) se mantuvo constante.

Posteriormente, inició el proceso de drenado por efecto del potencial gravitacional (ψ_g), el cual cesó a un ψ_m de 1 kPa, donde el total de agua que quedó almacenada correspondió a la θ_{CC} (77,18%) con una CA de 15,13%. La θ_{CC} del sustrato obtenida (77,18%) fue corroborada al colocar 4 muestras testigo dentro de la caja de arena, que drenaron libremente sin ser sometidas a succión al aislarlas del contacto directo con el lecho de arena sílica. Dichas muestras mantuvieron un contenido de θ ligeramente constante (77,18%) al final de los 10 días de evaluación, el cual fue muy similar al contenido de θ_{CC} obtenido en la fibra de coco (77,18%) con el método de caja de arena (Figura 9).

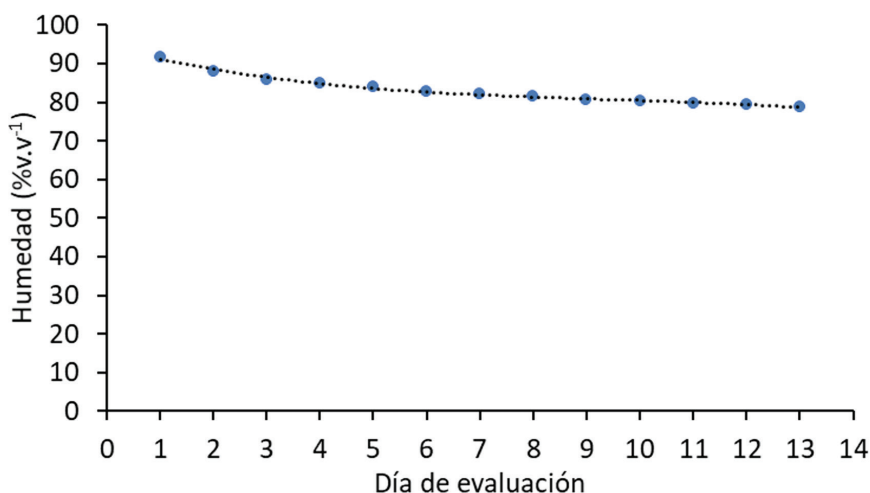


Figura 9. Evolución del contenido de humedad de muestras de sustrato de fibra de coco después de saturación y drenaje, sin someter a succión en el método de caja de arena (n= 6).

A partir de la descripción de la dinámica del agua según la Figura 8, una vez que el drenaje cesa y se estabiliza el contenido de θ en el sustrato a θ_{CC} (77,18%), las plantas para extraer agua al sustrato aplican una succión por medio del flujo de transpiración desde las raíces hasta las hojas. Después del amanecer, conforme incrementa la radiación solar aumenta progresivamente la demanda hídrica del cultivo y simultáneamente el sustrato se seca poco a poco como resultado de la extracción que realiza la planta. Conforme este proceso de transpiración y secado avanza durante el día, la planta paulatinamente tiene que ejercer cada vez mayor succión para abastecer el flujo de transpiración requerido. Si no se repone agua mediante el riego, el ψ_m con que las partículas sólidas retienen el agua aumenta gradualmente hasta alcanzar el PMP, en el cual el agua no es disponible para la planta (AND), ya que el ψ_m con que las partículas sólidas retienen el agua es superior al que la planta es capaz de ejercer para extraer agua del sustrato (Noguera *et al.* 2000, Martínez y Roca 2011, Gohardoust *et al.* 2020).

En el presente estudio, la θ_{CC} del sustrato (77,18%) fue ligeramente superior al máximo valor dentro del rango óptimo (70%) según

Ansorena (1994), del cual una alta proporción es AND (52,35%). Esto probablemente estuvo relacionado con el hecho de que este sustrato posee casi un 45% de partículas de tamaño inferior a 1 mm, de las cuales hay un 20% de partículas finas < a 0,5 mm. La fracción de tamaño de partículas comprendidas entre 0,1 y 1,0 mm es la más determinante en las propiedades físicas de los sustratos, lo cual consecuentemente se reflejó en una retención de θ ligeramente superior al óptimo (Prasad y Chualáin 2004, Anicua *et al.* 2009).

No obstante, aunque la θ_{CC} de la fibra de coco evaluada fue alta (77,18%), al mismo tiempo la CA (15,3%) fue óptima, ya que se mantuvo dentro de los rangos recomendados (15 a 30%) según Ansorena (1994). La CA (macroporos) es una característica esencial en un sistema de cultivos sin suelo, ya que el sistema radical tiene una alta demanda de oxígeno debido a una alta actividad metabólica y de crecimiento. Además, dicha propiedad es lo que permite que un gran volumen de raíces de una planta pueda acomodarse en un pequeño volumen de sustrato confinado en un pequeño espacio en contenedor (Abad *et al.* 2004, Chamindu Deepagoda *et al.* 2013b).

De acuerdo con lo investigado, cabe destacar que el paradigma de “sustrato ideal” es difícil de obtener, sin embargo, es aceptable afirmar que “no hay sustrato malo”, ya que si se conocen sus características físicas, se puede implementar una adecuada estrategia de manejo del riego adaptada a las características del sustrato y así evitar problemas derivados de déficit o de excesos de riego.

CONCLUSIONES

No hubo diferencias entre los métodos evaluados, en los valores de densidad aparente, capacidad de aireación, contenido de humedad a capacidad de contenedor, porosidad total y de componente sólido del sustrato de fibra de coco. Por tanto, cualquiera de estos métodos podría ser utilizado para determinar las características físicas de un sustrato. No obstante, los métodos de porómetro y contenedor “in situ” por su sencillez, practicidad y bajo costo serían muy recomendables para utilizar a nivel de finca. Sin embargo, estos no permiten la elaboración de la curva de liberación de agua y de aire y la determinación de los diferentes tipos de agua en el sustrato.

Por su parte, el método de caja de arena tiene la ventaja adicional de que permite construir la curva característica de desorción de agua y de aire y con ello determinar los diferentes tipos de agua en el sustrato. Esta información es útil para diseñar diferentes estrategias de manejo del riego, basado en la determinación del volumen de riego a partir de un porcentaje de agotamiento del agua total disponible.

AGRADECIMIENTO

Al técnico especializado Julio Vega por su valioso apoyo en el proceso de investigación.

LITERATURA CITADA

- Abad, M; Martínez, P; Martínez, M; Martínez, J. 1993. Evaluación agronómica de los sustratos de cultivo. *Actas Hort.* 11:141-154.
- Abad, M; Noguera, P; Carrión, B. 2004. Los sustratos en los cultivos sin suelo. *In* Urrestarazu, M (ed.). *Tratado de Cultivo Sin Suelo*. Madrid, España, Mundi-Prensa. p. 113-158.
- Acuña, RA; Bonachela, S; Magán, JJ; Marfà, O; Hernández, JH; Cáceres, R. 2013. Reuse of rockwool slabs and perlite grow-bags in a low-cost greenhouse: Substrates physical properties and crop production. *Elsevier B.V* 160(2):139-147. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.031>
- Anicua, SR; Gutiérrez, CMC; Sánchez, GP; Ortiz, SC; Volke, HVH; Rubiños, PJE. 2009. Tamaño de partícula y relación micromorfológica en propiedades físicas de perlita y zeolita. *Agric. Téc. Méx.* 35:147-156.
- Ansorena, MJ. 1994. *Sustratos. Propiedades y caracterización*. Madrid, España, Mundi Prensa. 167 p.
- Arguedas, F; Lea-Cox, J; Méndez, CH. 2006. Calibration of ECH20 Probe Sensors to Accurately Monitor Water Status of Traditional and Alternative Substrates for Container Production. *SNA Research Conference: Water Management* 51:501-505.
- Bracho, J; Pierre, F; Quiroz, A. 2009. Caracterización de componentes de sustratos locales para la producción de plántulas de hortalizas en el estado Lara, Venezuela (en línea). s.l., s.e. Consultado 23 oct. 2021. Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=85714162006>
- Cannavo, P; Michel, JC. 2013. Peat particle size effects on spatial root distribution, and changes on hydraulic and aeration properties. *Scientia Horticulturae* 151:11-21. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2012.12.021>
- Carlile, WR; Cattivello, C; Zaccheo, P. 2015. Organic Growing Media: Constituents and Properties. *Vadose Zone Journal* 14(6):2014.09.0125. DOI: <https://doi.org/10.2136/vzj2014.09.0125>
- Castro, S; Aldrete, A; López, J; Ordaz, V. 2019. Physical and chemical characterization of substrates based on pine bark and dust. *Madera y Bosques* 25(2):e2521520.
- Chamindu Deepagoda, TKK; Chen Lopez, JC; Møldrup, P; de Jonge, LW; Tuller, M. 2013a. Integral parameters for characterizing water, energy, and aeration properties of soilless plant growth media. *Journal of Hydrology* 502:120-127. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhydrol.2013.08.031>
- Chamindu Deepagoda, TKK; Møldrup, P; Tuller, M; Pedersen, M; Chen Lopez, JC; Wollesen de Jonge, L; Kawamoto, K; Komatsu, T. 2013b. Gas Diffusivity-Based Design and Characterization of Greenhouse Growth Substrates. *Vadose Zone Journal* 12(3):vzj2013.03.0061. DOI: <https://doi.org/10.2136/vzj2013.03.0061>
- Di Rienzo, JA; Casanoves, F; Balzarini, MG; Gonzalez, L; Tablada, M; Robledo, CW. 2008. *InfoStat*, versión

- 2008, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Drzal, MS; Fonteno, WC; Cassel, DK. 1999. Pore fraction analysis: A new tool for substrate testing. *Acta Hort.* 481:43-51.
- Eijkelkamp Soil & Water. 2019. Sandbox for pF-determination, User manual (en línea). s.l., s.e. 25 p. Consultado: 22 jun. 2021. Disponible en <https://www.eijkelkamp.com/producten/laboratorium-apparatuur/set-voor-pf-bepalingen.html>
- Fonteno, WC. 1993. Problems & considerations in determining physical properties of horticultural substrates. *Acta Horticulture* 342:197-204.
- Fonteno, WC; Harden, CT. 2003. Procedures for determining physical properties of horticultural substrates. En NCSU Porometer. Manual (en línea). Horticultural Substrate Laboratory, North Caroline State University, Raleigh, USA. Consultado: 18 jul. 2021. Disponible en https://projects.ncsu.edu/project/hortsublab/pdf/porometer_manual.pdf
- Gayosso-Rodríguez, S; Borges-Gómez, L; Villanueva-Couoh, E; Estrada-Botello, EA; Garruña, R. 2018. Caracterización física y química de materiales orgánicos para sustratos agrícolas. *Agrociencia* 52:639-652.
- Gohardoust, MR; Bar-Tal, A; Effati, M; Tuller, M. 2020. Characterization of physicochemical and hydraulic properties of organic and mineral soilless culture substrates and mixtures. *Agronomy* 10(9):1403. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy10091403>
- Gómez, A; Reyes, J; García, E; Pimentel, J; Silos, H. 2019. Efecto de la orientación y forma de contenedor sobre el crecimiento y desarrollo de chile ancho cultivado en invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 10(22):43-51. DOI: <https://doi.org/10.29312/remexca.v0i22.1857>
- González, L; Solís, N; Oses, M. 2015. Situación Actual del cultivo de fresa en la región Central Occidental. San Pedro de Poás de Desarrollo Rural. Alajuela, Costa Rica. p. 15.
- Handreck; KA; Black, N. 2002. Growing media for ornamental plants and turf. 3 ed. Australia, UNSW Press. 542 p.
- López-Baltazar, J; Méndez-Matías, A; Pliego-Marín, L; Aragón-Robles, E; Robles-Martínez, ML. 2013. Evaluación agronómica de sustratos en plántulas de chile 'onza' (*Capsicum annum*) en invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* (6):1139-1150.
- Martínez, P; Roca, D. 2011. Sustratos para el cultivo sin suelo. Materiales, propiedades y manejo (en línea). 1 ed. s.l., Editorial Universidad Nacional de Colombia. p. 37-77 Consultado 23 oct. 2021. Disponible en <https://www.researchgate.net/publication/237100771>
- Noguera, P; Abad, M; Noguera, V; Puchades, R; Maquieira, A. 2000. Coconut coir waste, a new and viable ecologically friendly peat substitute. *Acta Hort.* 517:279-288.
- Ortega, ML; Martínez, VC; Ocampo, MJ; Sandoval, CE; Pérez, AB. 2016. Efficiency of substrates in soil and hydroponic system for greenhouse tomato production. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 7(3):643-653.
- Prasad, M; Chualáin, D. 2004. Relationship between particle size and air space of growing media. *Acta Hort.* 648:161-166. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2004.648.19>
- Quesada, RG; Méndez, SC. 2005. Evaluación de sustratos para almácigos de hortalizas. *Agronomía Mesoamericana* 16(2):171-183.
- Rhie, YH; Kim, J. 2017. Changes in physical properties of various coir dust and perlite mixes and their capacitance sensor volumetric water content calibrations. *HortScience* 52(1):162-166. DOI: <https://doi.org/10.21273/HORTSCI11362-16>
- Rivière, LM; Caron, J. 2001. Research on substrates: state of the art and need for the coming 10 years. *Acta Horticulturae* 548:29-42. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2001.548.1>
- Sengupta, S; Basu, G. 2016. Properties of Coconut Fiber. In Saleem, H (ed.). Reference module in materials science and materials engineering. Oxford, Elsevier. p. 1-20.
- Soto, F. 2018. Parámetros para el manejo del agua en tomate y chile dulce hidropónico bajo invernadero. *Agronomía Costarricense* 42(2):59-73. DOI: <https://doi.org/10.15517/rac.v42i2.33779>
- UNE-EN-12579 (Una Norma Española -European Norm). 2000. Mejoradores de suelo y sustratos de cultivo. Toma de muestras. Madrid, España, Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR). 11 p.
- UNE-EN-13041 (Una Norma Española-European Norm). 2007. Mejoradores de suelo y sustratos de cultivo. Determinación de las propiedades físicas: densidad aparente seca, volumen de aire, volumen de agua, valor de contracción y porosidad total. Madrid, España, Asociación Española de Normalización y Certificación (AENOR). 24 p.
- Vargas-Tapia, P; Castellanos-Ramos, JZ; Sánchez-García, P; Tijerina-Chávez, L; López-Romero, RM; Ojodeagua-Arredondo, JL. 2008. Caracterización física, química y biológica de sustratos de polvo de coco. *Revista Fitotecnia Mexicana* 31(4):375-381. DOI: <https://doi.org/10.35196/rfm.2008.4.375>



EFFECTO DE LA INOCULACIÓN CON *Trichoderma* SOBRE EL CRECIMIENTO VEGETATIVO DEL TOMATE (*Solanum lycopersicum*)

Daniela Rodríguez-García^{1/*}, Jorge Vargas-Rojas²

Palabras clave: Promoción del crecimiento vegetal; *Trichoderma* spp; tallo; biomasa; nutrientes.

Keywords: Plant growth promotion; *Trichoderma* spp; stem; biomass; nutrient.

Recibido: 24/08/2021

Aceptado: 17/11/2021

RESUMEN

Introducción. *Trichoderma* spp. posee varios mecanismos para ayudar con la promoción del crecimiento de las plantas: síntesis de fitohormonas, producción de vitaminas, solubilización de nutrientes, aumento de la captación y translocación de nutrientes, mayor desarrollo de la raíz y aumentos en la tasa metabólica. **Objetivo.** Evaluar la promoción del crecimiento de las plantas de tomate inoculadas con cepas nativas e importadas de *Trichoderma* spp. tanto a nivel de invernadero como en campo. **Materiales y métodos.** El ensayo se realizó en invernadero y campo en setiembre del 2018, el suelo estaba infestado con *Fusarium oxysporum*. Se utilizaron cepas de *Trichoderma* spp., aisladas de productos comerciales (THU-01 y THC-02) y 2 cepas nativas (THM-03 y THM-04), se aplicaron los tratamientos con una concentración de 12×10^9 esporas.mL⁻¹ tanto a nivel de invernadero en maceteras y en campo, con un tratamiento testigo que era sin *Trichoderma*. En ambos experimentos se utilizó un diseño completamente aleatorizado con 5 repeticiones por tratamientos.

ABSTRACT

Effect of inoculation with *Trichoderma* on vegetative growth of tomato (*Solanum lycopersicum*). **Introduction.** *Trichoderma* has several mechanisms to help with the promotion of plant growth, these include: synthesis of phytohormones, production of vitamins, improved solubilization of nutrients, increased uptake and translocation of nutrients, better root development and increases in metabolism rate. **Objective.** To evaluate the growth promotion of tomato plants inoculated with native and imported strains of *Trichoderma* spp., at greenhouse level and in the field. **Materials and methods.** The trial was carried out at the greenhouse and field level in September 2018. Strains of *Trichoderma* spp. isolated from commercial products (THU-01 and THC-02) and 2 native strains (THM-03 and THM-04), treatments with 12×10^9 spores.mL⁻¹ both at the greenhouse level in pots and in the field, with a control treatment that was without *Trichoderma* spp. The following variables were evaluated: a) height (cm), b) root length (cm), c) dry biomass

* Autor para correspondencia. Correo electrónico: daniela.rodriguez@ucr.ac.cr

1 Universidad de Costa Rica, Laboratorio de Microbiología Agrícola, Área de Control Biológico, Centro de Investigaciones Agronómicas, San José, Costa Rica.
 0000-0003-0541-2488.

2 Universidad de Costa Rica, Liberia, Guanacaste, Costa Rica.

 0000-0002-1139-2148.

Se evaluaron las siguientes variables: a) altura (cm), b) longitud de raíz (cm), c) biomasa seca (g) y d) número de hojas. **Resultados.** Las plantas de tomate inoculadas con las diferentes cepas de *Trichoderma* spp., presentaron mayor cantidad de hojas, longitud de raíz, altura y biomasa. Las cepas *T. asperellum* y *T. asperelloides* fueron las que presentaron valores significativamente mayores en la mayoría de las variables evaluadas. **Conclusión.** Existen cepas nativas de la especie de *Trichoderma* que promueven el crecimiento vegetal de las plantas de tomate como llevar a mayor acumulación de biomasa, incremento de la altura, más longitud de raíz y número de hojas tanto a nivel de invernadero como en campo; donde la mejor fue la especie de *T. asperellum* (nativa); no obstante, se obtuvieron resultados similares con la especie importada *T. asperelloides*.

INTRODUCCIÓN

El uso de microorganismos multifuncionales en simbiosis con el cultivo es esencial para la intensificación sostenible de los sistemas agrícolas, estos microorganismos habitualmente habitan en la rizosfera de las plantas y mejoran la resiliencia de los sistemas de cultivos, ya que promueven el crecimiento de las plantas a través de mecanismos directos e indirectos y además incrementa la protección de las plantas contra patógenos e insectos (Rouphael *et al.* 2017, Lanna *et al.* 2021).

Muchas especies de *Trichoderma* han sido estudiadas como un potente agente de control biológico (Manandhar *et al.* 2019, Keswani *et al.* 2016, Das *et al.* 2019) o bioestimulante (Fernando *et al.* 2018); además, son importantes para aumentar crecimiento de las plantas (Sing *et al.* 2014), ya que tienen mecanismos de acción que son muy similares a las rizobacterias promotoras del crecimiento de las plantas (PGPR), tal como

(g) and d) number of leaves. **Results.** Tomato plants inoculated with the different strains of *Trichoderma* spp., showed a better development, by presenting a greater number of leaves, root length, height and biomass. The *T. asperellum* and *T. asperelloides* strains were the ones that presented significantly higher values in most of the variables evaluated. **Conclusion.** There are native strains of the *Trichoderma* species that promote plant growth in tomato plants such as leading to greater accumulation of biomass, increased height, longer root length and number of leaves both in the greenhouse and in the field; being the best the species of *T. asperellum* (native); however, similar results were obtained with the imported species *T. asperelloides*.

Trichoderma que puede influir positivamente en la germinación de las semillas, desarrollo y rendimiento de grano debido a su producción de sustancias que promueven el crecimiento y pueden mejorar la nutrición vegetal, debido principalmente a la solubilización de fósforo que sintetiza el ácido indol-acético (Chagas *et al.* 2016, Prasad *et al.* 2020).

Se ha observado que la fertilidad de los suelos tratados con algunas cepas de *Trichoderma* spp. se utilizan para el tratamiento de semillas y suprimen significativamente el crecimiento de microorganismos patógenos de las plantas, que mejora de esta manera, la tasa de crecimiento de las plantas (Sidiquee *et al.* 2017). El efecto podría ser particularmente fuerte en términos de promoción del crecimiento de raíces y de los tallos mediante el aumento en longitud, grosor, área foliar, contenido de clorofila, y rendimiento (tamaño o número de flores o frutas) (Ayyandurai *et al.* 2021). Estudios realizados con diferentes especies con *Trichoderma* tanto

a nivel de invernadero como de campo, en diferentes cultivos como pepino, frijol, berenjena, lechuga, pimiento y tomate (Gupta *et al.* 2014, Sani *et al.* 2020), maní (Ayyandurai *et al.* 2021) y el roble plateado (Umaschankar *et al.* 2012), entre otros.

Se han propuesto varios mecanismos para explicar la promoción del crecimiento de las plantas asociada a especies de *Trichoderma*, estas incluyen biosíntesis de metabolitos secundarios, lo cual incrementa su actividad antagonista contra hongos fitopatógenos y la capacidad de promover el crecimiento de las plantas (Ramírez *et al.* 2018), como por ejemplo, producción de enzimas como xylanasa, celulasa y glucanasa (Halifu *et al.* 2019); mayor solubilización de nutrientes del suelo, aumento de la absorción y translocación de nutrientes así como mejora en el desarrollo de la raíz, aumentos en la tasa del metabolismo de los carbohidratos, fotosíntesis y mecanismos de defensa de las plantas (Nascente *et al.* 2017).

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de cepas nativas e importadas de *Trichoderma* spp. sobre la promoción del crecimiento de las plantas de tomate tanto a nivel de invernadero como en campo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación

Invernadero. El ensayo se realizó en el invernadero del Laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica se inició en setiembre del 2018, de acuerdo con la producción del agricultor. Dentro del invernadero se mantuvieron temperaturas de 28-30°C con una humedad relativa constante entre 75-80%. En esta parte se inóculo el patógeno *Fusarium oxysporum*, para comparar los resultados con el ensayo de campo.

Campo. El ensayo se llevó a cabo en septiembre del 2018, en la Finca Guadalupe ubicada en Birrisito de Cartago (9.850294370330877,

-83.84484518660145), la cual tiene aproximadamente 2,80 hectáreas cultivadas con tomate del cultivar Mountain Fresh Plus (Estados Unidos) y según el historial de la finca ha presentado durante muchos años problemas con *Fusarium oxysporum*.

Aislamientos fúngicos. Se utilizaron cepas de *Trichoderma* spp., aisladas de productos comerciales una un producto importado de Estados Unidos (THU-01) y otra de Colombia (THC-02) y las nativas (THM-03 y THM-04), mediante el método de diluciones seriadas en caja Petri, para lo cual se tomó una muestra de 1 g del producto y se diluyó en 10 mL de agua destilada estéril hasta obtener diluciones de 10^{-2} y 10^{-3} . De la última dilución, se extrajo una alícuota de 0,1 mL y se distribuyó homogéneamente sobre una caja Petri que contenía medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA). Estas se incubaron a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ por 5-6 días en oscuridad y luego 4 días con luz día en una incubadora Digisystem DK-500. Se utilizaron 10 cajas Petri por cada producto comercial. Para la identificación se utilizó el método descrito por Gilchrist *et al.* (2005), y las claves de identificación propuestas por Samuels *et al.* (2013) (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos de *Trichoderma* spp. evaluados en suelo con *Fusarium oxysporum* y sembrados con plantas de tomate variedad Mountain Fresh Plus (US). San José, Costa Rica. 2015.

Tratamiento	Origen	<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Trichoderma</i> spp.
THU-01	Estados Unidos	F-01	<i>T. guizhouense</i>
THC-02	Colombia	F-01	<i>T. asperellum</i>
THM-03	Nativa	F-01	<i>T. asperelloides</i>
THM-04	Nativa	F-01	<i>T. guizhouense</i>
Testigo	-----	F-01	-

Además, se realizó la identificación de un patógeno que estaba presente en las plantas de tomate en campo, de la siguiente manera las

plantas se lavaron con agua corriente para eliminar el exceso de suelo presente en el tallo y raíz, de estos tejidos se hicieron disecciones de 0,5 cm de la zona de avance de la enfermedad, cada trozo se desinfectó con hipoclorito de sodio al 2,5% por 2 min y posteriormente, se realizó 4 enjuagues con agua destilada estéril. Luego, cada trozo se fraccionó en secciones de aproximadamente 0,25 cm y se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo papa dextrosa agra (PDA). Los aislamientos obtenidos se purificaron mediante la técnica de punta de hifa descrita por Chairman *et al.* (1978), la cual consiste en seleccionar la punta de una hifa solitaria, cortarla, y transferirla a una caja Petri. Se usó medio de cultivo Komoda (Komoda 1975), y se incubó por 2 o 3 días.

Las diferentes cepas obtenidas, se identificaron morfológicamente con base en el protocolo del Fusarium Research Center de la Universidad de Pennsylvania, desarrollado por Gilchrist *et al.* (2005) y las claves taxonómicas de Arikan *et al.* (2001), se identificó el patógeno como *Fusarium oxysporum* (F-01), no se identificaron las razas.

Ensayo a nivel de invernadero. El ensayo a nivel de invernadero, se realizó con plantas de tomate del cultivar Mountain Fresh Plus (US) (López 2017). Las semillas fueron sembradas en sustrato Peat Moss (70% retención de humedad) previamente esterilizado en bandejas de plástico negro con capacidad para 100 plántulas. La bandeja permaneció durante 3 días en un cuarto oscuro (sin luz) a temperatura ambiente para inducir la germinación y posteriormente, se trasladó al invernadero durante 21 días.

Luego, las plántulas fueron trasplantadas (25 DDS) a macetas de 375 cm³ de volumen, llenas con suelo de la Finca Guadalupe, ubicada en Birrisito de Cartago. El suelo con características de un Typic Hapludands identificado en el laboratorio del suelo y foliares del Centro de Investigaciones Agronómicas de la UCR, fue esterilizado a una temperatura de 121°C durante 60 min en una autoclave de uso industrial, por 2 días consecutivos, para eliminar la mayoría de organismos vivos.

Cada unidad experimental consistió en 8 macetas dispuesta en un arreglo fila-columna de 4 × 2. La separación entre filas fue de 30 cm y la separación de columnas fue de 30 cm.

Inoculación del microorganismo benéfico. Al día siguiente del trasplante de las plántulas de tomate a las macetas, se aplicaron los tratamientos con *Trichoderma* spp., para lo cual se distribuyó 20 mL de una suspensión de 12 × 10⁹ esporas.mL⁻¹ por maceta.

Ensayo a nivel de campo. Se realizó un almacigo igual que en el ensayo en invernadero. La unidad experimental consistió en 4 hileras de 10 m de largo. Las hileras tenían una separación de 1,2 con una distancia entre plantas de 0,5 m para un total de 40 plantas por unidad experimental.

Inoculación del microorganismo benéfico. La primera aplicación de *Trichoderma* spp. se realizó inmediatamente después de la siembra. Para esto, se diluyó 500 mL de una suspensión de 12 × 10⁹ esporas.mL⁻¹, en 17,5 L de agua y se aplicó a cada lote de cada tratamiento (4 L.lote⁻¹ aproximadamente), se utilizó el método convencional de aplicación con bomba de espalda de 18 L, dirigido al sistema radical, mediante un cubrimiento del suelo alrededor de las plantas de tomate. Las aplicaciones se repitieron cada 15 días durante el primer mes y luego una vez al mes por los 2 meses siguientes del cultivo según cada tratamiento.

Diseño del experimento. Tanto a nivel de invernadero, como a nivel de campo las unidades experimentales fueron dispuestas según un diseño completamente aleatorizado con 5 repeticiones por tratamiento.

Variables evaluadas. En ambos ensayos se evaluaron las siguientes variables: a) altura de planta (cm), b) longitud de raíz (cm), c) biomasa seca (g) y d) número de hojas (todos los folíolos de la hoja pinnada compuesta que tiene la plata de tomate). Las variables fueron analizadas a los 68 días después de sembradas las plantas (dds) de tomate para evaluar su etapa fisiológica vegetativa.

En el caso del ensayo de invernadero se analizaron todas las plantas de tomate de cada tratamiento. Mientras que, en el caso de las plantas de campo se tomó una muestra con el patrón de muestreo en zig-zag de 8 plantas de tomate por cada unidad experimental por cada tratamiento.

Análisis de datos

Análisis de varianza. Para contrastar la hipótesis de igualdad de medias poblacionales entre los distintos tratamientos, tanto en el experimento a nivel de invernadero, como en el campo, para cada variable se ajustó un análisis de varianza, con un nivel de significación (α) igual a 0,05, según el modelo que se especifica en la Ecuación 1. Para cada modelo ajustado se comprobó los supuestos mediante gráficos diagnósticos (cuantiles de términos del error, gráfico de residuos y gráfico de residuos vs predichos). En las variables donde existió diferencias significativas entre tratamientos se realizó una prueba de separación de medias con el procedimiento de la diferencia mínima significativa (DMS) de Fisher con un nivel de significación (α) igual a 0,05.

Ecuación 1

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Donde

y_{ij} = respuesta de la variable observada en la j-ésima unidad experimental del i-ésimo tratamiento

μ = media general de los tratamientos

τ_i = efecto del i-ésimo tratamiento

ε_{ij} = término de error aleatorio

Todos los procedimientos se realizaron con el programa estadístico Infostat versión 2020 (Di Rienzo *et al.* 2020).

Contrastes lineales. Como los tratamientos tuvieron una estructura que permitió agruparlos según el lugar de procedencia se realizaron

contrastes para contrastar la igualdad de medias de la variable respuesta según la procedencia de las cepas. Se realizaron 3 contrastes. El primero comparó la media de la cepa de Estados Unidos contra la media de las cepas nativas. El segundo comparó la media de la cepa de Colombia contra las medias de las cepas nativas. El tercero comparó la media de la cepa de Estados Unidos contra la media de la cepa de Colombia.

RESULTADOS

Todas las variables presentaron diferencia significativa ($p < 0,05$) en el ANDEVA, tanto a nivel de invernadero como a nivel de campo. Las medias y su separación, para ambos experimentos, se presentan en las Tablas 2 y 3.

Tabla 2. Medias y separación de medias para los tratamientos de *Trichoderma* spp. evaluados en condiciones de invernadero. San José, Costa Rica. 2018.

Tratamiento	Variable			
	NH	LR	A	BST
THM-03	27,9 ^A	40,0 ^A	105,3 ^A	70,0 ^A
THC-02	23,0 ^B	29,0 ^B	94,4 ^B	67,2 ^A
THM-04	18,7 ^C	12,9 ^D	74,5 ^C	52,7 ^B
THU-01	18,0 ^C	16,1 ^C	80,8 ^C	44,6 ^C
Testigo	11,7 ^D	10,9 ^E	40,0 ^D	19,7 ^D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$) según la diferencia mínima significativa de Fisher. NH= número de hojas, LR= longitud de raíz (cm), A= altura (cm), y BST= biomasa seca total (g).

THU-01= *T. guizhouense*-USA, THC-02= *T. asperellum*-Colombia, THM-03= *T. asperelloides*-CR y THM-04= *T. guizhouense*-CR./ Means with a common letter are not significantly different ($p > 0,05$) according to Fisher's least significant difference. NH= number of leaves, LR= root length (cm), A= height (cm), and BST= total dry biomass (g). THU-01= *T. guizhouense*-USA, THC-02= *T. asperellum*-Colombia, THM-03= *T. asperelloides*-CR and THM-04= *T. guizhouense*-CR.

Tabla 3. Medias y separación de medias para los tratamientos de *Trichoderma* spp. evaluados en condiciones de campo. Cartago, Costa Rica. 2018.

Tratamiento	Variable			
	NH	LR	A	BST
THM-03	116,0 ^A	90,1 ^A	175,9 ^A	204,5 ^A
THM-04	61,6 ^B	36,5 ^B	144,6 ^B	182,4 ^B
THC-02	59,9 ^C	48,8 ^B	141,5 ^C	231,5 ^C
THU-01	33,0 ^D	47,5 ^C	147,9 ^D	166,4 ^D
Testigo	31,1 ^E	17,2 ^D	78,0 ^E	133,6 ^E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p>0,05$) según la diferencia mínima significativa de Fisher. NH= número de hojas, LR= longitud de raíz (cm), A= altura (cm), y BST= biomasa seca total (g).

THU-01= *T. guizhouense*-USA, THC-02= *T. asperellum*-Colombia, THM-03= *T. asperelloides*-CR y THM-04= *T. guizhouense*-CR. / Means with a common letter are not significantly different ($p>0,05$) according to Fisher's least significant difference. NH= number of leaves, LR= root length (cm), A= height (cm), and BST= total dry biomass (g). THU-01= *T. guizhouense*-USA, THC-02= *T. asperellum*-Colombia, THM-03= *T. asperelloides*-CR and THM-04= *T. guizhouense*-CR.

Número de hojas. Con base en los resultados obtenidos en el ensayo de invernadero para la variable número de hojas por planta, se puede observar que no hubo diferencias significativas entre tratamientos que contenían la misma especie de *Trichoderma*, ya sea *T. guizhouense*, *T. asperelloides* o *T. asperellum*, pero sí entre especies, donde *T. asperelloides* y *T. asperellum* tienen, en promedio de medias, el mayor número de hojas por planta (THM-03 con 27,9 y 23,0 para THC-02) (Tabla 2).

Por el contrario, en el ensayo a nivel de campo al evaluar las diferentes variables en cada uno de los tratamientos a los 68 dds se observaron diferencias significativas ($p<0,05$), en el número de hojas, destacándose el tratamiento THM-03 como el mejor, con un promedio de medias de 116 hojas, mientras que los demás obtuvieron 61,6 THM-04; 59,9 THC-02; 33,0 THU-01 y el

testigo con la menor cantidad de hojas por planta (promedio de medias 31,1) (Tabla 3).

Longitud de raíz. En el caso de la longitud de raíz (Tabla 2) a nivel de invernadero, las plantas tratadas con la cepa nativa *T. asperelloides* (THM-03) mostraron una longitud de raíz significativamente mayor (promedio de medias 40,0 cm) en comparación con la cepa de Colombia que obtuvo un 29,0 cm de longitud. Además, las 2 cepas de *T. guizhouense* (THU-01 y THM-04) obtuvieron en promedio de medias 16,1 cm y 12,9 cm respectivamente de longitud de raíz. Hubo diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo.

No obstante, en cuanto al ensayo a nivel de campo la variable longitud de raíz, se mantuvo una mayor longitud radical con el tratamiento THM-03 con un promedio de medias de 90,1 cm; mientras que los demás tratamientos obtuvieron 47,5 cm THU-01 (*T. guizhouense*-USA), 36,5 cm THM-04 (*T. guizhouense*-CR) y 48,8 cm THC-02 (*T. asperellum*) y el testigo 17,2 cm de longitud de raíz en promedio de medias (Tabla 3).

Altura. En la variable altura de planta del ensayo a nivel de invernadero (Tabla 2), el tratamiento THM-03 de *T. asperelloides* (cepa nativa) presentó la mayor altura de las plantas con un promedio de medias de 105,3 cm, seguida por la cepa de Colombia (THC-2) con un 94,4 cm. Los 2 tratamientos con *T. guizhouense* (THU-1 y THM-4) mantuvieron en promedio de medias de altura muy similares: 80,8 cm y 74,5 cm, mientras que el tratamiento testigo fue el que mostró una menor altura con un promedio de medias de 40,0 cm, lo que evidencia que sí existieron diferencias significativas ($p<0,05$) entre las plantas de tomate que son tratadas con las diferentes especies de *Trichoderma*.

A nivel de campo en comparación al ensayo de invernadero se mantiene en la variable altura (Tabla 3), ya que el tratamiento THM-03 obtuvo la mayor altura de las plantas en comparación con los demás tratamientos y el testigo, aspecto que evidencia que sí existen diferencias significativas ($p<0,05$) entre las plantas de tomate que son tratadas con las diferentes especies de

Trichoderma. Las plantas de tomate de los diferentes tratamientos mostraron, en su mayoría, una mejor apariencia en el desarrollo y vigor en comparación con las plantas testigos.

Biomasa seca. Para la biomasa seca total por planta (Tabla 2), hubo diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los tratamientos y el testigo. Los pesos secos elevados se obtuvieron con los tratamientos que contenían *T. asperellum* (THC-02) y *T. asperelloides* (THM-03) con 70,50 g y 64,80 g en promedio, mientras que los tratamientos THU-01 y THM-04 (*T. guizhouense*) presentaron en promedio 43,50 g y 51, 80 g y el testigo con el menor promedio de biomasa seca (20,30 g).

Sin embargo, a nivel de campo se evaluó la biomasa seca total por planta (Tabla 3), donde se observan diferencias significativas ($p < 0,0001$) entre los tratamientos y el testigo. Los mayores pesos secos se obtuvieron con los tratamientos que contenían *T. asperellum* (THC-02) y *T. asperelloides* (THM-03) con 231,5 g y 204,5 en promedio de medias, mientras que, los tratamientos THU-01 y THM-04 (*T. guizhouense*) presentaron en promedio de medias 166,4 g y 182,4 g y el testigo con el menor promedio de medias de biomasa seca (133,6 g), diferenciándose así, los

ensayos de campo e invernadero en cuanto al comportamiento de algunas de las cepas de *Trichoderma* con referencia al testigo.

En cuanto a los análisis realizados de contrastes de las medias de las variables según la procedencia de las cepas a nivel de invernadero (Tabla 4), se observó que existe diferencia significativa entre la cepa de *Trichoderma* importada de Estados Unidos (THU-01) y las nativas (THM-03 y THM-04), con los promedios de las cepas nativas siempre mayores para todas las variables analizadas como número de hojas, largo de raíz, altura y biomasa seca. Por ejemplo, en el número de hojas en promedio las cepas nativas tuvieron 5,26 hojas más que la cepa de Estados Unidos, al comparar las nativas con la colombiana se observó que en promedio tuvo 0,06 hojas más y por último, la cepa de Colombia en promedio tuvo 5,2 hojas más que la cepa de estados Unidos. Sin embargo, se observó que la cepa colombiana (THC-02) mostró en el resto de variables mejores resultados que las cepas nativas. En cuanto al largo de raíz THC-02 tiene en promedio 2,29 centímetros (cm) más que las cepas nativas. En el caso de la altura en promedio fue 4,52 cm con respecto a las nativas y el promedio de la biomasa fue 6,13 gramos más.

Tabla 4. Contrastes y estadísticos asociados para las variables evaluadas en condiciones de invernadero. San José, Costa Rica. 2018.

Variable	Contraste	EST	EE	F	gln	gld	p-valor
NH	USA vs Nativas	-5,26	0,79	44,53	1	20	0,0001*
	Colombia vs Nativas	-0,06	0,79	0,01	1	20	0,9402
	USA vs Colombia	-5,2	0,86	36,27	1	20	0,0001*
LR	USA vs Nativas	-10,43	1,16	80,14	1	20	0,0001*
	Colombia vs Nativas	2,29	1,11	4,29	1	20	0,0531
	USA vs Colombia	-12,72	1,48	74,17	1	20	0,0001*
A	USA vs Nativas	-9,09	4,55	3,99	1	20	0,0612
	Colombia vs Nativas	4,52	2,3	3,86	1	20	0,0652
	USA vs Colombia	-13,61	4,27	10,16	1	20	0,0051*
BST	USA vs Nativas	-16,73	2,48	45,63	1	20	0,0001*
	Colombia vs Nativas	6,13	2,48	6,12	1	20	0,0235*
	USA vs Colombia	-22,85	2,71	70,99	1	20	0,0001*

*Diferencia significativa entre medias ($p < 0,05$), EST = diferencia promedio estimada, EE = error estándar de la diferencia de medias, F = valor del estadístico F calculado, gln = grados de libertad del numerador, gld = grados de libertad del denominador/ * significant difference between means ($p < 0,05$), EST = estimated mean difference, SE = standard error of the difference of means, F = calculated F value, gln = numerator degrees of freedom, gld = denominator degrees of freedom.

Por su parte, los análisis realizados de contrastes de las medias de las variables según la procedencia de las cepas a nivel de campo (Tabla 5), demostraron que en promedio las cepas nativas presentaron más cantidad de hojas,

así como centímetros de largo de raíz y altura con respecto a las otras 2 cepas importadas, a excepción de la biomasa seca total pues en promedio la cepa colombiana tuvo 38,03 gramos más que las cepas nativas.

Tabla 5. Contrastes y estadísticos asociados para las variables evaluadas en condiciones de campo. Cartago, Costa Rica. 2018.

Variable	Contraste	EST	EE	F	gln	gld	p-valor
NH	USA vs Nativas	-55,8	0,49	13099,9	1	20	0,0001*
	Colombia vs Nativas	-28,9	0,52	3045,84	1	20	0,0001*
	USA vs Colombia	-26,9	0,24	12447,8	1	20	0,0001*
LR	USA vs Nativas	-15,83	1,22	169,62	1	20	0,0001*
	Colombia vs Nativas	-14,56	0,75	381,17	1	20	0,0001*
	USA vs Colombia	-1,27	1,17	1,17	1	20	0,2925
A	USA vs Nativas	-12,87	0,86	222,47	1	20	0,0001*
	Colombia vs Nativas	-18,71	0,62	908,19	1	20	0,0001*
	USA vs Colombia	5,84	0,84	47,81	1	20	0,0001*
BST	USA vs Nativas	-27,09	1,4	374,92	1	20	0,0001*
	Colombia vs Nativas	38,03	1,82	437,3	1	20	0,0001*
	USA vs Colombia	-65,12	1,55	1754,91	1	20	0,0001*

*Diferencia significativa entre medias ($p < 0,05$), EST = diferencia promedio estimada, EE = error estándar de la diferencia de medias, F = valor del estadístico F calculado, gln = grados de libertad del numerador, gld = grados de libertad del denominador/ * significant difference between means ($p < 0,05$), EST = estimated mean difference, SE = standard error of the difference of means, F = calculated F value, gln = numerator degrees of freedom, gld = denominator degrees of freedom.

Además, los resultados de invernadero y campo mantuvieron los mismos resultados de contraste entre las cepas, y se reportan como las mejores las cepas nativas en la mayoría de variables y solo en el caso de la biomasa seca total la cepa colombiana en promedio fue mejor.

DISCUSIÓN

En los ensayos tanto a nivel de campo como en invernadero en los resultados de biomasa seca total y altura de las plantas de tomate, se obtuvo como mejores tratamientos los de *T. asperellum* (THC-02) y *T. asperelloides* (THM-03), aunque en la variable altura la mayoría de los tratamientos estuvieron muy similares en tamaño. Se ha demostrado que las aplicaciones de *Trichoderma* spp. llevan a incrementos de peso seco, el almidón, el azúcar total y soluble y a reducir el contenido de azúcares solubles en las hojas de diferentes plantas (Adams *et al.* 2007, Lamba *et al.* 2008, Shores y Harman 2008 a y b, Shores *et al.* 2010). El nivel de promoción del

crecimiento inducido por las cepas de *Trichoderma* puede ser bastante sustantivo; por ejemplo, con la cepa THM-03 se logró un mayor promedio de biomasa total en comparación con las demás cepas (USA-nativas). Es por ello, que un método para aumentar la eficiencia de fertilizantes químicos y disminuir la cantidad de fertilizantes aplicados en la producción agrícola es el uso de microorganismos que promueven el crecimiento de las plantas (Spolaor *et al.* 2016).

Al comparar los resultados de biomasa tanto a nivel de invernadero como campo con los obtenidos por Silva *et al.* (2020) en su estudio realizado con soya donde las plantas tratadas con un conjunto de *T. asperellum*, mostraron una biomasa de raíces significativamente mayor que las plantas control. Adicionalmente, en el estudio realizado por Zhang *et al.* (2018) en el cultivo de pastos determinó que el biofertilizante de *Trichoderma* (9000 kg.ha⁻¹) efectivamente regula la química del suelo y las comunidades microbianas, ya que impulsa sustancialmente la biomasa vegetal aérea en comparación con

otros fertilizantes orgánicos que no contienen *Trichoderma*.

Varios estudios han demostrado que diversas cepas de *T. harzianum* presentan la habilidad de promover el crecimiento de las plantas, a través del incremento en la absorción de nutrientes, que estimulan los factores de crecimiento tales como IAA y GA3 y disminuyen los niveles de etileno debido a la colonización de la raíz (Prasad *et al.* 2017, Harman 2011). El incrementar los niveles de IAA y GA3 es un mecanismo directo por el cual, los agentes biocontroladores promueven el crecimiento de las raíces, el tallo y el área foliar en plantas de tomate (Olowe *et al.* 2022).

En ambos ensayos con las plantas de tomate inoculadas con diferentes cepas de *Trichoderma* en el caso de la longitud de raíz, las plantas tratadas con la cepa nativa *T. asperelloides* (THM-03) mostraron una longitud de raíz significativamente mayor en comparación con los demás tratamientos. La inoculación de las raíces de plantas con *Trichoderma* resulta en cambios en el desarrollo de las mismas, tales como raíces profundas, más robustas y una mayor cantidad de raíces secundarias, lo cual proporciona un mayor volumen de suelo para la absorción de nutrientes (Shores *et al.* 2010), lo cual puede deberse a que ciertas especies de *Trichoderma* poseen una estrecha asociación con las raíces de las plantas o son endófitos comunes de estas (Olowe *et al.* 2022).

La estimulación de crecimiento y los incrementos en productividad de cultivos asociados a inoculaciones con *Trichoderma* se han observado en un amplio número de especies de plantas como clavel, rábanos, tomate, lechuga, maíz, maní y frijol, entre otros (Gravel *et al.* 2007, Hoyos 2011, Gupta *et al.* 2014, Ayyandurai *et al.* 2021). Se ha encontrado que aislamientos de *Trichoderma* contribuyen al crecimiento longitudinal de las raíces de maíz y algunos pastos, que hacen que estos cultivos sean más resistentes a la sequía y enfermedades, además, se ha observado que, en el caso del maíz, requiere un 40% menos de fertilizantes nitrogenados en relación con las plantas que no están inoculadas

(testigo) (Harman *et al.* 2004). La inoculación de plantas de tomate con *T. harzianum* cepas FCCT 16 y FCCT 199-2, en particular aumentaron significativamente el peso fresco de la raíz y las plantas inoculadas con FCCT 16 mostraron el mayor porcentaje de crecimiento de la raíz, además, se señaló que todas las plantas inoculadas mostraron mayor proliferación de raíces laterales en comparación con las plantas testigo (Bader *et al.* 2020).

Existe evidencia de la capacidad de especies de *Trichoderma* para promover el crecimiento de las plantas, como *T. asperellum* que se ha descrito el modo de acción que es proveer salud y mayor productividad (Calin *et al.* 2019) y en el caso de *T. harzianum* los modos de acción sería mediante inducción del crecimiento temprano de las plantas (Eltlbany *et al.* 2019), incrementar la germinación de semillas de tomate y producir ácido harzianico (Vinale *et al.* 2013), además de promover la producción de hormonas en las plantas para el crecimiento de raíces y tallos (Cai *et al.* 2015). Por ejemplo, en el ensayo con plantas de maíz dulce a nivel de invernadero con la cepa de *Trichoderma* T22 se obtuvo un aumento en el crecimiento de raíces y brotes con un promedio del 66% mayor que el tratamiento testigo (Bjorkman *et al.* 1998). Al igual que en otro estudio de Zachow *et al.* (2010), *Trichoderma velutinum* GI/8 aplicado como suspensión de esporas a plántulas de lechuga, mostró aumentos significativos en la longitud de la raíz, el área de la hoja, longitud y peso en comparación con el control no tratado.

Las plantas de tomate que se inocularon con las diferentes cepas de *Trichoderma* mostraron un mayor desarrollo, ya que presentaron una cantidad de hojas significativamente mayor que el tratamiento testigo. Se observó que en el caso del ensayo en invernadero los tratamientos que contenían la misma especie de *Trichoderma* no se diferenciaron, pero sí entre especies ya sea *T. guizhouense* (THU-01 y THM-04), *T. asperelloides* o *T. asperellum*, donde *T. asperellum* (THC-02) y *T. asperelloides* (THM-03) tienen en promedio, el mayor número de hojas

por planta, sin embargo, un aspecto importante es que las cepas nativas presentaron para todas las variables valores mayores. Por el contrario, en el ensayo de campo el tratamiento THM-03 (*T. asperelloides*) mostró una mayor cantidad de hojas en comparación con todos los demás tratamientos. Si comparamos con los resultados obtenidos por Sani *et al.* (2020) con plantas de tomate donde con el tratamiento T4 (Carbón + *Trichoderma* + 50% dosis de N-P-K) a los 60 días del cultivo obtuvo la mayor cantidad de hojas por planta en promedio de 71,38 con una altura promedio de 112,75 cm, con la reducción del 50% de la aplicación de fertilización química.

Se ha demostrado que las aplicaciones de *Trichoderma* spp. llevan a incrementos en el peso seco, en los contenidos de almidón, azúcar total y soluble y a reducir el contenido de azúcar en las hojas de diferentes plantas (Friedman *et al.* 2019, Lamba *et al.* 2008, Shores y Harman 2008 a y b, Shores *et al.* 2010). Estudios realizados por Li *et al.* (2018), mostraron que la cepa CHF 78 de *T. asperellum* puede reducir la severidad del marchitamiento de plantas de tomate por *Fusarium* sp. y promover el crecimiento de las plantas, lo que se puede atribuir a su capacidad para solubilizar $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ y producir celulasas, sideróforos, IAA, proteasas y quitinasas. Del mismo modo, *Trichoderma longipile* y *Trichoderma tomentosum* aumentó el área foliar entre un 58% a un 71%, el peso seco en los brotes (91-102%) y peso seco de la raíz (100-158%) de plántulas de repollo en ensayos de invernadero (Rabeendran *et al.* 2000).

El potencial uso beneficioso de microorganismos para el desarrollo de cultivos, actividades fisiológicas y la acumulación de nutrientes tiene un fuerte atractivo en todo el mundo, especialmente porque es una tecnología de bajo costo, que es fácil de aplicar y utilizar, no contamina, y facilita la intensificación sostenible de la agricultura moderna en un contexto deseable (Silva *et al.* 2020, Nascente *et al.* 2017, Singh *et al.* 2021).

De acuerdo con las cepas de *Trichoderma* spp. aisladas si comparamos las nativas con las importadas, se obtuvo que *T. asperellum* de

Colombia, exponen resultados muy prometedores y semejantes a la cepa nativa de *T. asperelloides*, donde lo que se debería de evaluar es el beneficio con el costo de su importación, factor que es importante para el agricultor. Por el contrario, se logró comprobar que no todas las importaciones de productos biológicos van a presentar excelentes resultados en los cultivos.

Estos resultados se pueden comparar con la investigación realizada por Konappa *et al.* (2018), donde obtuvo un aumento significativo en el crecimiento de las plantas de tomate y los parámetros generativos en las plantas tratadas con *T. asperellum*. En otro estudio donde se aislaron e identificaron especies de *Trichoderma* de la rizosfera de plantas de *Syringa oblata*, con una presencia de 4 especies: *T. pseudoharzianum* (n=46), *T. afroharzianum* (n=41), *T. atroviride* (n=29), and *T. asperelloides* (n=21). Las especies que presentaron excelentes resultados tanto en función del biocontrol como en la promoción del crecimiento fueron *T. afroharzianum* T52 y *T. asperelloides* T57 (Liu *et al.* 2020).

CONCLUSIONES

Existen cepas nativas de *Trichoderma* que promueven el crecimiento vegetal de las plantas de tomate en las variables evaluadas que aportan mayor acumulación de biomasa, incremento de la altura, más longitud de raíz y número de hojas tanto a nivel de invernadero como en campo. Los mejores resultados los presentó la especie de *T. asperellum* (nativa), no obstante, se obtuvieron resultados similares con la especie importada *T. asperelloides*.

LITERATURA CITADA

- Adams, P; De-Lij, FAM; Lynch, JM. 2007. *Trichoderma harzianum* Rifai 1295-22 mediates growth promotion of crack willow (*Salix fragilis*) saplings in both clean and metal-contaminated soil. Microb. Ecol. 54:306-313. DOI: 10.1007/s00248-006-9203-0
- Arikan, S; Lozano, M; Paetznickv, V; Rex, J. 2001. In vitro susceptibility testing methods for caspofungin

- against *Aspergillus* and *Fusarium* isolates. *Antimicrob Agent Chemother* 45(1):327-330.
- Ayyandurai, M; Akila, R; Manonmani, K; Theradimani, M; Vellaikumar, S. 2021. Phytostimulation and growth promotion activities of *Trichoderma* spp. on groundnut (*Arachis hypogaea* L.) crop. *Journal of Applied and Natural Science* 13(4):1172-1179. DOI: <https://doi.org/10.31018/jans.v13i4.2936>
- Bader, A; Salerno, G; Covacevich, F; Consolo, V. 2020. Native *Trichoderma harzianum* strains from Argentina produce indole-3 acetic acid and phosphorus solubilization, promote growth and control wilt disease on tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Journal of King Saud University – Science* 32:867-873. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2019.04.002>
- Bjorkman, T; Blanchard, LM; Harman, GE. 1998. Growth enhancement of shrunken-2 (sh2) sweet corn by *Trichoderma harzianum* 1295-22: effect of environmental stress. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 123(1):35-40.
- Cai, F; Chen, W; Wei, Z; Pang, G; Li, R; Ran, W; Shen, Q. 2015. Colonization of *Trichoderma harzianum* strain SQR-T037 on tomato roots and its relationship to plant growth, nutrient availability and soil microflora. *Plant Soil* 388:337-350.
- Calin, M; Raut, I; Arsene, M; Capra, I; Gurban, A; Doni, M; Jecu, L. 2019. Applications of Fungal Strains with Keratin-Degrading and Plant Growth Promoting Characteristics. *Agronomy* 9:543-562.
- Chagas, LFB; Castro, HG; Colonia, BSO; Carvalho, MR; Miller, L; Chagas, AF. 2016. Efficiency of *Trichoderma* spp. as a growth promoter of cowpea (*Vigna unguiculata*) and analysis of phosphate solubilization and indole acetic acid synthesis. *Brazilian Journal of Botany* 38:1-11.
- Chairman, E; Bird, G; Fisher, K; Hickey, K; Lewis, F; Line, R; Rickard, S. 1978. Methods for evaluating plant fungicides, nematocides and bactericides. The American Phytopathological Society. Minneapolis, USA. 141 p.
- Das, M; Haridas, M; Sabu, A. 2019. Biological control of black pepper and ginger pathogens, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora capsici*, using *Trichoderma* spp. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 17:177-183. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbab.2018.11.021>
- Di Rienzo, JA; Casanoves, F; Balzarini, MG; González, L; Tablada, M; Robledo, CW. 2020. InfoStat versión 2020 (en línea). Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Consultado 17 jul. 2021. Disponible en <http://www.infostat.com.ar>
- Eltlbany, N; Baklawa, M; Ding, GC; Nassal, D; Weber, N; Kandeler, E; Neumann, G; Ludewig, U; van Overbeek, L; Smalla, K. 2019. Enhanced tomato plant growth in soil under reduced P supply through microbial inoculants and microbiome shifts. *FEMS Microbiol Ecol.* 95(9): fiz124. DOI: 10.1093/femsec/fiz124
- Fernando, D; Milagrosa, S; Francisco, C; Urbano, DS. 2018. Biostimulant activity of *Trichoderma saturnisporum* in melon (*Cucumis melo*). *HortSci.* 53(6):810-815.
- Friedman, M; Kozukue, N; Mizuno, M; Sakakibara, H; Choi, SH; Fujitake, M; Land, KM. 2019. The analysis of the content of biologically active phenolic compounds, flavonoids, and glycoalkaloids in harvested red, yellow, and green tomatoes, tomato leaves, and tomato stems (en línea). *Curr. Top. Phytochemistry* 15:44-53. Consultado: 10 feb. 2022. Disponible en <https://scholarlycommons.pacific.edu/cop-facarticles/780>
- Gilchrist, L; Fuentes, C; Martínez, R; López, E; Duveiller, R; Singh, M; Henry, I; García, A. 2005. Guía práctica para la identificación de algunas enfermedades de trigo y cebada. 2 edición. México, D. F., CIMMYT. 260 p.
- Gravel, V; Antoun, H; Tweddell, RJ. 2007. Growth stimulation and fruit yield improvement of greenhouse tomato plants by inoculation with *Pseudomonas putida* or *Trichoderma atroviride*: Possible role of indole acetic acid (IAA). *Soil Biol. Biochem.* 39:1968-1977. DOI: doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.02.015
- Gupta, V; Schmoll, M; Herrera, A; Upadhyay, R; Druzhinina, I; Tuohy, M. 2014. *Biothecology and biology of Trichoderma*. Estados Unidos, Elsevier. 549 p.
- Halifu, S; Deng, X; Song, X; Song, R. 2019. Effects of two *Trichoderma* strains on plant growth, rhizosphere soil nutrients, and fungal community of *Pinus sylvestris* var. mongolica annual seedlings. *Forests* 10(9):758.
- Harman, GE. 2011. Multifunctional fungal plant symbionts: new tools to enhance plant growth and productivity. *New Phytologist* 647-649.
- Harman, G; Petzoldt, R; Comis, A; Chen, J. 2004. Interactions between *Trichoderma harzianum* T22 and maize inbred line Mo17 and effects of this interaction on diseases caused by *Pythium ultimum* and *Colletotrichum graminicola*. *Phytopathology* 94:147-153.
- Hoyos, L. 2011. Enfermedades de plantas: control biológico. Bogotá, Colombia, Universidad Estatal de Colombia. 217 p.
- Keswani, C; Bisen, K; Singh, V; Sarma, BK; Singh, HB. 2016. Formulation technology of biocontrol agents: present status and future prospects. In Arora, NK; Mehnaz, S; Balestrini, R. (eds.). *Bioformulations: for sustainable agriculture*. India, Springer. p. 35-52.
- Komoda, H. 1975. Development of a selective medium for quantitative isolation of *Fusarium oxysporum* from natural soil. *Rev. Plant. Res.* 8:114-125.
- Konappa, N; Krishnamurthy, S; Nayaka, C; Siddapura, N; Chowdappa, S. 2018. Evaluation of biological

- efficacy of *Trichoderma asperellum* against tomato bacterial wilt caused by *Ralstonia solanacearum*. Egyptian Journal of Biological Pest Control, 28:63. DOI: <https://doi.org/10.1186/s41938-018-0069-5>
- Lamba, P; Sharma, S; Munshi, GD; Munshi, SK. 2008. Biochemical changes in sunflower plants due to seed treatment/spray application with biocontrol agents. Phytoparasitica 36:388-399.
- Lanna, A; da Silva, M; Moreira, A; Nascente, A; de Fillipi, M. 2021. Improved nutrient uptake in three *Crotalaria* species inoculated with multifunctional microorganisms. Rev. Bras. Eng. Agr. e Amb. 25(7):460-465.
- Li, YT; Hwang, SG; Huang, YM; Huang, CH. 2018. Effects of *Trichoderma asperellum* on nutrient uptake and Fusarium wilt of tomato. Crop Protection 110:275-282.
- Liu, B; Ji, S; Zhang, H; Wang, Y; Liu, Z. 2020. Isolation of *Trichoderma* in the rhizosphere soil of *Syringa oblata* from Harbin and their biocontrol and growth promotion function. Microbiological Research 235:126445. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126445>
- López, L. 2017. Manual técnico del cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum*). San José, Costa Rica, Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA). 126 p.
- Manandhar, S; Pant, B; Manandhar, C; Baidya, S. 2019. In-vitro evaluation of biocontrol agents against soil borne plant pathogens. J. Nep. Agric. Res. Coun. 5:68-72.
- Nascente, AS; de Filippi, MC; Lanna, AC; de Souza, AC; da Silva Lobo VL; da Silva, GB. 2017. Biomass, gas exchange, and nutrient contents in upland rice plants affected by application forms of microorganism growth promoters. Environmental Science and Pollution Research 24:2956-2965.
- Olowe, O; Nicola, L; Dare, M; Olalekan, A; Oluranti, O. 2022. Trichoderma: Potential bio-resource for the management of tomato root rot diseases in Africa. Microbiological Research 257:126978. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2022.126978>
- Prasad, RD; Chnadrika, KSVP; Varsha, G. 2020. A novel chitosan biopolymer-based *Trichoderma* delivery system: Storage stability, persistence and bio efficacy against seed and soil borne diseases of oilseed crops. Microbiological Research 237:126487.
- Prasad, RM; Sagar, V; Devi, U; Triveni, S; Rao, K; Chari, D. 2017. Isolation and Screening of Bacterial and Fungal Isolates for Plant Growth Promoting Properties from Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 6(8):753-761. DOI: <https://doi.org/10.20546/ijemas.2017.608.096>
- Rabeendran, N; Moot, DJ; Jones, EE; Stewart, A. 2000. Inconsistent growth promotion of cabbage and lettuce from *Trichoderma* isolates. N. Z. Plant Protect. 53:143-146.
- Ramírez, CA; Porras, MD; Corrales, AR; Wrobel, K; Martínez, NP; Olmedo, V. 2018. Functional characterization of TvCyt2, a member of the p450 monooxygenases from *Trichoderma virens* relevant during the association with plants and mycoparasitism. Mol. Plant Microbe Interact. 31(3):289-298.
- Rouphael, Y; Cardarelli, M; Bonini, P; Colla, G. 2017. Synergistic action of a microbial-based biostimulant and a plant derived-protein hydrolysate enhances lettuce tolerance to alkalinity and salinity. Front. Plant Sci. 8(131):1-12. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00131>
- Samuels, G; Chaverri, P; Farr, D; McCray, E. 2013. *Trichoderma* online, systematic mycology and microbiology Laboratory, ARS, USDA (en línea). Estados Unidos. Consultado 28 jul. 2018. Disponible en /taxadescriptions/keys/TrichodermaIndex.cfm
- Sani, MNH; Hasan, M; Uddain, J; Subramaniam, S. 2020. Impact of application of Trichoderma and biochar on growth, productivity and nutritional quality of Tomato under reduced NPK fertilization. Ann. Agric. Sci. 65:107-115. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.aos.2020.06.003>
- Shores, M; Harman, G; Mastouri, F. 2010. Induced Systemic Resistance and Plant Responses to Fungal Biocontrol Agents. Annu. Rev. Phytopathol. 48:21-43. DOI: 10.1146/annurev-phyto-073009-114450
- Shores, M; Harman, GE. 2008a. The molecular basis of shoot responses of maize seedlings to *Trichoderma harzianum* T22 inoculation of the root: a proteomic approach. Plant Physiol. 147:2147-2163. DOI: 10.1104/pp.108.123810
- Shores, M; Harman, GE. 2008b. The relationship between increased grow and resistance induced in plants by root colonizing microbes. Plant Signal Behav. 3:737-739.
- Siddiquee, S. 2017. Fungal volatile organic compounds: emphasis on their plant growth-promoting. In Volatiles and Food Security. p. 313-333. Singapore, Springer.
- Silva, M; Nascente, A; de Filippi, M; Lanna, A; da Silva, G; Arruda E Silva, J. 2020. Individual and combined growth-promoting microorganisms affect biomass production, gas exchange and nutrient content in soybean plants. Rev. Caatinga, 33(3):619-632.
- Singh, SP; Singh, HB; Singh, D; Rakshit, A. 2014. Trichoderma -mediated enhancement of nutrient uptake and reduction in incidence of *Rhizoctonia solani* in tomato. Egyptian J. Bio. 16:29-38. DOI: <https://doi.org/10.4314/ejb.v16i1.4>
- Singh, G; Tiwari, A; Gupta, A; Kumar, A; Hrisprasad, P; Sharma, S. 2021. Bioformulation development via

- valorizing silica-rich spent mushroom substrate with *Trichoderma asperellum* for plant nutrient and disease management. J. of Envir. Manag. 297: 113278. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2021.113278>
- Spolaor, L; Azeredo, L; Andrade, O; Martinez, A; Scapim, C; Bengosi, F; Kuki, M; 2016. Plant growth-promoting bacteria associated with nitrogen fertilization at topdressing in popcorn agronomic performance. Bragantia 75(1):33-40. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4499.330>
- Umaschankar, N; Venkateshamurthy, P; Krishnamurthy, R; Raveendra, HR; Satish, KM. 2012. Effect of microbial inoculants on the growth of silver oak (*Grevillea robusta*) in nursery condition. Int. J. Environ. Sci. Dev. 3(1):72-76.
- Vinale, F; Nigro, M; Sivasithamparam, K; Flematti, G; Ghisalberti, E; Ruocco, M; Varlese, R; Marra, R; Lanzuise, S; Eid, A; Woo, SL; Lorito, M. 2013. Harzianic acid: a novel siderophore from *Trichoderma harzianum*. FEMS Microbiol. Lett. 347:123-129.
- Zachow, C; Fatehi, J; Cardinale, M; Tilcher, R; Berg, G. 2010. Strain-specific colonization pattern of *Rhizoctonia* antagonists in the root system of sugar beet. FEMS Microbiol. Ecol. 74(1):124-135.
- Zhang, F; Huo, Y; Cobb, AB; Luo, G; Zhou, J; Yang, G; Wilson, GWT; Zhang, Y. 2018. *Trichoderma* Biofertilizer Links to Altered Soil Chemistry, Altered Microbial Communities, and Improved Grassland Biomass. Front. Microbiol. 9:848. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00848



Agronomía Costarricense. Universidad de Costa Rica. Se encuentra licenciada con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr

MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD CONOCIDA COMO PUDRICIÓN SUAVE DEL FRUTO DE BANANO (*Musa* SP.) Y ALTERNATIVAS DE CONTROL MICROBIOLÓGICAS Y QUÍMICAS A NIVEL IN VITRO*

Jose Pablo Vargas-Fernández^{1/**}, Amy Wang-Wong², Miguel Muñoz-Fonseca³

Palabras clave: Pudrición blanda de fruto; *Erwinia* sp.; *Dickeya chrysanthemi*; *Pectobacterium carotovorum*; Antagonismo; Inhibición.

Keywords: Fruit soft rot; *Erwinia* sp.; *Dickeya chrysanthemi*; *Pectobacterium carotovorum*; Antagonism; Inhibition.

Recibido: 05/11/2021

Aceptado: 27/01/2022

RESUMEN

Introducción. La Pudrición Suave del Fruto (PSF) es una enfermedad precosecha que afecta a las musáceas. En renovación de plantaciones, las pérdidas por esta enfermedad alcanzan desde 0,3 hasta 1,2 t.ha⁻¹.año⁻¹ de fruta. **Objetivo.** Describir los síntomas de la PSF, a partir de los agentes asociados para evaluar a nivel in vitro posibles alternativas microbiológicas y químicas para su control. **Materiales y métodos.** La descripción de los síntomas, identificación de agentes asociados y pruebas de patogenicidad se realizaron a partir del análisis de tejido enfermo de frutos de 11 y 12 semanas de edad. El potencial de 13 formulaciones comerciales de cepas puras y mezclas de microorganismos, 4 formulaciones de cobre y una formulación de yodo fueron evaluadas contra los agentes asociados a la PSF, mediante la metodología del doble enfrentamiento. Se midió el diámetro menor y mayor del anillo de inhibición, a las 24, 48 y 120 horas.

ABSTRACT

Identification of banana soft rot associated microorganisms, and in vitro evaluation of microbiological and chemical control alternatives. Introduction. Fruit soft rot, a preharvest disease, affects banana fruit. In annual harvest plantations, its losses reach from 0,3 to 1,2 t.ha⁻¹.year⁻¹ of fruit. **Objective.** Identify associated microorganisms, describe disease symptoms, and evaluate in vitro microbiological and chemical control alternatives. **Materials and methods.** Symptom description, determination of associated microorganisms and pathogenicity tests were analyzed from diseased tissue. Using double confrontation methodology, inhibition potential of thirteen commercial formulations of pure strains and mixtures of microorganisms, four copper and one iodine formulations were evaluated on disease associated agents. Minor and major diameter of inhibition were measured at 24, 48 and 120 hours. Data ANOVA analysis was

* Esta investigación formó parte de la tesis de licenciatura del primer autor.

** Autor para correspondencia. Correo electrónico: jvargas2@freshdelmonte.com

1 Corporación de Desarrollo Agrícola Del Monte, S.A., Depto. de Investigaciones y Asistencia Técnica, Limón, Costa Rica.
 0000-0001-5603-1381.

2 Universidad de Costa Rica, Centro de Investigación en Protección de Cultivos, Instituto de Investigaciones Agrícolas, Costa Rica.

 0000-0002-6149-3035.

3 Standard Fruit Company de Costa Rica, Depto. de Investigación y Desarrollo, Río Frio, Sarapiquí, Costa Rica.

 0000-0002-7086-7959.

Se realizó un análisis de variancia (ANDEVA) con una prueba LSD Fisher y una probabilidad del 5%. **Resultados.** El agente asociado a PSF fue aislado de tejido enfermo e identificado como *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya chrysanthemi*). Debido a que siempre fue aislada del tejido enfermo, su patogenicidad se logró comprobar mediante los postulados de Koch. Se presume una participación conjunta de *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*) debido a que siempre fue aislada del tejido enfermo. El mejor efecto antagonista in vitro sobre *Erwinia chrysanthemi* se obtuvo con los microorganismos *Bacillus pumilus* cepa QST2808 y *Bacillus subtilis* cepa QST713. El mejor efecto in vitro de las fuentes químicas evaluadas se obtuvo con la dosis completa y media dosis de sulfato de cobre al 28,8%, y la dosis más alta de Iodo-Etanol al 2,5%. **Conclusión.** Se logró identificar el agente asociado a la enfermedad, además, se proponen alternativas microbiológicas y químicas con potencial inhibitorio in vitro para considerarse en pruebas de campo.

made using LSD Fisher test. **Results.** Diseased tissue associated agent was identified as *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*). Its pathogenicity was proved by Koch's postulates. It is also presumed that *Erwinia carotovora* (sin. *Pectobacterium carotovorum*) has joint participation in this pathosystem, since it was always isolated from diseased tissue. The best in vitro antagonistic effect was observed with *Bacillus pumilus* strain QST2808 and *Bacillus subtilis* strain QST713. Regarding to chemical alternatives, the best in vitro effect was observed with copper sulphide 28.8% complete dose, followed by its half dose, and Ethanol iodine 30 ml.L⁻¹. **Conclusion.** Disease associated microorganisms were identified, besides, there is proposed microbiological and chemical alternatives with in vitro potential that could be considered in field trials.

INTRODUCCIÓN

La Pudrición Suave del Fruto (PSF) en banano (Fruit soft rot), sinónimo de Pudrición Suave del Dedo, Pudre de Dedo y Dedo Podrido, es una enfermedad precosecha que afecta el fruto. En Centroamérica y el Caribe, en particular Costa Rica, Trinidad y Tobago, Honduras, Nicaragua y Panamá (Stover y Simmonds 1987, Guzmán y Wang 1998, Thwaites *et al.* 1999). Fue descrita en Costa Rica, Limón, existen registros desde 1991 aunque se reportó baja incidencia. La misma cobró importancia a partir de 1994, probablemente por la adopción de la desflora en campo y la renovación de plantaciones (Villalta *et al.* 2019). Se reportaron casos severos de incidencia de esta en Matina y Pococi en 1995 y 1996 (Guzmán y Wang 1998).

Se reporta como una enfermedad entre las que afectan el fruto, resultado final de las operaciones productoras de banano, una vez sometido a altas exigencias de calidad. La PSF constituye una causa importante de rechazo de fruta en las plantas empacadoras por daños desde la producción (Guzmán y Wang 1998). Se ha observado que, en plantaciones comerciales de banano, a partir del cuarto ciclo de producción, la incidencia alcanza entre 0,05 y 0,1%, que representa una pérdida entre 36 y 72 kg de fruta.ha⁻¹.año⁻¹. En los proyectos de renovación de plantaciones, la incidencia va desde 0,1 a 7%, equivalente a 0,3 y 1,2 Ton de fruta.ha⁻¹.año⁻¹. La cantidad de fruta afectada por la enfermedad asciende cuando se suman los frutos afectados indirectamente, como resultado del goteo de los exudados de las pudriciones y por el manejo operativo de las plantas

empacadoras, que preventivamente rechazan fruta adyacente a los que presentan síntomas de la enfermedad por el riesgo de maduración prematura (Villalta *et al.* 2019).

Las pudriciones bacterianas suaves en Musáceas son causadas por especies del género *Erwinia* (Gowen 1995). La PSF es atribuida a *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*) y *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Stover y Simmonds 1987, Choi *et al.* 1988, Samson *et al.* 2005, Snehatharani y Khan 2010). En Costa Rica, antes de 1998, se había investigado esta enfermedad lo requerido, sin embargo, estudios contemporáneos a este trabajo han presentado resultados sobre los agentes causales y algunos factores que participan en el desarrollo de la enfermedad (Guzmán *et al.* 2017, Villalta *et al.* 2019). Debido a que la sintomatología de las enfermedades bacterianas es generalmente similar, se ha afirmado que varios organismos pueden coexistir en una infección de este tipo (Gowen 1995), y en otros casos, estas bacterias afectan también el pseudotallo y tejidos en descomposición de la planta de banano (Ramírez *et al.* 2014).

En relación con las alternativas de control de la enfermedad, las recomendaciones giran alrededor de medidas sanitarias y culturales. Por ejemplo, remover restos de la planta en descomposición, minimizar heridas en los órganos de la planta, desinfección de las herramientas que se utilizan en las labores de calidad preventiva de la fruta como apuntalar, embolsar, desmanar, desdedar, desflorar y el deschire (Agrios 2005, Martínez *et al.* 2000, Guzmán *et al.* 2017), además de la eliminación en campo de frutos que presentan síntomas aparentes, y la suspensión de las prácticas de calidad preventiva en campo para reducir su posible dispersión. La suma de las prácticas de control propuestas no ha logrado, hasta el momento, disminuir la incidencia de la PSF y las pérdidas económicas que genera, por lo que se hace necesario evaluar otras prácticas de control.

La evaluación in vitro de productos formulados a base de antagonistas contra la PSF es una alternativa poco estudiada en el país. En Cuba, en áreas afectadas por la pudrición del

pseudotallo causada por *Erwinia* sp; Jiménez y Cordovés (1992), evidenciaron que especies aisladas de la rizosfera de plantas de banano tenían efecto antagonista in vitro contra aislamientos de *Erwinia chrysanthemi*. En esta misma línea de trabajo, se ha observado buen efecto antagonista de cepas de *Bacillus subtilis* (Goorani El y Hassanein 2008). También, algunas cepas de *Trichoderma* han sido evaluadas para el control in vitro de bacterias y patógenos de suelo que generan pudriciones (Hoyos *et al.* 2008). Observaciones similares fueron hechas por Nagaraj *et al.* (2012) quienes encontraron niveles aceptables de control sobre *Erwinia* con *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*.

Adicionalmente, se considera que las alternativas químicas podrían constituir herramientas valiosas en un programa integrado de manejo de la PSF. Dos alternativas químicas con alto potencial, cuyo efecto in vitro no ha sido estudiado en nuestro país, son el uso de compuestos cúpricos y desinfectantes a base de yodo. El cobre ha sido descrito como uno de los fungicidas y bactericidas más antiguos. El hidróxido cúprico, oxiclورو cúprico, sulfato cúprico y el óxido cuproso han sido registrados en el control de enfermedades causadas por hongos e infecciones bacterianas (Ordax 2008, Arauz 2011). En Costa Rica, para el control de *Erwinia* sp. en plantaciones de mango, Coto y Wang 1995 obtuvieron buen control de este patógeno a partir del Caldo bordelés (80% Sulfato de Cobre) en aplicaciones foliares. Los productos comerciales formulados con Iodo han sido utilizados para el control de pudriciones vasculares y marchitamiento en banano y plátano, por lo que tiene un alto potencial para el control de la PSF (Gómez *et al.* 2001).

El objetivo general de este trabajo fue determinar los microorganismos asociados a la enfermedad conocida como pudrición suave del fruto de banano (*Musa* sp.). Dos objetivos específicos fueron planteados, en primer lugar, describir los síntomas de la Pudrición Suave del Fruto (PSF) y adicionalmente, determinar alternativas de control microbiológicas y químicas a nivel in vitro.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el 2016, en Río Frío (Latitud 10° 20' N, Longitud 83° 57' O), del cantón de Sarapiquí. Las pruebas de laboratorio se realizaron en el Laboratorio de Aguas y Ensayos Biológicos de Standard Fruit Company, en esta misma localidad, y en los laboratorios de Fitopatología y Técnicas Moleculares Aplicadas a la Fitoprotección del Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos (CIPROC), de la Universidad de Costa Rica, Montes de Oca. Las pruebas in vitro se realizaron en el laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas, de la Universidad de Costa Rica, Montes de Oca, y en el laboratorio de Aguas y Ensayos Biológicos de Standard Fruit Company de Costa Rica S.A. (Dole), Río Frío, Sarapiquí, Heredia.

Identificación de los microorganismos asociados a la PSF

Recolección de la muestra. Se recolectó una muestra de 15 frutos enfermos, con el síntoma típico de la enfermedad en planta empacadora. La muestra estaba compuesta de fruta que presentaba menos del 50% de tejido necrótico. Se descartaron frutos que presentaban ruptura de cáscara para reducir las posibilidades de contaminación por patógenos secundarios.

Procesamiento de la muestra. Los frutos enfermos fueron lavados con agua desionizada estéril y desinfectados con alcohol al 70% durante un minuto y cloro al 1% durante un minuto. Luego, fueron enjuagados 3 veces con agua desionizada estéril para remover restos de cloro y alcohol. Con ayuda de un bisturí esterilizado, se realizó una incisión rectangular en la cáscara, en la zona de avance de la enfermedad, para exponer la pulpa del fruto. Posteriormente, se utilizaron aproximadamente 10 g de pulpa y se maceró en 90 ml de agua desionizada estéril, en una bolsa plástica. Este macerado se incubó durante 24 horas a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ y bajo condiciones de oscuridad.

Por medio de la técnica de diluciones seriadas, se diluyó el macerado hasta 10^8 . Cada dilución se cultivó en platos Petri, con el medio MacConkey. Finalmente, los platos Petri fueron incubados durante 24 horas a $26\pm 1^{\circ}\text{C}$ y bajo condiciones de oscuridad. Transcurrido este tiempo, se observó el crecimiento microbiano en cada plato.

Clasificación y purificación del crecimiento microbiano. El crecimiento microbiano fue clasificado de acuerdo con la morfología de la colonia bacteriana, por color, forma, superficie y tipo de borde. Este procedimiento fue llevado a cabo en medio Agar Tripticasa de Soya (ATS). Cada morfotipo fue separado y purificado para efectuarle las pruebas de patogenicidad e identificación.

Pruebas de patogenicidad. Este procedimiento se llevó a cabo bajo condiciones controladas de laboratorio, con fruta sana de 11 semanas de edad, proveniente de plantaciones comerciales con baja incidencia de la enfermedad. Los frutos recolectados fueron lavados con agua desionizada estéril y desinfectados con alcohol al 70% durante un minuto y cloro al 1% durante un minuto. Luego, fueron enjuagados 3 veces con agua desionizada estéril para remover restos de cloro y alcohol. Posteriormente, con ayuda de un palillo de madera, previamente esterilizado, se tomó una porción de cada morfotipo bacteriano y se inoculó en la fruta sana introduciéndolo 1 cm. La zona de inoculación fue cubierta con papel Parafilm. En total, se inocularon 10 frutos por cada morfotipo. Diez frutos fueron utilizados como testigos e inoculados con agua desionizada estéril, mediante el mismo procedimiento.

Los frutos inoculados fueron colocados en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se realizaron inspecciones, a las 24, 48 y 120 horas después de inoculación, para determinar la aparición de los síntomas característicos de la enfermedad. Posteriormente, para la identificación, se seleccionaron los morfotipos bacterianos que manifestaron los síntomas característicos de la enfermedad.

Identificación de agentes causales de la enfermedad. La identificación de los agentes causales se llevó a cabo a partir de los aislamientos que resultaron positivos en las pruebas de patogenicidad. A estos aislamientos se les realizaron pruebas bioquímicas como la prueba de crecimiento en medio Agar Papa Dextrosa (PDA), rayado en discos de papa, prueba catalasa, prueba oxidasa, prueba TSI y tinción de Gram. Posteriormente, se realizó la identificación de las bacterias según el sistema BIOLOG GEN III y la técnica molecular de secuenciación mediante la Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR), a partir de la región 16S del ARN.

El procedimiento para llevar a cabo la identificación mediante PCR, se realizó directamente con muestras de las colonias en el plato de cultivo, en el Laboratorio de Técnicas Moleculares aplicadas a la Fito protección del CIPROC, de la Universidad de Costa Rica (UCR), como se describe a continuación.

Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN). La extracción de ADN se realizó a partir de colonias frescas de las bacterias del plato de cultivo, con el método CTAB (Murray y Thompson 1985). El ADN fue cuantificado mediante un espectrofotómetro Bio Photometer Plus 6132 (Eppendorf) y se llevó a una concentración final de 80 ng.µl⁻¹.

Reacción en Cadena de la Polimerasa y secuenciación del ADN. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó con los cebadores específicos para el gen ribosomal 16S: 27F (5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTAC-GACTT-3'), descritos por Lane *et al.* 1985, que amplifican la secuencia total del gen.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, que consistían en 15,25 µl de agua desionizada ultra pura, 2,5 µl de Buffer 10X (1X), 2,5 µl de dNTPs (1mM), 1,25 µl de cada cebador (0,5 µM) y 0,25 µl de DreamTaq DNA Polymerase (1U/µl) (Fermentas©). Se utilizó un control negativo que consistía en una reacción sin ADN. La reacción de amplificación se llevó a cabo a partir del siguiente perfil térmico:

pre-desnaturalización inicial a 96°C durante 2 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 96°C durante 1 minuto, anillamiento a 56°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 2 minutos, seguidos de una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

El producto de PCR, de aproximadamente 1500 pares de bases (pb), se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa (0,8%), comparándolo con un marcador de peso molecular de 100 pb, Gene Ruler de Fermentas. El producto de PCR se digirió con una endonucleasa llamada Exonuclease I (Fermentas). La secuenciación se realizó al producto purificado de PCR a una concentración de 50 ng.µl⁻¹ por la empresa Macrogen Inc; Corea. Se obtuvo secuencias en ambas direcciones para cada muestra generada a partir de ciclos fluorescentes, con un secuenciador modelo 3730XL (Applied Biosystems).

Alineamiento de las secuencias y análisis filogenéticos. La calidad de las secuencias se confirmó con un alineamiento bidireccional y por comparación con los cromatogramas con el programa Bio Edit (Hall 1999), se cortó las terminaciones 5' y 3' de las cadenas para facilitar el alineamiento. Además, se utilizó la herramienta informática Basic Local Alignment Search Tool (Blast) del National Center for Biotechnology Information (NCBI), por sus siglas en inglés, a partir del cual se comparó la secuencia generada frente a las secuencias de la base de datos del banco de genes (Gene Bank).

Descripción de síntomas de la PSF. Se realizaron inspecciones en planta empacadora en racimos en edad de cosecha (11 y 12 semanas) para determinar la presencia de frutos que presentaran diferentes estados de desarrollo de la enfermedad. Posteriormente, estos frutos fueron observados minuciosamente en el laboratorio para determinar las similitudes entre ellos, así como la sintomatología característica de la enfermedad. En campo, racimos de diferentes edades fueron inspeccionados para detectar posible desarrollo de frutos enfermos en edades tempranas.

Evaluación in vitro de 13 formulaciones comerciales de microorganismos antagonistas sobre *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*), agente asociado a la PSF. Se utilizó la metodología de doble enfrentamiento (Chérif y Benhamou 1990). Cada unidad experimental constó de un plato Petri, con 4 discos de papel filtro, 2 impregnados con el tratamiento y

2 con los controles, el positivo con agua destilada y el negativo con un antibiótico (Gentamicina 1,2 ppm). En total 13 tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento. Los tratamientos fueron seleccionados según el posible potencial antagonista de los microorganismos incluidos en la formulación de los productos ofrecidos en el mercado y de acuerdo con la revisión de literatura (Tabla 1).

Tabla 1. Caracterización microbiológica de las formulaciones comerciales de cepas puras y mezclas de microorganismos evaluados en las pruebas de antagonismo con *Erwinia* sp. La dosis corresponde a la recomendación del fabricante para uso en campo. UFC.ml⁻¹. Unidades formadoras de colonias por mililitro de producto comercial. *Información no disponible debido a que el producto está registrado para uso diferente. **Información confidencial del fabricante.

	Tratamiento	Composición (según etiqueta)	Empresa suplidora	UFC.ml ⁻¹	Dosis (según etiqueta)
T1	Serenade®	<i>Bacillus subtilis</i> (cepa QST 713)	Bayer	1,0 x 10 ¹¹	1 L.ha ⁻¹
T2	Sonata ®	<i>Bacillus pumilus</i> (cepa QST 2808)	Bayer	1,0 x 10 ⁹	1 L.ha ⁻¹
T3	BSLIN®	<i>Bacillus subtilis</i> (cepa mog04)	Laboratorio Dr. Obregón	1,0 x 10 ⁹	14,8 L.ha ⁻¹
T4	Actinel®	<i>Streptomyces griseoviridis</i>	Laboratorio Dr. Obregón	1,0 x 10 ¹⁰	16 L.ha ⁻¹
T5	Biota Max	<i>Trichoderma</i> (<i>T. viridae</i> , <i>T. koningii</i> , <i>T. harzianum</i> , <i>T. polysporum</i>), <i>Bacillus</i> (<i>B. subtilis</i> , <i>B. laterosporus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i>), <i>Paenibacillus polymyxa</i>	Tecnobac S.A.	<i>Trichoderma</i> 2,5 x 10 ⁹ <i>Bacillus</i> 2,5 x 10 ⁹ <i>P. polymyxa</i> 5 x 10 ⁹	57 g.ha ⁻¹
T6	Environoc 401	<i>Trichoderma</i> sp; <i>Saccharomyces</i> sp; <i>Bacillus</i> sp; <i>Pseudomonas</i> sp; <i>Lactobacillus</i> sp; <i>Yarrowia</i> sp; <i>Rhodopseudomonas</i> sp; <i>Cellulomonas</i> sp.	Biodyne Costa Rica	1 x 10 ⁸	1,6 L.ha ⁻¹
T7	Magic Green	<i>Streptomyces</i> sp; <i>Azospirillum</i> sp; <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus</i> sp; <i>Nitrosomonas multiformis</i> , <i>Streptococcus</i> sp; <i>Aspergillus penicilloides</i> , <i>Mucor</i> sp; <i>Trichoderma</i> spp.	Granja Avícola Santa Marta	-*	30 L.ha ⁻¹
T8	Bactericida Horizon	<i>Penicillium</i> sp.	Horizon Bioagro	2,5 x 10 ¹²	2 L.ha ⁻¹
T9	Ultrazyme	<i>Lactobacillus</i> sp.	Cypher	3,6 x 10 ⁷	3 kg.ha ⁻¹
T10	Terrabiosa	Bacterias varias especies	Agrícola Piscis	5 x 10 ⁹	50 L.ha ⁻¹
T11	Ferbiol	Bacterias lácticas Levaduras Actinomicetos	Agrícola Piscis	9,5 x 10 ⁶ 6,1 x 10 ⁶ 2,0 x 10 ⁶	10 L.ha ⁻¹
T12	Fruit wash	Microorganismos benéficos	Biowish	-*	2 kg.ha ⁻¹
T13	Environoc 501	<i>Bacillus</i> sp; <i>Candida</i> spp; <i>Lactobacillus</i> sp; <i>Pseudomonas</i> sp.; <i>Sacchromyces</i> sp; <i>Streptomyces</i> sp.	Biodyne Costa Rica	-**	1,6 L.ha ⁻¹

Los productos comerciales formulados a base de microorganismos se enfrentaron a *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*). Se emplearon 10 repeticiones por tratamiento. El enfrentamiento se llevó a cabo en platos Petri en medio de cultivo Agar Nutritivo (AN) para 10 productos y Agar Tripticosa de Soya (ATS) para los 2 restantes. En cada plato se rayó y distribuyó, en 4 direcciones, con hisopos estériles, una suspensión igual al estándar Mc Farland #0,5, que equivale a $1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ de *E. chrysanthemi*. Posteriormente, se preparó un volumen de 0,1 L de la dosis proporcionada en la etiqueta del tratamiento, del cual se tomó una alícuota de 7 mL y se colocó en los discos de papel filtro. Los platos Petri se colocaron en condiciones de oscuridad, en una incubadora (Shelton Sm 16) a $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Se midió el diámetro menor y mayor del anillo de inhibición de cada tratamiento, a las 24,

48 y 120 horas. El análisis de los datos se realizó mediante un análisis de variancia (ANDEVA) con una prueba LSD Fisher y una probabilidad del 5%, con el paquete estadístico InfoStat.

Evaluación in vitro de formulaciones de Iodo y cobre sobre *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*). Se utilizó la metodología de doble enfrentamiento (Chérif y Benhamou 1990). Cada unidad experimental constó de un plato Petri, con 4 discos de papel filtro, 2 impregnados con el tratamiento y 2 con los controles, el positivo con agua destilada y el negativo con un antibiótico (Gentamicina 1,2 ppm). En total quince tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento. Los tratamientos consistieron en formulaciones comerciales de cobre y yodo ofrecidas en el mercado (Tabla 2).

Tabla 2. Formulaciones comerciales de cobre y yodo evaluadas en las pruebas de antagonismo con *Erwinia* sp. La dosis corresponde a la recomendación del fabricante para uso en campo.

Tratamiento	Descripción/dosis	Concentración		Dosis L.Ha ⁻¹
T1	Copper speed 100%	CuSO4	6% P/v	0,4
T2	Copper speed 50%	CuSO4	6% P/v	0,2
T3	Copper speed 25%	CuSO4	6% P/v	0,1
T4	Fulmicobre 100%	Cu3(PO3)2	5% p/v	1
T5	Fulmicobre 50%	Cu3(PO3)3	5% p/v	0,5
T6	Fulmicobre 25%	Cu3(PO3)4	5% p/v	0,25
T7	Foliveex cobre 100%	CuSO4	98% p/p	10
T8	Foliveex cobre 50%	CuSO4	98% p/p	5
T9	Foliveex cobre 25%	CuSO4	98% p/p	2,5
T10	Nutricop 20 100%	CuSO4	28,8% p/v	4
T11	Nutricop 20 50%	CuSO4	28,8% p/v	2
T12	Nutricop 20 25%	CuSO4	28,8% p/v	1
T13	Vanodine 5 mL.L ⁻¹	Iodo-Etanol	2,5%	0,125
T14	Vanodine 10 mL.L ⁻¹	Iodo-Etanol	2,5%	0,25
T15	Vanodine 30 mL.L ⁻¹	Iodo-Etanol	2,5%	0,75

Los productos comerciales formulados a base de yodo y cobre se enfrentaron a *E. chrysanthemi*. Se emplearon 10 repeticiones por tratamiento. El enfrentamiento se llevó a cabo en platos Petri en medio de cultivo Agar Nutritivo (AN) para 10 productos. En cada plato se rayó y distribuyó, en 4 direcciones, con hisopos estériles, una suspensión igual al estándar Mc Farland # 0,5, que equivale a $1,5 \times 10^8$ UFC.ml⁻¹ de *E. chrysanthemi*. Posteriormente, se preparó un volumen de 0,1 L de la dosis proporcionada en la etiqueta de cada tratamiento, del cual se tomó una alícuota de 7 mL y se colocó en los discos de papel filtro. Los platos Petri se colocaron en condiciones de oscuridad, en una incubadora (Shelton Sm 16) a $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Se midió el diámetro menor y mayor del anillo de inhibición de cada tratamiento, a las 24, 48 y 120 horas. El análisis de los datos se realizó mediante un análisis de variancia (ANDEVA) con una prueba LSD Fisher y una probabilidad del 5%, con el programa estadístico InfoStat.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Clasificación y purificación del crecimiento microbiano. De la etapa de aislamiento de la sintomatología característica de la PSF se obtuvo como resultado 7 morfotipos bacterianos. De estos, 3 morfotipos presentaron forma irregular, bordes ondulados, superficie plana y coloración parda o café claro, en medio MacConkey, característicos de enterobacterias como *Erwinia*, concordante con las observaciones de Guzmán y Wang (1998) en la identificación morfológica de *Erwinia* sp. Los 3 morfotipos fueron inoculados en fruta para probar su patogenicidad.

Identificación de los agentes asociados a la PSF. Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas realizadas concuerdan con lo encontrado por varios autores para el género *Erwinia* (Tabla 3). Los 3 morfotipos tuvieron un resultado positivo en las pruebas de crecimiento en medio agar papa dextrosa (PDA), en agar nutritivo (AN), y en discos de papa. Estas pruebas son

positivas para los géneros de bacterias pectinolíticas, osea que tienen la capacidad de producir enzimas degradadoras de la pectina, como *Erwinia chrysanthemi* y *Erwinia carotovora*, que se traduce en la degradación de tejidos suculentos en la planta (Cedeño *et al.* 1990, Soriano *et al.* 2000, Ramírez *et al.* 2014). Se ha documentado que estas pruebas son claves para determinar la patogenicidad de *Erwinia chrysanthemi* (Beaulieu *et al.* 1993), y al respecto, Guzmán y Wang (1998), a partir de bacterias del género *Erwinia*, obtuvieron resultados positivos para estas pruebas.

Tabla 3. Caracterización bioquímica de los aislamientos SFC2, SFC4 y SFC7, obtenidos del síntoma de la Pudrición Suave del Fruto (PSF).

Prueba	Resultado
Catalasa	+
Oxidasa	-
Rayado en discos de papa	+ desnaturaliza el tejido
TSI	+ A/A
Tinción Gram	-
Crecimiento en PDA	+
Crecimiento en AN	+

Para los 3 morfotipos, la tinción Gram fue Gram negativa, catalasa positiva, oxidasa negativa, y TSI positiva para la fermentación de azúcares. Como señala la literatura, la gran mayoría de bacterias fitopatógenas son Gram negativas (Kunstmann *et al.* 2006, Ramírez *et al.* 2014), por otra parte, en su trabajo, Ramírez *et al.* 2009, señalan en la caracterización bioquímica de bacterias del género *Erwinia*, que estas son catalasa positiva y oxidasa negativa, además, describen la capacidad de este género para fermentar azúcares, lo que resulta en el viraje del color del medio de rojo a amarillo, en la prueba TSI.

Los morfotipos fueron analizados mediante la técnica bioquímica BIOLOG GEN III y la

técnica molecular de secuenciación mediante PCR. El resultado de ambas pruebas refuerza que los morfotipos SFC2, SFC4 y SFC7

corresponden a *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*) y *Erwinia carotovora* (sin. *Pectobacterium carotovorum*) (Tabla 4).

Tabla 4. Identificación de los aislamientos SFC2, SFC4 y SFC7 mediante el sistema BIOLOG GEN III y secuenciación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de acuerdo con la amplificación del ARN de la región 16S.

Aislamiento	BIOLOG GEN III	Secuenciación mediante PCR
SFC2	<i>Erwinia carotovora</i> (<i>Pectobacterium carotovorum</i>)	99% similitud con <i>Erwinia chrysanthemi</i>
SFC4	<i>Erwinia carotovora</i> (<i>Pectobacterium carotovorum</i>)	99% similitud con <i>Erwinia chrysanthemi</i> y <i>Dickeya dadantii</i>
SFC7	<i>Erwinia</i> sp	99% similitud con <i>Erwinia chrysanthemi</i>

Con estos resultados se puede afirmar que los agentes asociados a la PSF son *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi* y *Dickeya dadantii*) y *Erwinia carotovora* (sin. *Pectobacterium carotovorum*). Estos resultados concuerdan con los agentes causales de las pudriciones blandas descritos recientemente en la literatura (Guzmán *et al.* 2017, Villalta *et al.* 2019), que señalan a *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya dadantii*), como el agente causal de pudriciones blandas en banano. El hallazgo de *Erwinia carotovora* (sin. *Pectobacterium carotovorum*) podría sugerir la participación conjunta de este organismo, ya que siempre fue aislada de los síntomas de la enfermedad y se logró comprobar, mediante los postulados de Koch, su patogenicidad.

Descripción de los síntomas característicos de la PSF. Los síntomas de esta enfermedad se observaron en fruta verde, a partir de 6 semanas de edad y se acentuaron cuando la fruta alcanzó edad comercial alrededor de 11 semanas. Los síntomas característicos fueron manchas acuosas debajo de la epidermis del fruto, que desencadenaron áreas necrosadas a lo largo del fruto. Los síntomas iniciaron por lo general en el extremo distal, que abarcó aproximadamente 0,5 cm de radio. La enfermedad avanza paulatinamente hasta llegar al pedúnculo. Internamente, en un estado avanzado, los tejidos de la pulpa se degradan, producto de la acción enzimática de los agentes causales y presentan mal olor, que da origen al síntoma típico de una pudrición blanda (Jeger *et al.* 1995, Guzmán y Wang 1998, Guzman *et al.* 2017) (Figura 1).

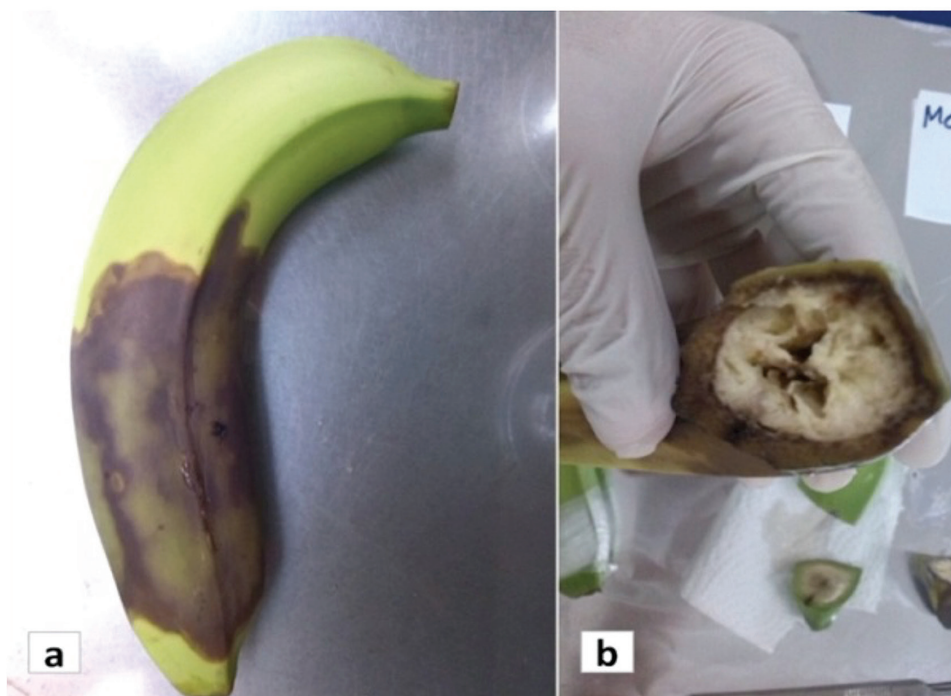


Figura 1. Síntomas característicos de la PSF en frutos individuales de 12 semanas de edad.

a. Necrosis externa en los tejidos de la cáscara del fruto.

b. Aspecto de los tejidos internos de la pulpa de un fruto afectado por la enfermedad.

La enfermedad progresa rápidamente; al término de 24 horas, la necrosis externa es evidente e internamente, la pudrición puede alcanzar entre 1 y 2 tercios del fruto (Guzmán y Wang 1998). En etapas avanzadas, los tejidos de la cáscara colapsan, producto de la pudrición interna y

externa, seguido de un goteo de exudados hacia la fruta de manos inferiores y adyacentes que causa manchas, estrías y decoloraciones que convierten fruta en condiciones óptimas para ser comercializada en fruta de desecho (Figura 2).

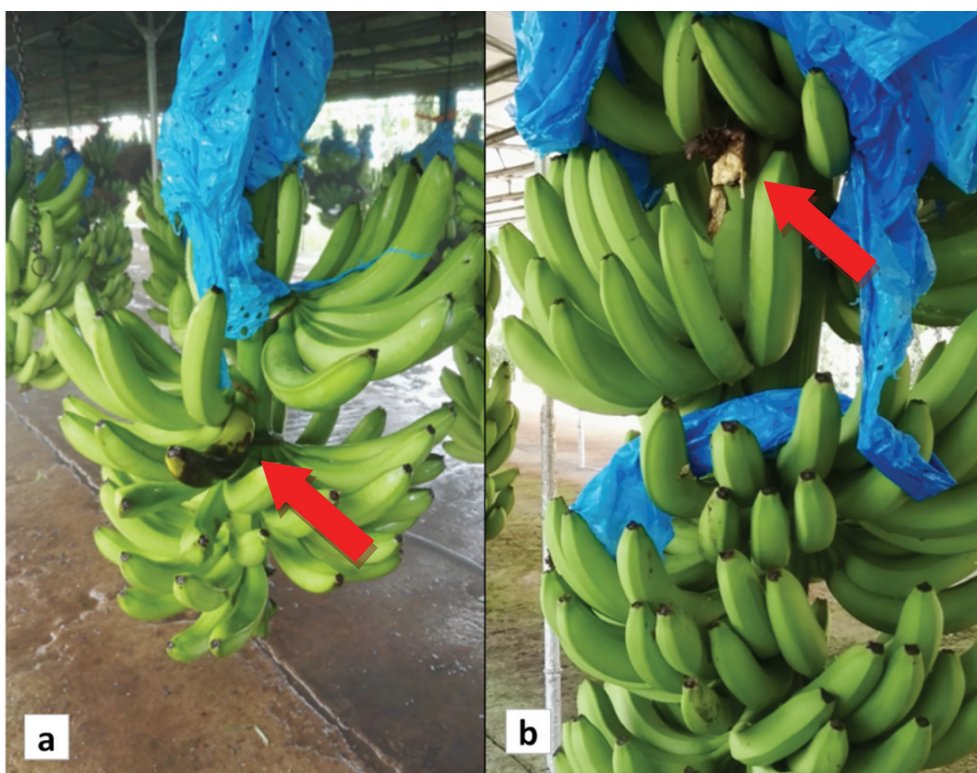


Figura 2. Síntomas característicos de la PSF en racimos de 12 semanas de edad.

a. Fruto íntegro con necrosis característica.

b. Fruto colapsado en la parte superior del racimo que genera goteo de exudados sobre fruta de manos inferiores y adyacentes.

Pruebas de patogenicidad. Los 3 morfotipos probados, fueron denominados SFC2, SFC4 y SFC7, y reprodujeron los síntomas característicos de la PSF. Los síntomas iniciales de la enfermedad, pequeñas áreas de apariencia húmeda en la cáscara fueron observados 24 horas después de la inoculación y se extendieron hasta alcanzar la totalidad del fruto, aproximadamente 120 horas después. Guzmán y Wang (1998), en su trabajo con *Erwinia* sp, señalan que al cabo de

5 días de inoculación (120 h), se alcanzó un 90% del fruto necrosado, dato que refuerza la rapidez con que estos patógenos afectan el fruto.

En este trabajo también se pudo constatar lo expuesto por Guzmán y Wang 1998 y Guzmán *et al.* 2017, quienes señalaron que una vez observado el síntoma externo en la cascara del fruto, los tejidos internos de la pulpa se encontraron degradados y con apariencia acuosa (Figura 3).

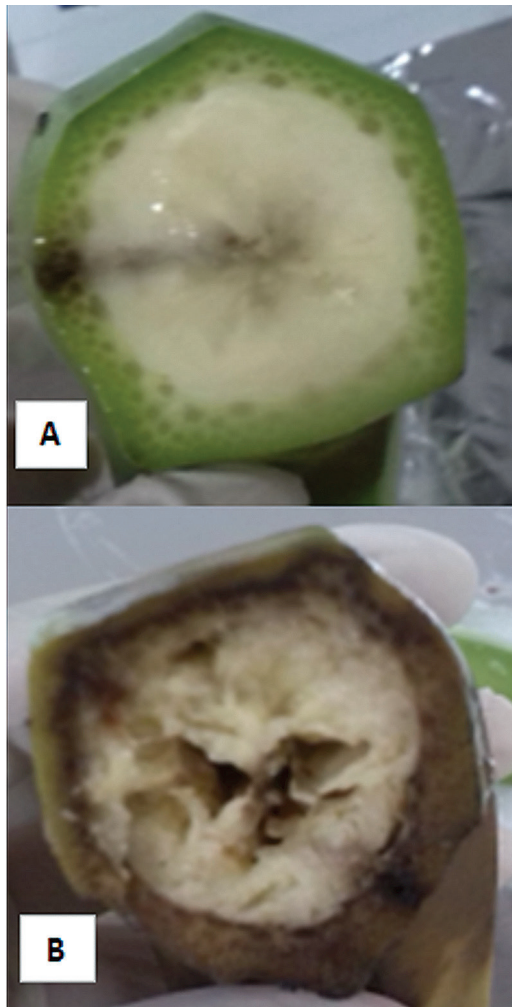


Figura 3. A. Aspecto de la pulpa de un fruto sano. B. Aspecto de la pulpa de un fruto afectado por la enfermedad.

Efecto antagonista in vitro de trece formulaciones comerciales de microorganismos antagonistas sobre *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*). El diámetro de inhibición sobre *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*) se observó a partir de 48 horas después de la inoculación. Como se indica en la Figura 4, el mayor diámetro de inhibición del crecimiento de la bacteria fue obtenido con *Bacillus subtilis* (cepa QST 713) y *Bacillus pumilus* (cepa QST 2808), a las 120 horas. Ambos productos lograron aproximadamente el doble del diámetro de inhibición del resto de tratamientos. Con el testigo positivo (agua destilada) y negativo (Gentamicina 1,2 ppm), el diámetro de inhibición alcanzado fue 0 cm y 2,5 cm respectivamente.

El efecto de ambos tratamientos puede deberse a que las cepas de las bacterias, *B. subtilis* y *B. pumilus*, han sido seleccionadas por su capacidad de antagonismo con patógenos de plantas causantes de múltiples enfermedades. La literatura indica que entre un 4 y 5% del genoma de ambas especies está dedicado a la producción de antibióticos. Tienen el potencial para producir más de 2 docenas de moléculas antimicrobianas diferentes, además de las enzimas líticas, celulasas, proteasas, 1,4- β -glucanasas e hidrolasas, las cuales contribuyen a la degradación de las paredes y membranas de las células del patógeno (Baysal *et al.* 2013).

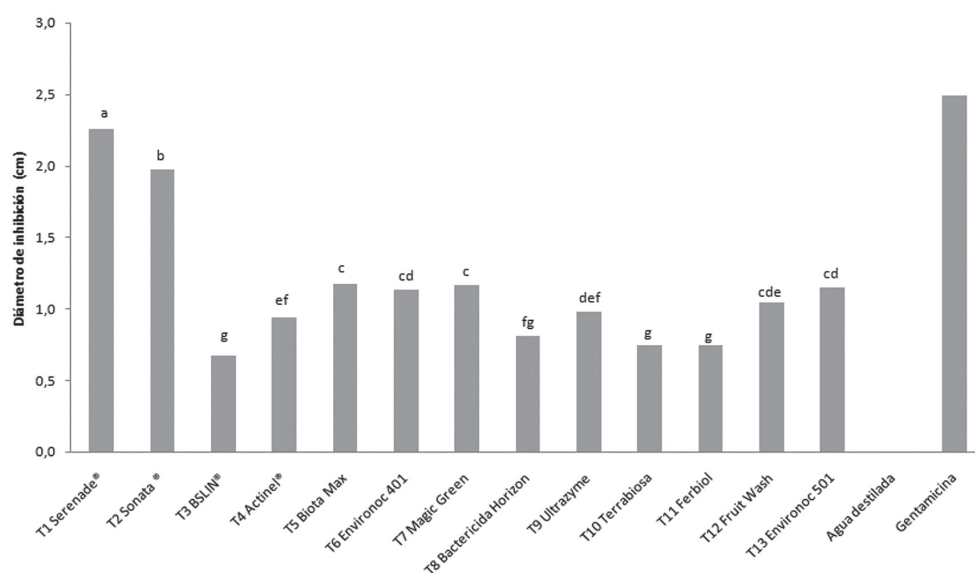


Figura 4. Inhibición del crecimiento in vitro de *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*) debido al efecto antagonista de los tratamientos a las 120 horas. Tratamientos seguidos de una misma letra no son significativamente diferentes (LSD Fisher 0,05).

Observaciones realizadas por Sharga y Lyon (1998), Reinoso *et al.* (2006), Nissen *et al.* (2008), Goorani El y Hassanein (2008) y Matar *et al.* (2009), indican la efectividad de ambas bacterias en la inhibición del crecimiento in vitro de especies de *Erwinia*. Por otra parte, en otros cultivos, se observó efecto inhibitorio por parte de estas bacterias al probarse en el control in vitro de 2 subespecies de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum*) y *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*), causantes de la pudrición suave de la papa (Cladera *et al.* 2006). Por otra parte, Rashid *et al.* 2013, lograron un diámetro de inhibición de aproximadamente 2 cm con *Bacillus subtilis* en pruebas de control biológico in vitro contra *Erwinia* sp.

Se ha observado que los compuestos producidos por *Bacillus* mantienen su actividad en medios de cultivo hasta 8 horas después de producidos, y su actividad in vitro aumenta luego de 24 horas de la inoculación del microorganismo, cuando este ha logrado establecerse en el medio

(Bottone y Peluso 2003). Lo anterior puede explicar que el efecto inhibitorio de los 2 tratamientos comenzó a observarse después de las 24 horas de inoculación y el máximo se alcanzó a las 120 horas después, al terminar la fase de crecimiento exponencial e iniciar la fase estacionaria de estos microorganismos (Bottone y Peluso 2003).

Efecto de inhibición in vitro de fuentes comerciales de Iodo y cobre sobre *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*). El crecimiento de *E. chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*) se vio inhibido por las formulaciones de cobre y yodo. Los tratamientos que mostraron mayor efectividad fueron la dosis completa de Sulfato de Cobre 28%, media dosis de Sulfato de cobre 28% y la dosis más alta de Iodo etanol 30 mL.L⁻¹ (Figura 5). Cabe resaltar que la dosis más alta de Iodo etanol tuvo un desempeño similar a las mejores fuentes de cobre. Los resultados obtenidos pueden deberse a que el Sulfato de Cobre (28% P/V) presenta un contenido porcentual de cobre mayor a los demás

tratamientos evaluados. Por otra parte, el Sulfato de Cobre (98% P/V) no mostró un desempeño adecuado. A raíz de estos resultados, es necesario investigar la influencia de la concentración

y naturaleza sólida o líquida de las fuentes de cobre en la inhibición sobre *E. chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*).

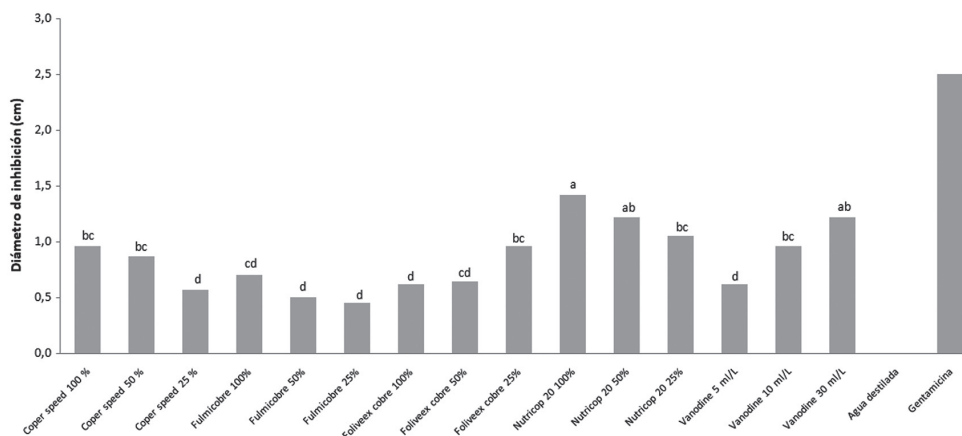


Figura 5. Inhibición del crecimiento in vitro de *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*) debido al efecto de los tratamientos a las 48 horas. Tratamientos seguidos de una misma letra no son significativamente diferentes (LSD Fisher 0,05).

El efecto observado se debe al efecto bacteriostático y bactericida descrito por la literatura para el Iodo y el cobre (Gómez *et al.* 2001, Ordax 2008, Arauz 2011), sin embargo, es importante determinar su uso potencial y la posible fitotoxicidad en fruta causada por estas fuentes de cobre y Iodo.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El agente asociado a la enfermedad PSF fue aislado de tejido enfermo e identificado como *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*).

Se presume que hay una participación conjunta de *Erwinia carotovora* (sin. *Pectobacterium carotovorum*), ya que siempre fue aislada de los síntomas de la enfermedad y se logró comprobar, mediante los postulados de Koch, su patogenicidad.

El mejor efecto antagonista in vitro sobre *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*) se obtuvo con los microorganismos *Bacillus pumilus* cepa QST 2808 y *Bacillus subtilis* cepa QST 713.

Por parte de las fuentes químicas, el mejor efecto in vitro sobre *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*) se obtuvo con la dosis completa y media dosis de Sulfato de Cobre al 28,8%, y la dosis más alta de Iodo-Etanol al 2,5%.

Se recomienda investigar el antagonismo in vitro, a partir del incremento de formulaciones comerciales de microorganismos antagonistas y controladores biológicos, para dar énfasis a productos elaborados a partir de cepas puras.

Se recomienda investigar la influencia de más fuentes a base de cobre y yodo, de diferente concentración, de naturaleza sólida o líquida sobre la inhibición de *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*).

LITERATURA CITADA

- Agrios, GN. 2005. Plant diseases caused by prokaryotes: bacteria and mollicutes. Bacterial Soft Rots. Plant Pathology 4 ed. Amsterdam, Países Bajos, Harcourt, Academic Press. p. 434-437.
- Arauz, L. 2011. Fitopatología: Un enfoque agroecológico. 2. ed. San José, Costa Rica, Editorial Universidad de Costa Rica. 514 p.
- Baysal, Ö; LAI, D; XU, H; Siragusa, M; Çalişkan, M; Carimi, F; Tör, M. 2013. A Proteomic approach provides new insights into the control of soil-borne plant pathogens by *Bacillus* species. PLoS ONE 8(1):e53182. DOI: 10.1371/journal.pone.0053182
- Beaulieu, C; Boccara, M; Gijsegem, F. 1993. Pathogenic behavior of pectinase defective *Erwinia chrysanthemi* mutants on different plants. Molecular Plant-Microbe Interactions 6 (2):197-202.
- Bottone, E; Peluso, R. 2003. Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an antifungal compound that is active against Mucoraceae and *Aspergillus* species: preliminary report. Journal of Medical Microbiology 52(1):69-74.
- Cedeño, M; Nieves, M; Palacios, P. 1990. *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica, causante de la pudrición blanda del plátano 'Hartón' (Musa AAB) en Venezuela. Fitopatología Venezolana 3(1):6-9.
- Chérif, M; Benhamou, N. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Phytopathology 80:1406-1414.
- Cladera, F; Caron, G; Motta, A; Souto, A; Brandelli, A. 2006. Bacteriocin-like substance inhibits potato soft rot caused by *Erwinia carotovora*. Canadian Journal of Microbiology 52(6):533-539.
- Coto, B; Wang, A. 1995. Evaluación de cinco tratamientos químicos para el combate de la bacteriosis (*Erwinia* sp.) en frutos de mango variedad Tommy Atkins, en Turruabares, Costa Rica. Agronomía Costarricense 19(1):15-20.
- Gómez, L; Echeverry, E; González, R. 2001. Evaluación de los controles cultural, químico y biológico sobre la pudrición vascular y marchitamiento del plátano (*Musa* AB Simmonds). Infomusa 10(1):17-21.
- Goorani El, M; Hassanein, F. 2008. The effect of *Bacillus subtilis* on in vitro growth and pathogenicity of *Erwinia amylovora*. Journal of Phytopathology 133(2):134-138.
- Gowen, S. 1995. Bananas and plantains. Londres, UK, Chapman and Hall. 599 p.
- Guzmán, M; Villalta, R; Martínez, I. 2017. Relación entre la desflora en el campo del racimo de banano (*Musa* AAA, cv. Grande Naine) y la pudrición bacteriana suave del dedo. CORBANA 37-43(63):47-61.
- Guzmán, M; Wang, A. 1998. Descripción de los síntomas, identificación del agente causal y determinación de la fuente de inóculo de la pudrición suave del dedo en banano (*Musa* AAA). CORBANA 23(50):109-124.
- Hall, T. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequences alignment editor and analysis program for Windows. Nucleic Acids Symposium Series 41:95-98.
- Hoyos, L; Duque, G; Orduz, S. 2008. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas 2(1):76-86.
- Jeger, M; Eden, S; Thresh, J; Johanson, A; Waller, J; Brown, A. 1995. Banana diseases. Bananas and Plantains. Londres, UK, Chapman & Hall. p. 317-382.
- Jiménez, G; Cordovés, M. 1992. Caracterización de bacterias de la rizosfera de plátano antagonicas a *Erwinia chrysanthemi* (en línea). Protección de Plantas Consultado 15 oct. 2016. Disponible en <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CU2003100445#WE2YcSwt4jA.mendeley>
- Kunstmann, J; Campi, L; Bohm, L; Barrera, S; Collado, L. 2006. Determinación de especies de *Erwinia* (grupo carotovora) como agentes causales de pudrición blanda en Cala (*Zantedeschia* spp.). Agricultura Técnica 66(3):247-255.
- Lane, D; Pace, B; Olsen, G; Stahl, D; Sogin, M; Pace, N. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6955-6959.
- Martínez, I; Villalta, R; Guzmán, M. 2000. Plegable divulgativo N°. 2: Pudrición suave del dedo de banano (*Pectobacterium carotovorum* Waldee). Costa Rica, Corporación Bananera Nacional. 2 p.
- Matar, S; El-Kazazz, S; Wagih, E; El-Diwan, A; Moustafa, H; Abo-Zaid, G; Abd-Elsalam, H; Hafez, E. 2009. Antagonistic and inhibitory effect of *Bacillus subtilis* against certain plant pathogenic fungi. Biotechnology 8:53-61.
- Murray, M; Thompson, W. 1985. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 13(19):4321-4325.
- Nagaraj, M; Umashankar, N; Palanna, K; Khan, A. 2012. Etiology and management of tip-over disease of banana by using biological agents. International Journal of Advanced Biological Research 2(3):483-486.
- Nissen, J; Carrión, J; Ciampi, L; Costa, M; Fuentes, R; Schöbitz, R. 2008. Biocontrol de *Erwinia carotovora* en Cala (*Zantedeschia* sp.). Agro Sur 36(2):59-70.
- Ordax, M. 2008. Supervivencia de *Erwinia amylovora* en condiciones de estrés: influencia de la presencia de cobre y la limitación de nutrientes. Tesis Ph.D. Valencia, España, Universidad Politécnica de Valencia. 226 p.
- Ramírez, J; Jaraba, A; Buriticá, P. 2014. Manejo de la pudrición acuosa del pseudotallo (*Dikeya* sp.) en banano (*Musa* sp.) bajo condiciones de invernadero. Agronomía Costarricense 38(2):83-92.

- Ramírez, L; Castaño, S; López, R. 2009. Identificación de bacterias que afectan el establecimiento in vitro de segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth. Rev. Invest. Univ. Quindío 19:151-158.
- Rashid, M; Chowdhury, M; Sultana, N. 2013. In-vitro screening of some chemicals and biocontrol agents against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, the causal agent of Soft Rot of Potato (*Solanum tuberosum*). The Agriculturists 11(2):1-9.
- Reinoso, Y; Casadesús, L; García, A; Gutiérrez, J; Pazos, V. 2006. Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. Fitosanidad 10(3):187-191.
- Samson, R; Legendre, JB; Christen, R; Fisher-Lesaux, M; Achouak, W; Garden, L. 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp nov; *Dickeya dianthicola* sp. nov; *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zeae* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:1415-1427.
- Sharga, B; Lyon, G. 1998. *Bacillus subtilis* BS 107 as an antagonist of potato blackleg and soft rot bacteria. Microbiol 4:777-783.
- Snehalatharani, A; Khan, A. 2010. Biochemical and physiological characterization of *Erwinia* species causing tip-over disease of banana. Archives of Phytopathology and Plant Protection 43(11):1072-1080.
- Soriano, M; Blanco, A; Diaz, P; Pastor, J. 2000. An unusual pectate lyase from a *Bacillus* sp. with high activity on pectin: cloning and characterization. Microbiology. 146:89-95.
- Stover, RH; Simmonds, NW. 1987. Bananas. 3rd edition. London, UK, Longman Scientific & Technical. 468 p.
- Thwaites, R; Eden-Green, SJ; Black, R. 1999. Diseases caused by bacteria. In Jones, DR (ed.). Diseases of banana, abacá and enset. New York, USA. CABI Publishing. p. 213-239.
- Villalta, R; Guzmán, M; Sánchez, M. 2019. Pudrición suave del dedo de banano. Costa Rica, Corporación Bananera Nacional. Hoja divulgativa N° 20. 2 p.
- Villalta, R; Sánchez, M; Conejo, A; Guzmán, M. 2019. Identificación del agente causal de la pudrición suave del dedo en fincas bananeras de la Vertiente del Caribe de Costa Rica y evaluación del riesgo de maduración prematura en racimos afectados por la enfermedad. In Informe Anual 2016-2017-2018 y 2019. Dirección de Investigaciones CORBANA, S.A. San José, Costa Rica, Corporación Bananera Nacional. p. 253-256.



Agronomía Costarricense. Universidad de Costa Rica. Se encuentra licenciada con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr

FRECUENCIAS DE APLICACIÓN DE BIOPRODUCTO EN EL DESARROLLO Y EL CONTROL DE ENFERMEDADES DE CAFETO

Yusdel Ferrás-Negrín^{1/*}, Marianny Portal-Rodríguez²,
Carlos Alberto Bustamante-González³, Ciro Sánchez-Esmori⁴

Palabras clave: Frecuencia de aplicación; mancha de hierro; microorganismos eficientes; roya.

Keywords: Frequency of application; iron stain; efficient microorganisms; rust.

Recibido: 15/11/2021

Aceptado: 21/03/2022

RESUMEN

Introducción. Los microorganismos eficientes se han convertido en una práctica común como estrategia de manejo agrícola sostenible y han sido ampliamente usados con diferentes propósitos. **Objetivo.** Evaluar el efecto de frecuencias de aplicaciones del bioproducto en el desarrollo de café y el control de enfermedades en su primer año de plantado. **Materiales y métodos.** El experimento se desarrolló en la Estación Experimental Agro-Forestal en Jibacoa, Villa Clara, Cuba. Se asperjó a 5 L.ha⁻¹ a una concentración del 2% con frecuencias: mensuales, bimensuales, trimestrales y un tratamiento sin aspersiones (Control). Al año de establecida la plantación se evaluó a los cafetos: morfología (la altura, el diámetro del tallo, el diámetro de la copa), enfermedades (índice de infestación y de distribución de la mancha de hierro y la roya). **Resultados.** Con las aspersiones mensuales se manifestó una tendencia de mejora en el

ABSTRACT

Bioproduct application frequencies effect on tree development and disease control in coffee. Introduction. Efficient microorganisms have become a common practice among sustainable agricultural management strategies and have been widely used for different purposes. **Objective.** To evaluate the effect of application frequencies of the bioproduct in the development of coffee tree and the control of diseases in its first year of planting. **Materials and methods.** The experiment was developed at the Agro-Forestal Experimental Station in Jibacoa, Villa Clara, Cuba. It was sprayed at 5 L.ha⁻¹ (2% concentration) with different frequencies: monthly, bi-monthly, quarterly and a treatment without spraying (Control). One year after the plantation was established, the coffee trees were evaluated: morphology (height, stem diameter, crown diameter), diseases (rate of infestation and distribution of iron stain

* Autor para correspondencia. Correo electrónico: yusdel@jibacoa.inaf.co.cu

1 Instituto de Investigaciones Agro-Forestales, Estación Experimental Agro-Forestal Jibacoa, Manicaragua, Villa Clara, Cuba.
 0000-0001-7897-0128.

2 Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey" Central España Republicana, Matanzas, Cuba.
 0000-0002-6458-7627.

3 Instituto de Investigaciones Agro-Forestales, Estación Experimental Agro-Forestal Cruce de los Baños, Tercer Frente, Santiago de Cuba, Cuba.
 0000-0002-1136-8762.

4 Instituto de Investigaciones Agro-Forestales, Estación Experimental Agro-Forestal Jibacoa, Manicaragua, Villa Clara, Cuba.
 0000-0001-8532-8678.

desarrollo de los cafetos. Al asperjar mensualmente el bioproducto se disminuyó en un 57,2% y 45,8% el índice de infestación y de distribución respectivamente de la mancha de hierro en comparación al control. En la roya la aplicación mensual y bimensual disminuyó en un 69,5% y 65,8% respectivamente el índice de infestación y en un 60,6% y 57,9% de igual manera el índice de distribución. **Conclusiones.** Las aspersiones mensuales con del bioproducto es una alternativa ecológica a emplear en el primer año de plantado el café al controlar la roya, la mancha de hierro con una tendencia a mejorar el desarrollo de las plantas.

INTRODUCCIÓN

En Cuba es necesario incrementar los niveles de producción de café, por lo que es de gran importancia la mejora de la fertilidad de los suelos, el desarrollo de una agricultura sustentable con la máxima utilización de los recursos de las fuentes renovables, y el empleo de los abonos orgánicos (Fernández *et al.* 2018).

Entre los factores que pueden afectar los rendimientos del café, está el manejo inadecuado en la aplicación de fertilizantes sintéticos y orgánicos. Según Rosas *et al.* (2008) la nutrición influye directamente en el tamaño y la cantidad de los granos cosechados. Además, Indacochea (2018) expresó que la roya (*Hemileia vastratix* Berk & Br.) y la mancha de hierro (*Cercospora coffeicola* Berk. & Curt) afectan al área foliar de las plantas de café, disminuyen de esta manera su capacidad fotosintética, su producción y en ataques fuertes ocasionan la muerte de las plantas.

Generalmente la roya ocasiona pérdida de hojas y rendimientos de hasta el 50% y el 30% respectivamente, en algunas variedades de *Coffea arabica* L. (Ramírez *et al.* 2020), mientras que la mancha de hierro en la etapa de almácigo puede causar defoliación de la planta

and rust). **Results.** Monthly application showed a tendency to improve the development of coffee trees. When sprinkling the bioproduct monthly, the infestation and distribution index of the iron stain decreased by 57,2% and 45,8%, respectively, compared to the control. In rust, the monthly and bimonthly application of the decreased the infestation index by 69,5% and 65,8%, respectively, and the distribution index by 60,6% and 57,9%, in the same way. **Conclusions.** Monthly sprinkling with is an ecological alternative to be used in the first year of coffee planting to control rust, the iron stain with a tendency to improve plant development.

hasta del 90% y en plantaciones a libre exposición solar y con limitación en la disponibilidad de nutrientes, puede causar pérdidas hasta del 30% en la cosecha (Rengifo *et al.* 2006).

Es así como el desarrollo y aplicación de agentes biocontroladores adquiere importancia como alternativa en el desarrollo de una agricultura sostenible, por sus efectos favorables en el medio ambiente. Contrariamente la utilización masiva de los productos convencionales para el control de plagas es uno de los problemas más graves en materia ecológica, ya que el uso de estos ha demostrado que perjudica a la flora, la fauna, los recursos hídricos y la salud humana (Rodríguez *et al.* 2018).

Por su parte, los microorganismos eficientes (ME) comprenden una gran diversidad microbiana representada por bacterias ácido lácticas, bacterias fotosintéticas, levaduras, actinomicetes y hongos filamentosos con actividad fermentativa. Tienen numerosas aplicaciones agrícolas (Tanya y Leiva 2019).

La tecnología de ME ha sido investigada, desarrollada y aplicada en diversos usos agropecuarios y ambientales, en más de 80 países del mundo, entre ellos Cuba, que en los últimos años ha desarrollado investigaciones

relacionadas con la temática de microorganismos eficientes (Mesa 2020).

El uso de los ME como biofertilizantes se ha convertido en una práctica común entre las estrategias de manejo agrícola sostenible. De esta tecnología surge una variada gama de productos como los fertilizantes orgánicos fermentados, abonos fermentados, biofermentos y lactofermentos, así como unas marcas registradas por la Estación Experimental de Pastos y Forrajes, Indio Hatuey, Cuba. El producto se utiliza en la producción y sanidad de vegetales, en el tratamiento de residuales líquidos y sólidos, así como en la producción y salud animal (Tellez y Orberá 2018).

La aplicación quincenal del producto en posturas de cafeto en una dosis de 2 ml.m⁻² incrementó en un 10,9% los pares de hojas verdaderas, en un 19,4% la altura de las plantas, en un 22,9% el área foliar y en un 32,4% la relación masa seca de la planta/ masa seca de la raíz (Álvarez y Damião 2018).

En Cuba aún son insuficientes los conocimientos adquiridos sobre el empleo de ese producto registrado en la caficultura y por tal motivo esta investigación se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de frecuencia de aplicaciones del bioproducto indicado en el desarrollo de cafeto y el control de enfermedades en su primer año de plantado.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se desarrolló desde agosto del 2017 hasta agosto del 2018 en el banco de semilla de la Estación Experimental Agro-Forestal de la localidad de Jibacoa a 340 msnm, perteneciente al municipio Manicaragua, provincia Villa Clara, Cuba.

El área se caracterizó por tener sombra predominante de guamo (*Inga vera* Wild.) y un suelo Fersialítico Pardo Rojizo de baja fertilidad (Tabla 1).

Tabla 1. Características agroquímicas del suelo Fersialítico Pardo Rojizo del área experimental en el momento que se desarrolló la investigación (media de 3 muestras).

pH en cloruro de potasio (pH KCl)	Materia orgánica (%)	Fósforo asimilable (P ₂ O ₅)	Potasio asimilable (K ₂ O)	Calcio (Ca ⁺⁺)	Magnesio (Mg ⁺⁺)
		mg 100 g ⁻¹ de suelo		Cmol.kg ⁻¹ de suelo	
4,07	2,38	14,38	7,79	4,7	1,7

Para el establecimiento de las posturas de cafeto (*Coffea arabica* L. var. Isla 5-4) se hicieron hoyos de 30 cm de profundidad y 40 cm de ancho a un marco de plantación de 2 m de camellón por 1,50 m de narigón. En cada hoyo se aplicaron 4,5 kg de abono orgánico y 58 gramos de superfosfato triple el cual fueron mezclados con el suelo en el momento de la plantación. En mayo del 2018 se fertilizó con la fórmula 7-14-7 a la misma dosis que el superfosfato triple.

El bioproducto utilizado posee microorganismos nativos, derivados de la introducción, adaptación y diseminación de la tecnología

desarrollada en Japón, país donde se ha utilizado una mezcla de microorganismos eficientes como biofertilizante, probiótico, antiséptico, y limpieza de residuales líquidos de la agricultura y el turismo. En Cuba se adoptó mediante microorganismos de estratos bajos de bosques no perturbados o poco intervenidos por personas y con sustratos nacionales locales. La fórmula fue generada en la Estación Experimental Indio Hatuey con marca registrada por la Oficina Nacional de la Propiedad Industrial (Díaz *et al.* 2020). El experimento se realizó con el lote IH-20 de inóculo líquido procedente de esta entidad.

El bioproducto fue aplicado al follaje y al suelo a razón de 5 L.ha⁻¹, a una concentración del 2% a partir del primer mes de establecida la plantación (agosto) mediante los tratamientos siguientes:

- 1- No aplicación del bioproducto (Control).
- 2- Aplicación mensual del bioproducto.
- 3- Aplicación bimensual del bioproducto.
- 4- Aplicación trimestral del bioproducto.

Los tratamientos estuvieron distribuidos en un diseño de bloques al azar con 3 réplicas, cada uno estuvo conformado por 21 plantas (3 surcos con 7 plantas); al año de plantado el café, en 4 plantas centrales para evaluar lo siguiente:

- 1- Altura (cm). Se midió desde la base del tallo hasta el ápice de la planta.
- 2- Diámetro del tallo (cm). Se midió a 5 cm de la superficie del suelo.
- 3- Diámetro de la copa (cm). Se midió de este a oeste y de norte a sur por las ramas de mayor longitud y se promediaron.

- 4- Enfermedades. Mancha de hierro (*Cercospora coffeicola* Berk. & Curt.) y roya (*Hemileia vastatrix* Berk & Br.). Se determinó para cada una, el índice de infestación (%II) y de distribución (%ID) con el uso de las metodologías citadas por Arañó y Bustamante (2010) y Arañó *et al.* (2017).

$$\%II = \sum (A*B) / (N*K)*100$$

Donde

A = Grado de la escala (Tabla 2 y 3)

B = Cantidad de hojas afectadas por la mancha de hierro en cada grado

N = Número de hojas evaluadas

K = Último grado de la escala

$$\%ID = (THA / THO) * 100$$

Donde

THA = Total de hojas afectadas

THO = Total de hojas observadas

Tabla 2. Escala utilizada para el índice de infestación de la mancha de hierro.

Grado	Descripción del criterio
0	Hojas sanas
1	Hojas con 1-2 puntuaciones carmelitas, del 1-5% de la superficie foliar manchada
2	De 1-2 puntuaciones de 5-14 mm aproximadamente, 6-10% de la superficie foliar manchada
3	Hasta 3 manchas de 5-14 mm de diámetro aproximadamente 11-25% de la superficie foliar manchada
4	Del 26-35% de la superficie foliar manchada y de un 25-50% de defoliación en la planta
5	Mayor del 36% de la superficie foliar manchada y más del 50% de la planta defoliada

Tabla 3. Escala utilizada para el índice de infestación de la roya.

Grado	Descripción del criterio
0	Hojas sanas
1	Hojas con un cuadrante afectado por roya con un mínimo de una pústula en cada hoja (1-5%)
2	Hojas con 2 cuadrantes afectados por roya con un mínimo de una pústula en cada hoja (6-20%)
3	Hojas con 3 cuadrantes afectados por roya; como mínimo cada hoja tendrá 3 pústulas situadas cada una en diferentes cuadrantes (21-50%)
4	Todas las hojas afectadas por roya, es decir, sus 4 cuadrantes; por tanto, cada hoja tendrá como mínimo 4 pústulas distribuidas en los 4 cuadrantes (>50%)

A los datos se les realizó la prueba de normalidad y homogeneidad de varianza. La comparación de las medias se realizó mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan con un nivel de confianza del 95%. Los valores porcentuales fueron transformados previamente al análisis a $\arccos \sqrt{p}$, y se muestran en la tabla de los resultados los valores sin transformar. El procesamiento estadístico de los datos se realizó con el programa InfoStat versión 1.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El bioproducto registrado, no tuvo una influencia significativa sobre el desarrollo de los cafetos, pero sí se observó una tendencia de mejora en la altura, el diámetro del tallo y el diámetro de la copa con las aplicaciones. Los valores numéricamente más bajos se identificaron en el tratamiento que no se asperjó el bioproducto mientras que los más elevados se obtuvieron con la aspersión mensual (Tabla 4).

Tabla 4. Influencia de las frecuencias de aplicación del IHPLUS® en los índices morfológicos de las plantas de café (cm).

Tratamientos	Atura	Diámetro del tallo	Diámetro de la copa
Sin aplicación (Control)	79,92	1,73	89,54
Aplicación mensual	83,08	1,84	97,79
Aplicación bimensual	80,63	1,83	92,88
Aplicación trimestral	82,00	1,82	96,63
C.V. %.	8,38	9,73	9,91
E.E.	1,97 ns	0,05 ns	2,69 ns

^{ns} no significativo para $p \leq 0,05$.

Los resultados indican que el producto presentó efectos sobre el desarrollo de las plantas de café en su primer año de plantado, pues se minimizó por la cantidad de abono orgánico y fertilizante depositado en el hoyo en el momento de la plantación. Ferrás *et al.* (2020) expresaron que el efecto de la aplicación de este bioproducto podría ser marcado en función de la fertilidad de los sustratos, ya que con su aplicación obtuvieron diferencias más evidentes en el desarrollo de posturas de café en sustratos con 3,53% de materia orgánica que en los que tenía un porcentaje del 5,83%.

Adicionalmente se ha identificado que la aplicación de bioproductos incrementan la floración, el crecimiento y desarrollo de los frutos; garantizan una reproducción exitosa en las plantas, mejoran la estructura física y la fertilidad química de los suelos, suprimen a varios agentes fitopatógenos causantes de enfermedades, aumenta la actividad fotosintética, la absorción

de agua y nutrientes en las plantas; reducen los tiempos de maduración de abonos orgánicos, lo cual favorece distintas actividades agrícolas (Tanya y Leiva 2019).

Las aplicaciones del bioproducto expusieron efectos beneficiosos y significativos en el control de la mancha de hierro. Cuando fueron evaluadas, para cada mes hubo evidencia de que disminuyó en un 57,2% y 45,8% el índice de infestación y de distribución respectivamente de esta enfermedad en comparación con el tratamiento que no se le asperjó el bioproducto (Figura 1A, B).

Entre las 3 frecuencias de aplicación no se evidenciaron diferencias en el índice de infestación y de distribución de la mancha de hierro. A medida que se hicieron más distantes las aspersiones, hubo una tendencia de incremento de los valores medios de estas variables, hasta no existir diferencias entre las aplicaciones realizadas cada 2 y 3 meses con el control (Figura 1A, B).

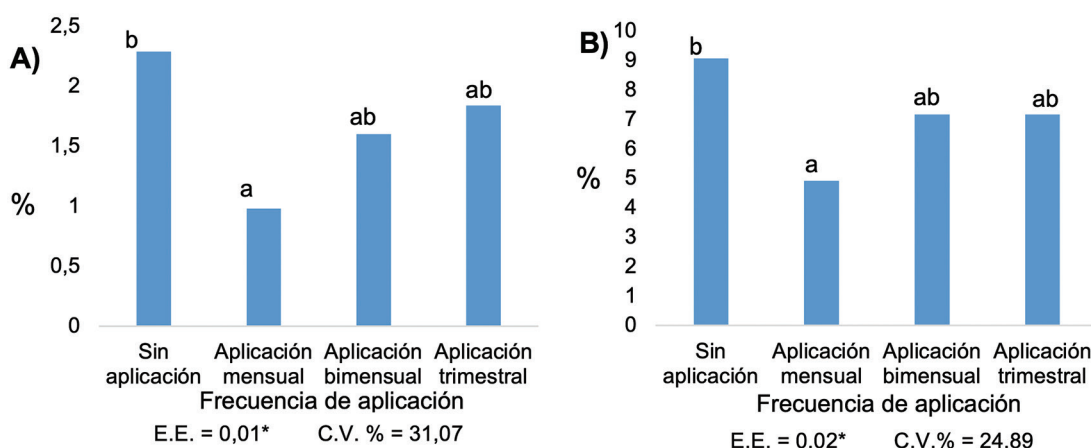


Figura 1. Influencia de las frecuencias de aplicación del bioproducto en el A) índice de infestación y B) índice de distribución de la mancha de hierro.

* Barra con letras iguales; sus medias no difieren entre sí en la prueba de Duncan para $p \leq 0,05$.

Según Chagas *et al.* (1996) con la aplicación de Bokashi más microorganismos eficientes redujeron significativamente la cantidad de hojas enfermas con mancha de hierro en posturas de la especie *Coffea canephora* cv. Conilon, y disminuyeron en un 96,64% el índice de distribución de esta enfermedad en comparación al control. Dichos autores asociaron esos efectos al mayor vigor de las posturas tratadas lo que las hace menos susceptible al ataque del patógeno.

Las aspersiones del bioproducto aplicado en la presente investigación mostró que se controló la roya. Con su aplicación todos los meses y bimensual se obtuvieron resultados similares y diferentes significativamente al tratamiento

sin aplicación. Estos tratamientos disminuyeron en un 69,5% y 65,8% respectivamente el índice de infestación y en un 60,6% y 57,9% de igual manera el índice de distribución en comparación con el tratamiento sin aplicación (Figura 2 A, B).

Cuando se distanció el periodo de aplicación para una vez cada 3 meses, no hubo control de la roya pues hubo índices de infestación y de distribución similares estadísticamente al tratamiento sin aplicación (Figura 2 A, B). Se corroboró lo expuesto por Tanya y Leiva (2019) al citar que los ME inducen mecanismos de eliminación de las enfermedades en las plantas, ya que pueden inducir la resistencia sistémica de los cultivos sobre ella.

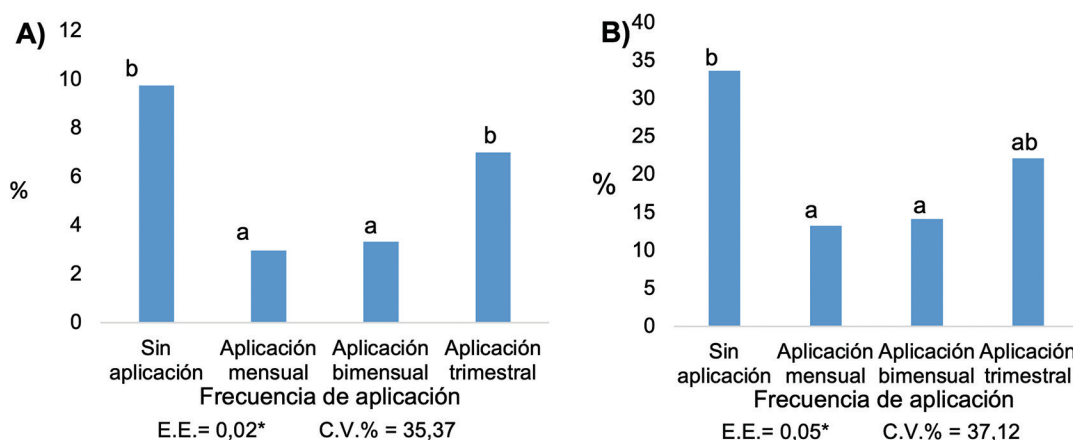


Figura 2. Influencia de las frecuencias de aplicación del bioproducto en el A) índice de infestación y B) índice de distribución de la roya.

* Barra con letras iguales; sus medias no difieren entre sí en la prueba de Duncan para $p \leq 0,05$.

Estudio de Martínez *et al.* (2016) señala que cuando asperjaron plantas de café con ME al 5% redujeron el índice de distribución de la roya en un 27,7%, mientras que en las no tratadas, hubo incremento al 66,07%. Encontraron que la severidad de la enfermedad disminuyó en un 60,93% en las plantas asperjadas con el bioproducto en comparación a las que no lo recibieron. Estos resultados indican el papel controlador de los ME sobre la roya.

Según lo anterior, se evidencia que los microorganismos eficientes tienen un efecto positivo para el control de la roya. En cafetales donde no se aplicaron bioproductos se encontraron solamente troncos sin hojas ni brotes, mientras que en aquellas parcelas tratadas se hallaron cafetos verdes con muchos brotes para nueva floración (Schwentenius *et al.* 2014).

Los resultados confirman que los ME pueden convertirse en un complemento importante del manejo ecológico de enfermedades de los cultivos al presentar potencialidades demostradas para la reducción del empleo de productos químicos (Mesa 2020).

CONCLUSIONES

Las aspersiones mensuales son una alternativa ecológica para emplear en el primer año de plantado el café, controlar la roya, y asimismo, la mancha de hierro con tendencia a mejorar el desarrollo de las plantas.

LITERATURA CITADA

- Álvarez, JL; Damião, JC. 2018. Producción de posturas de café con la aplicación de microorganismos eficientes en Angola (en línea). Centro Agrícola 45(2):29-33. Consultado: 12 abr. 2021. Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/cag/v45n2/cag04218.pdf>
- Arañó, L; Bustamante, CA. 2010. Comportamiento de *Cercospora coffeicola* (berk. y cooke) en plantaciones desocadas de *Coffea canephora* Pierre ex Froehner bajo sistema de fertilización. Café y Cacao 9(1):3-7.
- Arañó, L; Prieto, D; Rodríguez, F. 2017. Situación epidemiológica de la roya del caféto (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome). Café y Cacao 16(1):44-49.
- Chagas, PRR; Tokeshi, H; Zonatti, NH. 1996. Production of plants of *Coffea canephora* cv conilon with conventional fertilizer (Chemical) (en línea).

- Consultado: 2 jun. 2020. Disponible en <http://www.infrc.or.jp/knf/PDF%20KNF%20Conf%20Data/C5-4-171.pdf>
- Díaz, M; Martín, GJ; Miranda, T; Fonte, L; Lamela, L; Montejó, IL; Contino, Y; Ojeda, F; Medina, R; Ramírez, WM; Lezcano, LC; Pentón, G; Peter, H; Alonso, O; Catalá, R; Milera; MC. 2020. Obtención y utilización de microorganismos nativos: el bioproducto IHPLUS. [sesión de conferencia]. Proyecto Biocarbono Cuba. Consultado 13 mar. 2020. Disponible en https://www.researchgate.net/publication/339916260_Obtencion_y_utilizacion_de_microorganismos_nativos_el_bioproducto_IHPLUS_R
- Fernández, I; Verdecia, MJ; González, R. 2018. Caracterización socioproductiva de la UBPC Cafetalera La Silla. *Café Cacao* 17(1):44-54.
- Ferrás, Y; Díaz, M; Guerra, C; Bustamante, CA; Ortiz, N. 2020. Efecto de bioproducto en la germinación de semillas y desarrollo de posturas de *Coffea arabica* L. *Ingeniería Agrícola* 10(4):31-35.
- Indacochea, LL. 2018. Análisis de la tolerancia a la presencia de cuatro enfermedades foliares en 20 variedades e híbridos de café arábigo (*Coffea arabica*) (en línea). Tesis para optar por el título de ingeniero agrónomo. Universidad Estatal del Sur de Manabí, Ecuador. 83 p. Consultado: 24 set. 2021. Disponible en <http://repositorio.unesum.edu.ec/bitstream/53000/1281/1/UNESUM-ECUADOR-AGROPECUARIA-2018-11.pdf>
- Martínez, A; Agustín, J; Puertas, FV; Montañez, G. 2016. Influencia de los microorganismos eficaces, fertilizantes foliares y bioestimulantes en el manejo de la roya amarilla del café (*Hemileia vastatrix* Berkeley & Broome). Tesis para optar por el título de ingeniero agrónomo. Montano, Perú, Universidad Nacional del Centro del Perú. 72 p.
- Mesa, JR. 2020. Microorganismos eficientes y su empleo en la protección fitosanitaria de los cultivos (en línea). *Científica Agroecosistemas* 8(2):102-109. Consultado: 25 set. 2020. Disponible en <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/download/407/386/>
- Ramírez, RF; Castañeda, E; Robles, C; Santiago, GM; Pérez, MI; Lozano, S. 2020. Efectividad de biofungicidas para el control de la roya en plántulas de café. *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas* 11(6):1403-1412. DOI: <https://doi.org/10.29312/remexa.v11i6.2614>
- Rengifo, HG; Leguizamón, JE; Riaño, NM. 2006. Incidencia y severidad de la mancha de hierro en plántulas de *Coffea arabica* en diferentes condiciones de nutrición (en línea). *Cenicafé* 57(3):232-242. Consultado: 11 jun. 2020 Disponible en <http://www.cenicafe.org/es/publications/arc057%2803%29232-242.pdf>
- Rodríguez, Y; Vázquez, E; González, ME; Simón, F. 2018. Producción in vivo de nemátodos entomopatógenos para el control de la broca del café a partir de la larva del insecto *Galleria mellonella* L., 1758 (Lepidoptera: Pyralidae). *Café Cacao* 17(2):40-49.
- Rosas, J; Escamilla, E. Ruiz, O. 2008. Relación de los nutrientes del suelo con las características físicas y sensoriales del café orgánico (en línea). *Terra Latinoamericana* 26(4):375-384. Consultado: 24 jul. 2019. Disponible en <http://www.scielo.org.mx/pdf/tl/v26n4/v26n4a10.pdf>
- Schwentesius, R; Gómez, MA; Noriega, G; Reyes, V; Gómez, L; Montoya, N; Valeriano, A. 2014. Microorganismos eficientes frente a la roya del café (en línea). Centro de Investigaciones Interdisciplinarias para el Desarrollo Rural Integral (CIIDRI), Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Consultado: 4 set. 2019. Disponible en <https://agua.org.mx/microorganismos-eficientes-frente-a-la-roya-del-cafe/>
- Tanya, M; Leiva, M. 2019. Microorganismos eficientes, propiedades funcionales y aplicaciones agrícolas (en línea). *Centro Agrícola* 46(2):93-103. Consultado: 16 jun. 2021. Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/cag/v46n2/0253-5785-cag-46-02-93.pdf>
- Tellez, T; Orberá, T. 2018. Efecto estimulador del crecimiento de dos biopreparados biotecnológicos en cultivos de remolacha (*Beta Vulgaris* L.) (en línea). *Química* 30(3):483-494. Consultado: 11 jun. 2019. Disponible en <http://scielo.sld.cu/pdf/ind/v30n3/ind08318.pdf>



Agronomía Costarricense. Universidad de Costa Rica. Se encuentra licenciada con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr

Crotalaria spectabilis ROTH COMO COBERTURA EN CAFÉ (*Coffea arabica* L) PARA EL MANEJO DE MALEZAS*

Robin Gómez-Gómez^{1/**}, Eric Chaves-Sánchez²,
María Isabel González-Lutz³

Palabras clave: Manejo integrado de malezas; abonos verdes; cultivos de cobertura; herbicidas pre y posemergentes.

Keywords: Integrated weed management; green manure; cover crops; pre and post emergence herbicides.

Recibido: 16/12/2021

Aceptado: 18/05/2022

RESUMEN

Introducción. El establecimiento de cultivos de cobertura como *Crotalaria spectabilis* es una práctica agroecológica con múltiples beneficios agronómicos y ambientales. **Objetivos.** Evaluar el efecto de 3 métodos de siembra de *C. spectabilis* en café en el control de malezas, acúmulo de nitrógeno y fijación de carbono. Además, determinar el periodo de espera entre el control de malezas y la siembra de *C. spectabilis*, y la tolerancia de *C. spectabilis* a herbicidas post emergentes. **Materiales y métodos.** El primer experimento se realizó en Orosi, Costa Rica, en el 2017. *C. spectabilis* fue sembrada mediante 3 métodos en medio de las hileras de siembra del café. El segundo experimento se realizó en un invernadero en Alajuela, en el 2018. Se aplicó glifosato, glufosinato de amonio y diquat sobre pots llenos con suelo. Luego de 0, 4 y 8 días se sembró *C. spectabilis* con y sin cobertura de suelo. En el tercer experimento se sembraron en pots semillas de *C. spectabilis*; cuando las

ABSTRACT

***Crotalaria spectabilis* Roth as a cover crop in coffee (*Coffea arabica*) and weed control.**

Introduction. The establishment of cover crops like *C. spectabilis* is an agroecological practice with multiple agronomic and environmental benefits. **Objectives.** To evaluate the effect of 3 *C. spectabilis* planting methods in coffee on weed control, nitrogen accumulation, and carbon fixation. Also, to determine the period between weed control and *C. spectabilis* sowing, and the tolerance of *C. spectabilis* to postemergence herbicides. **Materials and methods.** The first experiment was carried out in Orosi, Costa Rica, in 2017. *C. spectabilis* was planted in between coffee planting rows using three methods. The second experiment was carried out in a greenhouse in Alajuela, in 2018. Herbicides glyphosate, glufosinate ammonium, and diquat were sprayed over pots filled with soil. *C. spectabilis* was planted 0, 4 and 8 days after spraying, both covered with soil and without cover. For the

* Este trabajo formó parte del proyecto de investigación 736-B8-163 de la Universidad de Costa Rica.

** Autor para correspondencia. Correo electrónico: robin.gomezgomez@ucr.ac.cr

1 Universidad de Costa Rica, Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno, Alajuela, Costa Rica.  0000-0002-8543-8137.

2 Universidad de Costa Rica, Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno, Alajuela, Costa Rica.  0000-0002-5453-3799.

3 Universidad de Costa Rica, Escuela de Estadística, San Pedro, Costa Rica.  0000-0002-3073-7746.

las plantas tenían 2, 3 y 4 hojas verdaderas se aplicó fluazifop-p-butil, cletodim y bentazona, asimismo las mezclas fluazifop-p-butil + bentazona y cletodim + bentazona. **Resultados.** En Orosí, todos los tratamientos lograron una reducción de cobertura de malezas menor al 26%, en comparación con el testigo. La tasa de crecimiento relativo de *C. spectabilis* fue baja y similar en las 3 metodologías de siembra. La acumulación de nitrógeno y la absorción de CO₂ fue mayor en el tratamiento de hileras tapadas (81,46 kg.ha⁻¹ N y 6,20 t.ha⁻¹ CO₂, respectivamente). En invernadero, no se observó un efecto negativo de ningún herbicida sobre la germinación ni el crecimiento de *C. spectabilis*. **Conclusión.** Debido a la competencia con las malezas, no fue posible establecer *C. spectabilis* como cobertura en café, sin embargo el uso de los herbicidas evaluados en invernadero permitieron controlar las malezas.

INTRODUCCIÓN

Las malezas son plantas que interfieren directa o indirectamente con el cultivo, que causan disminuciones en los rendimientos obtenidos por los sistemas agrícolas (Salazar e Hincapié 2005). Por este motivo se implementan programas de control principalmente sintéticos, que representan altos costos de inversión y que pueden llegar a ser perjudiciales para el medio ambiente. En el cultivo de café el uso de herbicidas para el control de malezas es una práctica que se implementa año con año y representa un porcentaje importante de los costos de inversión (Sánchez y Gamboa 2004). En fincas de café de Costa Rica, por ejemplo, el control de malezas representó alrededor de un 13% del total de los costos del paquete tecnológico durante la cosecha 2018-2019 (ICAFE 2019).

Los cultivos de cobertura son una alternativa para el manejo de malezas en plantaciones de café de siembras nuevas porque evitan o

third experiment *C. spectabilis* was planted in pots, and when the plants had 2, 3, and 4 leaves, the herbicides fluazifop-p-butyl, clethodim, and bentazon, and the mixes fluazifop-p-butyl + bentazon and clethodim + bentazon were sprayed. **Results.** In Orosí, weed cover was reduced in all treatments by less than 26%, compared to the control. *C. spectabilis* relative growth rate was low and similar in the 3 planting methods. Nitrogen accumulation and carbon absorption was highest in the covered rows (81.46 kg.ha⁻¹ N and 6.20 t.ha⁻¹ CO₂, respectively). In the greenhouse, no negative effect on seed germination or plant growth of *C. spectabilis* was observed by any treatment. **Conclusion.** Due to weed competition, it was not possible to establish *C. spectabilis* as a cover crop in coffee, however herbicides evaluated in a greenhouse could potentially control those weeds.

limitan el crecimiento de malezas sobre el suelo al restringir el espacio de crecimiento de otras especies que compiten por agua, luz y nutrientes (Recalde *et al.* 2015). Además, favorecen el ambiente microbiano del suelo, evitan o minimizan la erosión, mantienen la humedad del suelo y aportan nutrientes (Meschede *et al.* 2007).

En las fincas cafetaleras también se debe invertir en la fertilización del café para abastecer sus requisitos nutricionales. El nitrógeno es el elemento cuya dosis de aplicación recomendada es la más alta en el cultivo. La fertilización con este elemento se considera muy importante para el desarrollo vegetativo de las plantas de café y comúnmente es considerado como de mayor impacto en la producción. La dosis de aplicación varía entre los 150 y 350 kg.ha⁻¹ (Molina 2001, Chaves 2008, Bertsch 2009). Consecuentemente, el establecimiento y posterior corta de cultivos de cobertura puede ser utilizado como abono verde; estas son prácticas comunes en producción agroecológica de café. El uso de plantas de la familia

Fabaceae, también llamadas leguminosas, en asocio con el cultivo permite complementar la fertilización al impulsar la fijación biológica de nitrógeno debido a su asociación simbiótica con microorganismos del suelo, como por ejemplo diversas especies del género *Rhizobium* (Guzmán y Alonso 2008, Silva *et al.* 2013).

La producción de café emite altas cantidades de carbono que se dan principalmente producto de la fertilización nitrogenada y durante la fase de beneficiado, las cuales afectan el ambiente al incidir directamente en la emisión de gases de efecto invernadero (Segura y Andrade 2012). En los últimos años se han iniciado esfuerzos por parte de gobiernos, además de instituciones públicas y empresas privadas, mediante los cuales se busca incentivar a las empresas agrícolas a implementar medidas que reduzcan y compensen las emisiones de carbono y alcancen la mención de carbono neutral. Las empresas que demuestren neutralidad de carbono recibirán una certificación que les permitirá acceder a mejores mercados por destacarse en la mitigación del calentamiento climático y la protección de la biosfera (ICAFE 2015).

Con la utilización de coberturas en el cultivo de café se podría encontrar una compensación para las emisiones de carbono, pues el tejido de las plantas de cobertura se convierte en biomasa potencial para el secuestro temporal de carbono. Al descomponerse el tejido de la cobertura se aumenta el contenido de carbono orgánico en el suelo (Martins *et al.* 2015), sin embargo, la mayor parte del carbono vuelve a la atmósfera una vez que estas plantas son cortadas. Cuando los residuos de la planta de cobertura son incorporados, las fracciones de carbono orgánico en el suelo aumentarán significativamente más que cuando se les deja sobre la superficie (Wang *et al.* 2015). Hu *et al.* (2016), por su parte, mencionan que se presenta un mayor aporte de carbono orgánico al suelo por parte del sistema radical que de la parte aérea, esto precisamente por su condición de encontrarse bajo el suelo.

Diferentes especies del género *Crotalaria* se han convertido en plantas promisorias para su utilización como cobertura viva en el cultivo de café. Su uso busca implementarse de modo que resulte efectivo en el manejo de malezas y además favorezca las características físicas y de fertilidad del suelo (Jiménez *et al.* 2005a). Además, la producción de biomasa por parte de *Crotalaria spectabilis* puede ser importante para la fijación de carbono temporal cuando se tome en cuenta la población total de plantas por hectárea.

Uno de los puntos críticos para la implementación de un sistema de *Crotalaria spectabilis* como cobertura en entrecalles del cultivo de café es la siembra. Para ello se deben considerar una serie de aspectos que aseguren la realización efectiva del establecimiento de la cobertura. Entre esos aspectos se encuentra un adecuado control inicial que asegure que días después de la siembra las plántulas de *C. spectabilis* se desarrollarán en un escenario libre de interferencia. Además del control inicial, en zonas cafetaleras ubicadas a más de 1200 msnm se debe también realizar control de malezas varias semanas después de la siembra de la semilla, debido a que el crecimiento de las malezas es más rápido que el de *C. spectabilis* en sus estados iniciales.

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de 3 distintos métodos de siembra de *C. spectabilis* en el control de malezas, el acúmulo de nitrógeno y la fijación de carbono. Sin embargo, debido a que la competencia con las malezas en campo y el difícil terreno dificultaron el establecimiento adecuado de la cobertura, se realizaron 2 experimentos posteriores en invernadero para determinar (1) el momento adecuado para realizar la siembra de la semilla de *C. spectabilis* después del control inicial de las malezas del sitio con herbicida, sin que se presente afectación en la germinación y (2) el efecto de herbicidas posemergentes sobre plantas de *C. spectabilis* en diferentes estados de desarrollo, con la finalidad

de facilitar el establecimiento de futuras siembras de esta especie.

MATERIALES Y MÉTODOS

Como parte de este estudio se realizaron 3 experimentos. Entre agosto y diciembre del 2017 se llevó a cabo un experimento en una finca cafetalera en Orosi, Cartago, Costa Rica, para evaluar 3 metodologías de siembra de *C. spectabilis* (Wolf Seeds, Brasil, germinación 78%). Luego, de diciembre 2017 a marzo del 2018, se realizaron 2 experimentos en un invernadero de la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno (EEAFBM), Universidad de Costa Rica, en Alajuela, Costa Rica, para determinar el efecto de diferentes herbicidas en la germinación o crecimiento de *C. spectabilis*.

Experimento 1. Evaluación de 3 metodologías de siembra de *C. spectabilis* en lote cafetalero

Sitio experimental. El trabajo fue llevado a cabo en una finca cafetalera de Orosi, de Cartago, en temporada lluviosa. El área experimental fue de 3000 m² en un lote ubicado en las coordenadas geográficas 9°47'53"N y 83°50'29"O, a 1200 msnm y con una pendiente del 49%, sin presencia de terrazas.

Las plantas de café eran del híbrido H15, de 2 años de edad, sembradas a 2 m entre hileras y 1,5 m entre plantas (densidad de 3333 plantas.ha⁻¹), sin sombra. El control de malezas previo a la siembra de la cobertura se realizó con glifosato (712 g i.a ha⁻¹) aplicado con un equipo del tipo mechero, que no realiza aspersión. Trece días después de la aplicación se realizó la siembra de los tratamientos.

Descripción de los tratamientos. Los 3 métodos de siembra de *C. spectabilis* entre hileras de café fueron (1) siembra en 3 hileras

o surcos tapadas con suelo luego de la siembra, (2) siembra en 3 hileras o surcos sin tapar y (3) siembra al voleo con un aplicador dorsal de granulados de mochila, accionado manualmente por el operario (sembradora). El cuarto tratamiento fue un testigo con libre crecimiento de malezas.

El primer tratamiento se sembró de forma manual, para lo cual se calibró un uso de semilla de aproximadamente 15 kg.ha⁻¹ o 60 semillas por metro lineal, según experiencias preliminares realizadas por los autores. Las hileras se realizaron con una herramienta manual, espaciadas 50 cm entre sí, con una profundidad cercana a 1-1,5 cm en cada surco o hilera, y luego se taparon con suelo.

El segundo tratamiento se sembró con una herramienta confeccionada con reglas de madera en forma de cruz invertida, de 1,60 m de largo y 1 m de ancho. Se fijaron en la sección paralela al suelo 3 recipientes, separados 50 cm entre ellos, con agujeros de tamaño tal que se pudiera dispensar 60 semillas por metro lineal o 15 kg.ha⁻¹ (Figura 1A). No se realizó surco previo a la colocación de la semilla, la cual fue distribuida sin ser tapada en disposición de 3 hileras sobre el suelo.

La siembra al voleo con sembradora se realizó con dispensador dorsal de granos de la marca Guarany (Figura 1B). La densidad de siembra utilizada con la sembradora fue de alrededor 12 kg.ha⁻¹ o 75 semillas m⁻². La sembradora fue regulada en su nivel 1 (agujero de salida más pequeño) y se caminó a una velocidad de 0,4 m.s⁻¹ en las entrecalles de café.

A los 64 días después de la siembra (dds), debido al lento establecimiento de *C. spectabilis* en todos los tratamientos, se realizó una corta alta con cuchillo de las malezas que superaron en altura a esta leguminosa, para favorecer su crecimiento.



Figura 1. Herramienta de madera (A) y dispensador de granulados (sembradora) (B) utilizados para la siembra de *C. spectabilis* como cobertura en plantación de café. Orosi, Costa Rica. 2017.

Diseño experimental. Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar, para lo cual se consideró la pendiente del lote. Se establecieron 5 bloques y 4 tratamientos. Cada unidad experimental fue de 15 m de largo por 10 m de ancho (150 m²) e incluyó 4 entrecalles.

Variables evaluadas

Porcentaje de cobertura. Se determinó el porcentaje de cobertura de *C. spectabilis*, y de malezas de hoja ancha, familia Poaceae (poáceas) y familia Cyperaceae (ciperáceas) con un cuadrante de 1 m² colocado en 5 puntos en cada unidad experimental. Las evaluaciones se realizaron a los 23, 36, 49, 65, 79 y 93 días después de establecidos los tratamientos.

Tasa de crecimiento relativo. Se realizaron muestreos destructivos al azar de 8 plantas de *C. spectabilis*, dentro de cada unidad experimental, en cada una de las fechas indicadas en la variable anterior. Las plantas se dividieron por tejidos (hoja, tallo, raíz), se colocaron de forma separada en bolsas de papel, se secaron en una

estufa a 55°C durante 5 días y se determinó el peso seco por planta.

Se calculó la tasa de crecimiento relativo según Di Benedetto y Tognetti (2016):

$$TCR = \frac{(\ln PS_2 - \ln PS_1)}{(t_2 - t_1)}$$

TCR = tasa de crecimiento relativo

ln = logaritmo natural

PS1 = peso seco de las muestras en t_1 (g)

PS2 = peso seco de las muestras en t_2 (g)

T1 = momento de muestreo 1 (días después de la siembra)

T2 = momento de muestreo 2 (DDS)

Absorción de nitrógeno y de carbono. Se tomaron muestras compuestas de tallos, hojas y raíces de *C. spectabilis* a los 93 DDS por cada tratamiento. Estas muestras fueron llevadas al Laboratorio de Suelos y Foliare del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica, donde se realizó un análisis de carbono-nitrógeno para determinar el porcentaje

de cada uno de estos elementos contenidos en estos tejidos.

El contenido de nitrógeno se calculó según la fórmula (Jiménez *et al.* 2005b):

$$\text{Contenido de nitrógeno} \left(\frac{kg}{ha} \right) = PS * [N] * DP * fc$$

PS = peso seco por planta (g.planta⁻¹)

[N] = tenor de nitrógeno por planta (g.g⁻¹ N)

DP = densidad de plantas (planta.m⁻²)

fc = factor de conversión (10)

El cálculo de absorción de carbono se realizó según Carvajal *et al.* (2014). Se consideró el peso seco por planta, la concentración de carbono en la materia seca y la densidad de plantas por hectárea para estimar el carbono total expresado en toneladas por hectárea. Además, se multiplicó el valor del carbono total por un factor de conversión correspondiente a 3,667, que se obtuvo de la división de la masa molar del CO₂ (44) entre la masa molar del carbono (12), y se estimó la captación de CO₂ en las unidades de toneladas por hectárea.

$$\text{Absorción de carbono} \left(\frac{t}{ha} \right) = PS * [C] * DP * fc$$

PS = peso seco por planta (g.planta⁻¹)

[C] = tenor de carbono por planta (g.g⁻¹ C)

DP = densidad de plantas (planta.m⁻²)

fc = factor de conversión (1/100)

$$\text{Absorción de CO}_2 \left(\frac{t}{ha} \right) = \text{Absorción de carbono} * \frac{MM \text{ CO}_2}{MM \text{ C}}$$

MM CO₂ = masa molar del CO₂ (44)

MM C = masa molar del Carbono (12)

Análisis estadístico. Se calculó el área bajo la curva (ABC) según el método descrito por Navarro (2012) para las variables porcentaje de cobertura de *C. spectabilis* y de malezas totales, así como los valores de tasa de crecimiento relativo. Además, se comparó puntualmente los

valores para la absorción de CO₂ y el contenido de nitrógeno. Fue utilizado el programa JMP (SAS Institute) para realizar un análisis de la varianza (ANOVA) para cada uno de los factores anteriores. Cuando el ANOVA fue significativo se realizaron comparaciones de medias mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5%.

Experimento 2. Evaluación en invernadero del efecto de la aplicación de herbicidas en la germinación y crecimiento de *C. spectabilis*

Al considerar la siembra de *C. spectabilis* como cultivo de cobertura, debe realizarse lo antes posible luego del control de las malezas del sitio con los herbicidas usuales en café; se evaluó qué tan pronto se podría hacer la siembra sin afectar la germinación o crecimiento de las plantas de *C. spectabilis*.

Descripción de los tratamientos. Se evaluaron 3 herbicidas postemergentes no selectivos: glifosato (0,525 g i.a. l⁻¹), glufosinato de amonio (300 g i.a. ha⁻¹) y diquat (400 g i.a. ha⁻¹), los cuales son de uso frecuente en plantaciones de café. Los herbicidas fueron aplicados separadamente sobre potes de 3 litros de capacidad con suelo. Se sembraron 20 semillas por pote de *C. spectabilis* en 3 momentos distintos, a los 0, 4 y 8 días después de la aplicación (DDA) de los herbicidas, además de un testigo sin aplicación de herbicidas. Se incluyó además el factor tipo de siembra: semillas tapadas con suelo distribuidas en 2 hileras en el pote y semillas sin tapar distribuidas sobre la superficie del suelo.

Diseño experimental. Se utilizó un diseño experimental irrestricto al azar, con un arreglo factorial de 3 factores: herbicida a 4 niveles, momento de siembra a 3 niveles y tipo de siembra a 2 niveles. Para cada tratamiento se contó con 5 repeticiones.

Variables evaluadas. Se determinó la proporción de germinación por pote a los 21 DDA y el peso seco por planta a los 52 DDS. Las muestras se secaron en una estufa a 55°C por 72 horas y luego se pesaron.

Análisis estadístico. Se utilizó regresión logística para el análisis de la proporción de germinación. En los casos en que los resultados del análisis lo ameritaron, se evaluaron razones de ventaja para identificar diferencias entre tratamientos (Hosmer y Lemeshow 2000).

Se realizó un análisis de varianza para la variable peso seco y comparación entre promedios de tratamientos mediante la prueba de Tukey, con un nivel de significancia del 5%.

Experimento 3. Efecto de herbicidas postemergentes sobre plantas de *C. spectabilis* en diferentes estados de desarrollo en invernadero

Descripción de los tratamientos. Se sembraron en pots de 3 litros de capacidad 10 semillas de *C. spectabilis*, unos días después se realizó raleo de plantas hasta dejar únicamente 2 plantas por pote para minimizar la competencia intraespecífica. Se utilizó suelo proveniente de un lote agrícola de la EEAFBM. Se evaluaron los herbicidas fluazifop-p-butyl (187,6 g i.a. ha⁻¹)

para el control de malezas de la familia Poaceae, bentazona (3,6 g i.a. ha⁻¹) para control de malezas de hoja ancha y cletodim (1,8 g i.a. ha⁻¹) para control de poáceas, así como las mezclas fluazifop-p-butyl + bentazona y cletodim + bentazona. La aplicación de los herbicidas se realizó en plantas de *C. spectabilis* de diferentes etapas fenológicas: 2, 3 y 4 hojas. Como tratamiento testigo se utilizó el crecimiento de plantas de *C. spectabilis* sin aplicación alguna de herbicidas.

Diseño experimental. Se utilizó un diseño experimental irrestricto al azar con un arreglo factorial de 2 factores: herbicida en 6 niveles y número de hojas en 3 niveles, con 5 repeticiones.

Variables evaluadas. Se estimó el grado de daño provocado por la aplicación de los diferentes tratamientos, con una escala de 1-9, donde 1= planta sana y 9= planta muerta (Tabla 1).

Se realizó un muestreo destructivo de plantas para la determinación de peso seco por planta a los 60 DDS. Las muestras se secaron en una estufa a 55°C por 72 horas y luego se pesaron.

Tabla 1. Escala utilizada en la evaluación de grado de daño de plantas de *C. spectabilis* aplicadas con 3 herbicidas postemergentes (modificado de Camper, 1986). Alajuela, Costa Rica. 2018.

Grado de daño	Sintomatología	Descripción del síntoma
1	Sin efecto	Planta sin daño
2	Síntomas muy ligeros	Lesiones necróticas esporádicas en las hojas
3	Síntomas ligeros	Lesiones necróticas ocasionales en las hojas
4	Síntomas leves o moderados	Lesiones necróticas ocasionales en las hojas Corrugaciones ocasionales en el brote y borde de hojas
5	Daños medios	Lesiones necróticas en algunas de las hojas Corrugaciones presentes en el brote y borde de algunas hojas
6	Daños elevados	Lesiones necróticas en varias de las hojas Corrugación presente en el brote y borde de varias hojas
7	Daños severos	Lesiones necróticas en la mayoría de las hojas Corrugación presente en el brote y borde de la mayoría de las hojas
8	Daños muy severos	Necrosis presente casi en toda el área de las hojas Corrugación presente en el brote y borde de casi todas las hojas
9	Muerte de plantas	Necrosis completa, planta muerta

Análisis estadístico. Tanto para el análisis estadístico del grado de daño como de la materia seca, el modelo estadístico utilizado fue un arreglo factorial de 2 factores: herbicida a 6 niveles y número de hojas a 2 niveles. Debido a que se encontraron efectos significativos, se realizó un análisis de separación de medias y comparación entre tratamientos mediante la prueba de Tukey, con un nivel de significancia del 5%.

RESULTADOS

Experimento 1. Evaluación de 3 diferentes metodologías de siembra de *C. spectabilis* en lote cafetalero

Porcentaje de cobertura. Los porcentajes de cobertura de *C. spectabilis* en las 3 metodologías de siembra nunca fueron lo suficientemente altos como para superar y por lo tanto disminuir el porcentaje de cobertura total de malezas en los diferentes tratamientos (Figura 2).

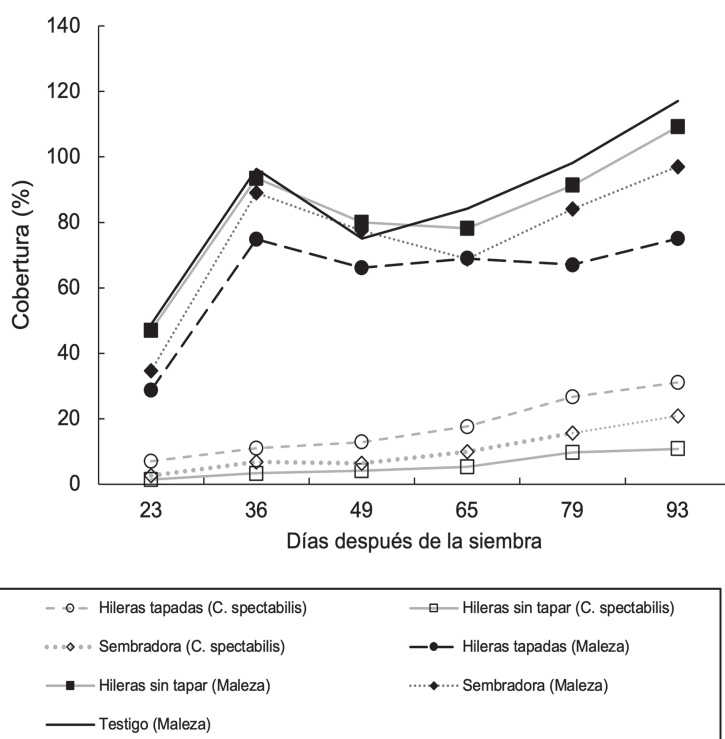


Figura 2. Porcentaje de cobertura de *C. spectabilis* y de malezas totales a través del tiempo en cada uno de los métodos de siembra, así como el testigo sin control de malezas. Orosi, Costa Rica. 2017.

En la evaluación de los 35 DDS sucedió un error de muestreo y se sobreestimó el porcentaje de cobertura de la maleza; sin embargo, el error fue constante en todos los tratamientos. A los 65 DDS se observó un descenso en el porcentaje total de maleza en los tratamientos hileras tapadas y sembradora con respecto a la evaluación anterior, esto se explica por la corta alta de malezas que se realizó una semana antes.

El análisis de varianza de la variable área bajo la curva (ABC) del porcentaje de cobertura de *C. spectabilis* en los 3 métodos de siembra indicó diferencias significativas entre tratamientos ($p=0,0029$), así como el ABC del porcentaje de cobertura de las malezas entre los 4 tratamientos ($p=0,0023$). En el tratamiento de siembra en hileras tapadas se determinó una mayor ABC del porcentaje de cobertura de *Crotalaria spectabilis* en comparación con las otras 2 metodologías de siembra, lo cual coincide con una menor ABC del porcentaje de cobertura de las malezas en ese tratamiento (Tabla 2). Cuando la semilla de *Crotalaria spectabilis* no se tapó, tanto en los tratamientos hileras sin tapar como sembradora, no se observaron diferencias significativas en el ABC del porcentaje de cobertura de la leguminosa ni de las malezas (Tabla 2).

Tabla 2. Área bajo la curva del porcentaje de cobertura de *C. spectabilis* y de las malezas, en los 3 tipos de siembra y en el testigo sin cultivo de cobertura. Orosí, Costa Rica. 2017.

Tratamiento	<i>C. spectabilis</i>	Malezas
Hileras tapadas	1314,20 a*	4948,52 b
Hileras sin tapar	422,28 b	6437,18 a
Sembradora	744,66 b	5794,86 ab
Testigo	---	6675,61 a

*Promedios con igual letra en una misma columna presentan diferencias no significativas entre sí según prueba de Tukey (5%).

Los análisis de varianza del ABC del porcentaje de cobertura de malezas de la familia Poaceae ($p=0,3862$), familia Cyperaceae ($p=0,2677$) y del tipo de malezas hojas anchas ($p=0,3382$) no mostraron diferencias significativas entre los promedios de los tratamientos (Figura 3).

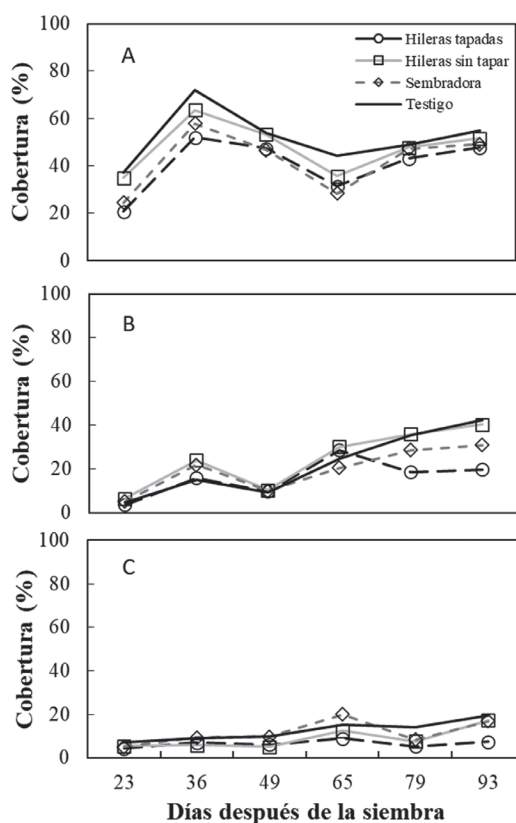


Figura 3. Porcentaje de cobertura de malezas de tipo hoja ancha (A), malezas de la familia Poaceae (B) y familia Cyperaceae (C) en cada metodología de siembra de *C. spectabilis* y en el testigo sin la cobertura.

Orosí, Costa Rica. 2017.

Tasa de crecimiento relativo. El comportamiento de la tasa de crecimiento relativo para cada uno de los tratamientos fue similar a lo largo del tiempo (Figura 4), no se encontraron diferencias significativas entre ellos ($p=0,8008$).

La tasa de crecimiento relativo más alta en las 3 metodologías de siembra en esta muestra se presentó en el periodo comprendido entre los 36 y 49 días después de la siembra.

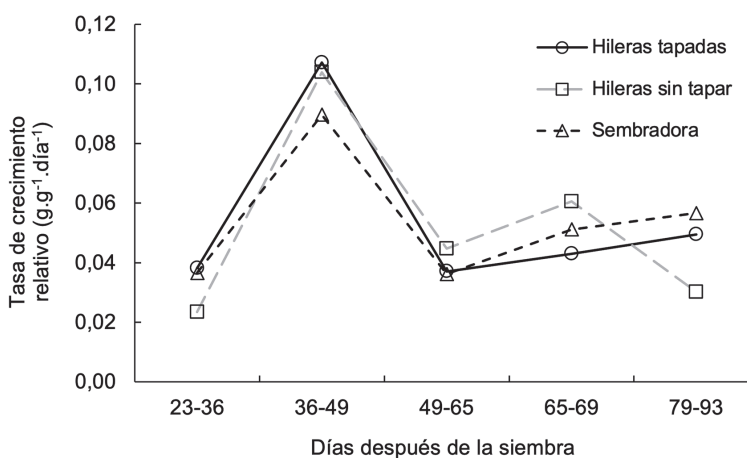


Figura 4. Tasa de crecimiento relativo de *C. spectabilis* en 3 métodos de siembra. Oroso, Costa Rica. 2017.

Contenido de nitrógeno y CO₂. El factor método de siembra en el ANOVA fue significativo ($p=0,0111$). La absorción de CO₂ en las plantas del tratamiento donde se tapó la semilla a la siembra fue significativamente mayor a la

absorción de CO₂ por parte de las plantas en aquellos tratamientos donde la semilla se dejó sobre la superficie del suelo (Tabla 3). Por su parte, la absorción de CO₂ en los 2 tratamientos donde la semilla no se tapó fue similar (Tabla 3)

Tabla 3. Absorción de CO₂ por parte de *C. spectabilis* a los 93 DDS en 3 métodos de siembra. Oroso, Costa Rica. 2017.

Tratamiento	Peso seco (g.planta ⁻¹)	Densidad de plantas (planta.m ⁻²)	Tenor de carbono (g.g ⁻¹ C)	Absorción de carbono (t.ha ⁻¹ C)	Absorción de carbono (t.ha ⁻¹ CO ₂)
Hileras tapadas	4,89 a*	27 a	1,2804 a	1,69 a	6,20 a
Hileras sin tapar	3,97 a	11 b	1,2860 a	0,56 b	2,06 b
Sembradora	5,17 a	18 ab	1,2319 a	1,15 ab	4,21 ab

*Promedios con igual letra en una misma columna presentan diferencias no significativas entre sí según prueba de Tukey (5%).

Acumulación de nitrógeno. La acumulación de nitrógeno por parte de las plantas de *C. spectabilis* en los 3 métodos de siembra fue significativamente diferente ($p=0,0166$). La

acumulación de Nitrógeno fue mayor en plantas sembradas en hileras tapadas y en plantas sembradas con la sembradora (Tabla 4).

Tabla 4. Acumulación de nitrógeno por parte de *C. spectabilis* a los 93 DDS en cada uno de los métodos de siembra. Orosi, Costa Rica. 2017.

Tratamiento	Peso seco (g.planta ⁻¹)	Densidad de plantas (planta.m ⁻²)	Tenor de nitrógeno (g.g ⁻¹ N)	Acumulación de nitrógeno (kg.ha ⁻¹ N)
Hileras tapadas	4,89 a*	27 a	0,0617 a	81,46 a
Hileras sin tapar	3,97 a	11 b	0,0655 a	28,60 b
Sembradora	5,17 a	18 ab	0,0703 a	65,42 ab

*Promedios con igual letra en una misma columna presentan diferencias no significativas entre sí según prueba de Tukey (5%).

Experimento 2. Evaluación en invernadero de aplicación de herbicidas y posterior siembra de *C. spectabilis*

Porcentaje de germinación. La interacción triple *herbicida x tipo de siembra x momento de siembra* resultó no significativa ($p=0,5606$). No hubo un efecto en el porcentaje de germinación de *C. spectabilis* por parte de los herbicidas aplicados en los diferentes momentos de siembra después de la aplicación (Tabla 5). Sin embargo, sí existió una significancia en la comparación por el factor tipo de siembra ($p<0,0001$). Respecto a la frecuencia de germinación, las semillas tapadas resultaron con una razón de ventaja de 9 a 1 sobre las semillas sembradas sin tapar.

Tabla 5. Promedio global, en la muestra, del porcentaje de germinación de plantas de *C. spectabilis* para los factores herbicida, tipo de siembra y momento de siembra. Alajuela, Costa Rica. 2018.

Tratamiento	Germinación (%)
Herbicida (n = 30)	
Glifosato	30
Glufosinato de amonio	27,50
Diquat	27,67
Testigo	26,67
Tipo de siembra (n = 60)	
Semillas tapadas	47,08
Semillas sin tapar	8,83
Momento de siembra (n = 40)	
0 días	26,50
4 días	27,75
8 días	29,62

Materia seca por planta. Ninguna de las comparaciones resultó con diferencias significativas en el peso seco por planta (Tabla 6).

Tabla 6. Promedio global, en la muestra, de materia seca por planta de *C. spectabilis* para los factores herbicida, tipo de siembra y momento de siembra. Alajuela, Costa Rica. 2018.

Tratamiento	Materia seca (g)
Herbicida (n = 30)	
Glifosato	0,2705
Glufosinato de amonio	0,1837
Diquat	0,1459
Testigo	0,2813
Tipo de siembra (n = 60)	
Semillas tapadas	0,2005
Semillas sin tapar	0,2402
Momento de siembra (n = 40)	
0 días	0,1796
4 días	0,2318
8 días	0,2498

Experimento 3. Evaluación en invernadero de aplicación de herbicidas en postemergencia de *C. spectabilis*

Grado de daño. La interacción *herbicida x estado de desarrollo* de las plantas (2, 3 y 4 hojas) al momento de aplicación resultó no significativa para la variable grado de daño ($p=0,3155$). Esta interacción no significativa implica que la relación del grado de daño en los diferentes estados de crecimiento es exactamente la misma para cada uno de los herbicidas aplicados (Figura 5).

La comparación entre los niveles del factor herbicida resultó significativa ($p<0,0001$), sin embargo, esta significancia puede ser considerada como irrelevante desde el punto de vista agronómico, pues al comparar los valores de grado de daño (Figura 5) se encuentra que todos son bajos en la escala de grado de daño utilizada.

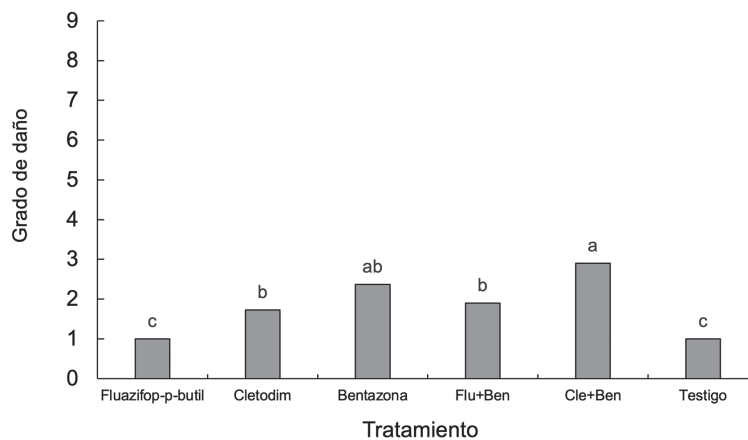


Figura 5. Grado de daño en plantas de *C. spectabilis* causado por la aplicación de herbicidas. Flu+Ben = Fluazifop-p-butil + Bentazona; Cle+Ben = Cletodim + Bentazona. Promedios con igual letra presentan diferencias no significativas entre sí según prueba de Tukey al 5%. Alajuela, Costa Rica. 2018.

Materia seca por planta. La interacción *herbicida x estado de desarrollo* en el momento de realizar la aplicación resultó no significativa ($p=0,1688$). Esta interacción no significativa implica que la materia seca por planta fue similar en los 3 estados de desarrollo en que se encontraba la planta cuando se aplicaron los herbicidas.

Al analizar individualmente cada factor, no se determinaron diferencias significativas entre herbicidas ($p=0,0576$) ni estados de desarrollo ($p=0,2896$) en la producción de materia seca por planta de *C. spectabilis*.

DISCUSIÓN

Al comparar el porcentaje de cobertura de *C. spectabilis* y las malezas presentes en cada uno de los tratamientos se observó que las plantas de *C. spectabilis* no lograron la cobertura suficiente para afectar el crecimiento de malezas. Si bien al sembrar el cultivo de cobertura en hileras tapadas y con sembradora se logró reducir la cobertura de las malezas en un 26% y 13%, respectivamente, con respecto al testigo, la cobertura de las malezas en estas parcelas 93 días después de la siembra fue elevada, un 75% y 97%, respectivamente.

El bajo porcentaje de cobertura de *C. spectabilis* se debió a varios factores. Primero, la germinación de la semilla fue muy baja pues tanto la semilla tapada como la dispersada al voleo y sin tapar, tuvieron un porcentaje de germinación de entre 18% y 24% en los 3 tratamientos, por lo que luego de 93 DDS la densidad de plantas fue de 27, 11 y 18 plantas por metro cuadrado en los tratamientos hileras tapadas, hileras sin tapar y sembradora, respectivamente. Estas cantidades de plantas por metro cuadrado son muy bajas para poder asegurar un cierre efectivo y en el momento oportuno del cultivo cobertura (Uchino *et al.* 2011). Cho *et al.* (2015) encontraron que al sembrar *Crotalaria juncea* a mayor densidad se aumentó la supresión de malezas. Las densidades que utilizaron fueron de 11 kg.ha⁻¹, 28 kg.ha⁻¹ y 45 kg.ha⁻¹. Al igual que en este estudio, se demostró que una mayor densidad de siembra provoca un

incremento en la biomasa que cubre el suelo y por lo tanto una disminución en el crecimiento de malezas (Tripathi *et al.* 2013, Cho *et al.* 2015). Sin embargo, debe considerarse también el costo de la semilla del cultivo de cobertura al decidir la densidad de siembra.

En segundo lugar, la tasa de crecimiento relativa de *C. spectabilis* en el sitio de estudio fue más lenta que en sitios ubicados a menor altitud. En un estudio realizado en Alajuela, Costa Rica, a 840 msnm, se observó que el máximo periodo de crecimiento de esta especie sucedió entre los 28 y 35 DDS (Girardi 2020), mientras que en Orosi, a 1200 msnm, esto sucedió entre los 36 y 49 DDS. En tercer lugar, este lento crecimiento significó una menor producción de biomasa, en comparación con la biomasa producida en zona baja.

Las observaciones sugieren que *C. spectabilis* puede crecer más rápido y producir más biomasa en un corto plazo en zonas del país con temperaturas más elevadas y elevaciones por debajo de los 1000 msnm. Orosi difiere en comparación con estas zonas pues presenta temperaturas más bajas, principalmente durante la noche. Además, la radiación fue probablemente menor por estar ubicado el lote en la ladera de una colina. Al respecto, Di Benedetto y Tognetti (2016) mencionan que entre los factores climáticos que mayor efecto tienen sobre la tasa de crecimiento relativo de las plantas se encuentran la temperatura, la radiación y la concentración de CO₂.

El aporte potencial de nitrógeno de la biomasa de *C. spectabilis*, por otro lado, fue de hasta 81,46 kg.ha⁻¹ N en el tratamiento hileras tapadas. Esta cantidad representa un potencial aporte de nitrógeno que puede llegar a ser aprovechado en cierto porcentaje por las plantas del cultivo de café (Puiatti *et al.* 2015, Silva *et al.* 2013, Rodrigues *et al.* 2012, Recalde *et al.* 2015, Soares *et al.* 2014). En un sistema intercalado de café con *C. spectabilis* Dos Santos *et al.* (2006) reportaron acumulaciones de nitrógeno de 39,2 kg.ha⁻¹ en la parte foliar de la planta, con una densidad promedio de 10 plantas por metro cuadrado. En 2 estudios preliminares (datos no publicados) en Guácimo y Orosi, Costa Rica, los autores

determinaron que al aumentar la densidad de plantas se logra acumular hasta 181 kg.ha⁻¹ N (55 plantas m⁻²) y 240 kg.ha⁻¹ N (80 plantas m⁻²), respectivamente.

Los 3 componentes del cálculo de la acumulación de Nitrógeno y CO₂ por parte de *C. spectabilis* son la materia seca por planta, la concentración (tenor) de N o de CO₂ en los diferentes tejidos de la planta y la densidad de plantas. Se determinó que la diferencia entre metodologías de siembra en el acúmulo de nitrógeno y CO₂ se debió únicamente a la densidad de plantas por metro cuadrado, densidad que fue mayor en el tratamiento hileras tapadas.

Para lograr una densidad de plantas y posterior cobertura del suelo adecuadas, así como abundante biomasa del cultivo de cobertura, será necesario aplicar herbicidas para controlar las malezas del sitio y sembrar *C. spectabilis* lo antes posible. Cuando se aplicaron en invernadero glifosato, glufosinato de amonio y diquat para simular, no se observó un efecto negativo sobre el porcentaje de germinación ni en el peso seco de *C. spectabilis* por parte de ninguno de ellos, aun cuando se realizó la siembra el mismo día que se aplicó. Esto implica que es posible sembrar la semilla el mismo día que se realice la aplicación para el control inicial de malezas. Se determinó, además, que cuando la semilla fue tapada con suelo tuvo una ventaja considerable en la germinación en comparación con la siembra de la semilla sin tapar, pero esto no causó diferencia en el peso seco de las plantas a los 93 DDS. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Braz *et al.* (2016) para el control de malezas antes de la siembra de *C. spectabilis* en Brasil, y con estudios de Timossi *et al.* (2011) con *C. juncea* sembrada tapada con suelo o al voleo.

Los herbicidas evaluados para controlar las malezas en post emergencia causaron un daño muy leve a *C. spectabilis*, daño que desapareció a los pocos días. Las plantas afectadas por cletodim mostraron corrugaciones en sus brotes y los bordes de las hojas más nuevas. Por su parte las plantas afectadas por el herbicida bentazona mostraron puntos necróticos distribuidos en el

haz de las hojas. La sintomatología del grado de daño causado por las mezclas fluazifop-p-butil+bentazona y cletodim+bentazona fue muy similar al provocado por el herbicida bentazona individualmente, por lo que probablemente el efecto causado por estos tratamientos se debió principalmente a la acción de este herbicida. De Carvalho *et al.* (2017), Braz *et al.* (2015) y Braz *et al.* (2016) encontraron también que los herbicidas bentazona y cletodim causan daño fitotóxico bajo en *C. spectabilis* al aplicarlos sobre plantas con una hoja, 3 hojas y 4 hojas verdaderas, respectivamente.

No se determinaron diferencias significativas en el peso seco por planta entre tratamientos. Esto demuestra que a pesar de que visualmente se observaron daños muy leves en algunas hojas después de la aplicación, este efecto fue temporal y no alteró el crecimiento de las plantas de *C. spectabilis*. Estos resultados son similares a los reportados por Gómez y González (datos sin publicar) para el uso de los herbicidas fluazifop-p-butil, cletodim y bentazona. Por su parte, de Carvalho *et al.* (2017), Braz *et al.* (2015) y Braz *et al.* (2016) encontraron que el bentazona en diferentes dosis puede reducir levemente la producción de biomasa seca por planta de *C. spectabilis*, pero concluyen que es un herbicida selectivo para la cobertura.

CONCLUSIONES

De las 3 metodologías de siembra evaluadas en Orosi, el tratamiento hileras tapadas facilitó una mayor cobertura de *C. spectabilis*. Sin embargo, la cobertura lograda no fue suficiente para suprimir el crecimiento y establecimiento de las malezas del sitio, debido a la baja germinación de la semilla, lento crecimiento de las plántulas y por lo tanto deficiente establecimiento de las plantas de la cobertura.

Para lograr tal objetivo, es necesario controlar las malezas adecuadamente antes de la siembra del cultivo de cobertura, con herbicidas como glifosato, glufosinato de amonio y diquat,

y luego sembrar *C. spectabilis* tan pronto como sea posible, incluso el mismo día de la aplicación.

Una vez que *C. spectabilis* ha emergido, es posible controlar tanto malezas de hoja ancha como especies de las familias Poaceae y Cyperaceae con los herbicidas post emergentes cletodim, fluaizop-p-butil y bentazona, ya sea en aplicaciones separadas o en mezcla, desde estados tempranos de desarrollo de *C. spectabilis*. La germinación, emergencia y establecimiento de *C. spectabilis* dependerá también de otros factores bióticos y abióticos que también deben manejarse.

Aún cuando la cobertura de *C. spectabilis* lograda en este estudio no fue satisfactoria, el aporte potencial de nitrógeno de la biomasa de esta especie fue de hasta 81,46 kg.ha⁻¹ N en el tratamiento hileras tapadas.

LITERATURA CITADA

- Bertsch, F. 2009. Absorción de nutrientes por los cultivos. San José, Costa Rica, Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo. 308 p.
- Braz, GP; Oliveira, RS; Constantin, J; Takano, HK; Chase, CA; Fornazza, FGF; Raimondi, RT. 2015. Selection of herbicides targeting the use in crop systems cultivated with showy *Crotalaria*. *Planta Daninha* 33(3):521-534.
- Braz, GP; Oliveira, RS; Constantin, J; Takano, HK; Godinho, FB. 2016. Selectivity of herbicides applied in post-emergence of showy *Crotalaria*. *Revista Caatinga* 29(4):918-926.
- Camper, N. 1986. Research methods in weed science. 3ª edición. Illinois, Estados Unidos, Southern Weed Science Society. s.p.
- Carvajal, M; Mota, C; Alcaraz, C; Iglesias, M; Martínez, M. 2014. Investigación sobre la absorción de CO₂ por los cultivos más representativos de la Región de Murcia. Murcia, España, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. 41 p.
- Chaves, V. 2008. Preguntas frecuentes relacionadas con el Nitrógeno. *Revista Informativa del Instituto del Café de Costa Rica*. 16 p.
- Cho, AH; Chase, CA; Treadwell, DD; Koenig, RL; Morris, JB; Morales-Payan, JP. 2015. Apical dominance and planting density effects on weed suppression by Sunn Hemp (*Crotalaria juncea* L.). *HortScience* 50(2):263-267.
- de Carvalho Dias, R; Mendes, KF; Gonçalves, CG; Melo, CA; Teixeira, MFF; Silva, DV; Reis, MR. 2017. Seletividade inicial de herbicidas aplicados em pós-emergência da crotalaria. *Revista Brasileira de Herbicidas* 16(1):76-83.
- Di Benedetto, A; Tognetti, J. 2016. Técnicas de análisis de crecimiento de plantas: su aplicación a cultivos intensivos. *Revista de investigaciones agropecuarias* 42(3):258-282.
- Dos Santos, M; Rodrigues, B; Ribeiro, J. 2006. Cultivo de *Crotalaria spectabilis* intercalada ao café Arábica plantado em diferentes espaçamentos sob manejo orgânico. Embrapa Agrobiologia, Seropédica, Brasil. 21 p.
- Girardi, J. 2020. Evaluation of different species of cover crops as a sustainable strategy for weed management and soil fertility preservation in high quality coffee plantation (*Coffea arabica*) in Costa Rica. Tesis de Maestría, Universidad de Pisa, Pisa, Italia. 127 p.
- Guzmán, GI; Alonso, AM. 2008. Buenas prácticas en producción ecológica: uso de abonos verdes. Madrid, España, Ministerio de Medio Ambiente y Medio Rural y Marino. 22 p.
- Hosmer, D; Lemeshow, S. 2000. Applied logistic regression. 2 ed. Nueva York, Estados Unidos, John Wiley & Sons INC. 375 p.
- Hu, YL; Zeng, DH; Ma, XQ; Chang, SX. 2016. Root rather than leaf litter input drives soil carbon sequestration after afforestation on a marginal cropland. *Forest Ecology and Management* 362:38-45.
- ICAFFE (Instituto del café de Costa Rica). 2015. Informe sobre la actividad cafetalera de Costa Rica. Heredia, Costa Rica. 62 p.
- ICAFFE (Instituto del café de Costa Rica). 2019. Costos de producción agrícola de café fruta cosecha 2018-2019. Heredia, Costa Rica. 5 p.
- Jiménez, AM; Farfan, F; Morales, C. 2005a. Biomasa seca y contenido de nutrientes de *Cajanus cajan*, *Crotalaria juncea* y *Tephrosia candida* empleadas como abonos verdes en cafetales. *Cenicafé* 56(2):93-109.
- Jiménez, AM; Farfan, F; Morales, C. 2005b. Descomposición y transferencia de nutrientes de *Cajanus cajan*, *Crotalaria juncea* y *Tephrosia candida* como abonos verdes en cafetales. *Cenicafé* 56(3):216-236.
- Martins, BH; Araujo-Junior, CF; Miyazawa, M; Vieira, KM; Milori, DM. 2015. Soil organic matter quality and weed diversity in coffee plantation area submitted to weed control and cover crops management. *Soil and Tillage Research* 153:169-174.
- Meschede, DK. 2007. Avaliação de diferentes coberturas na supressão de plantas daninhas no cerrado. *Planta Daninha* 25(3):465-471.
- Molina, E. 2001. Manejo de suelos y fertilización en café. In *Fertilidad de suelos y manejo de la nutrición de cultivos en Costa Rica*. Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. 139 p.
- Navarro, JR. 2012. La técnica del área bajo la curva. Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 6 p.

- Puiatti, M; de Oliveira, NLC; Cecon, PR; da Silva Bhering, A. 2015. Consorciação de Taro e Crotalária Manejada com corte rente ao solo e poda na altura do dosel. *Ceres* 62(3):275-283.
- Recalde, KMG; Carneiro, LF; Carneiro, DNM; Felisberto, G; Nascimento, JS; Padovan, MP. 2015. Weed suppression by green manure in an agroecological systems. *Revista Ceres* 62(6):546-552.
- Rodrigues, GB; Sá, MED; Valério Filho, WV; Buzetti, S; Bertolin, DC; Pina, TP. 2012. Matéria e nutrientes da parte aérea de adubos verdes em cultivos exclusivo e consorciado. *Revista Ceres* 59(3):380-385.
- Salazar, LF; Hincapié, E. 2005. Arvenses de mayor interferencia en los cafetales. Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé) 333:1-12.
- Sánchez, L; Gamboa, E. 2004. Control de malezas con herbicidas y métodos mecánicos en plantaciones jóvenes de café. *Bioagro16*(2):133-136.
- Segura, MA; Andrade, HJ. 2012. Huella de carbono en cadenas productivas de café (*Coffea arabica* L.) con diferentes estándares de certificación en Costa Rica. *Revista Luna Azul* (35):60-77.
- Silva, J; Rodrigues, M; Bastos L; Silva, R; Prieto, H. 2013. Nitrogen fertilization of coffee: organic compost and *Crotalaria juncea* L. *Revista Ceres* 60(6):842-851.
- Soares J; Ribeiro, R; Vaz, F; Lang, D; De Sá, E. 2014. Produção de fitomassa e acúmulo de nutrientes por espécies utilizadas na adubão verde. *Revista Ceres* 61(5):732-739.
- Timossi, PC; Wisintainer, C; Santos, BJD; Pereira, VA; Porto, VS. 2011. Supressão de plantas daninhas e produção de sementes de Crotalária, em função de métodos de semeadura. *Pesquisa Agropecuária Tropical* 41(4):525-530.
- Tripathi, MK; Chaudhary, B; Singh, SR; Bh, HR. 2013. Growth and yield of Sunnhemp (*Crotalaria juncea* L.) as influenced by spacing and topping practices. *African journal of agricultural research* 8(28):3744-3749.
- Uchino, H; Iwama, K; Jitsuyama, Y; Ichiyama, K; Sugiura, E; Yudate, T. 2011. Stable characteristics of cover crops for weed suppression in organic farming systems. *Plant Production Science* 14(1):75-85.
- Wang, W; Lai, DYF; Wang, C; Pan, T; Zeng, C. 2015. Effects of rice straw incorporation on active soil organic carbon pools in a subtropical paddy field. *Soil and Tillage Research* 152:8-16.



Agronomía Costarricense. Universidad de Costa Rica. Se encuentra licenciada con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr

TOLERANCIA DE VARIAS LEGUMINOSAS DE COBERTURA A HERBICIDAS PRE Y POSEMERGENTES*

Robin Gómez-Gómez^{1/**}, María Isabel González-Lutz²

Palabras clave: Cultivos de cobertura; manejo de malezas; abonos verdes; coberturas vivas.

Keywords: Cover crops; weed management; green manures; living mulches.

Recibido: 16/12/2021

Aceptado: 25/05/2022

RESUMEN

Introducción. Los cultivos de cobertura compiten en sus etapas iniciales de crecimiento con las malezas, por lo que en áreas donde predominan malezas de muy rápido crecimiento es necesaria la aplicación de herbicidas para controlarlas mientras la cobertura se establece. **Objetivo.** Evaluar la tolerancia de las leguminosas *Mucuna pruriens* (L) DC cv. preta, *M. pruriens* cv. cinza, *Vigna radiata* (L.) Wilczek, *Pueraria phaseoloides* (Roxb) Benth. y *Crotalaria spectabilis* Roth a herbicidas preemergentes y posemergentes. **Materiales y métodos.** Se realizaron 2 estudios en un invernadero de la Universidad de Costa Rica, situado en Alajuela, Costa Rica. En el primer experimento se evaluaron los herbicidas posemergentes cletodim, fluazifop-p-butil, fomesafen y bentazon, en el 2012 y se repitió en el 2013. El segundo experimento se realizó 2 veces en el 2014 para evaluar los herbicidas preemergentes pendimetalina, oxifluorfen, alachlor y linuron. Se evaluó la altura, el grado de daño y el peso seco de las plantas sembradas en pots de 1,5 litros. El diseño experimental utilizado fue completamente aleatorio. **Resultados.**

ABSTRACT

Tolerance of various legume cover crops to pre- and post-emergence herbicides. Introduction. Cover crops compete during their initial growth stages with weeds, therefore in areas where the predominant weeds are fast growers it is necessary to spray herbicides to control those plants while the cover gets established. **Objective.** To evaluate the tolerance of the legumes *Mucuna pruriens* (L) DC cv. preta, *M. pruriens* cv. cinza, *Vigna radiata* (L.) Wilczek, *Pueraria phaseoloides* (Roxb) Benth. and *Crotalaria spectabilis* Roth to pre- and postemergence herbicides. **Materials and methods.** Two studies were carried out in a greenhouse of the University of Costa Rica, located in Alajuela, Costa Rica. The first experiment evaluated the postemergence herbicides clethodim, fluazifop-p-butyl, fomesafen and bentazon in 2012 and was repeated in 2013. The second experiment was performed twice in 2014 to evaluate the postemergence herbicides pendimethalin, oxyfluorfen, alachlor and linuron. Plant height, injury index and dry weight of plants sowed in 1.5 liters pots was assessed. The experimental

* Este trabajo formó parte del proyecto de investigación 736-B3-164 de la Universidad de Costa Rica (UCR), Costa Rica.

** Autor para correspondencia. Correo electrónico: robin.gomezgomez@ucr.ac.cr

1 Universidad de Costa Rica, Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno, Alajuela, Costa Rica.  0000-0002-8543-8137.

2 Universidad de Costa Rica, Escuela de Estadística, San José, Costa Rica.  000-0002-3073-7746.

Todas las especies evaluadas, con excepción de *P. phaseoloides*, resultaron tolerantes a bentazon, cletodim y fluazifop-p-butil. Estas especies también mostraron tolerancia a alaclor, linuron y pendimetalina. *P. phaseoloides* fue tolerante a fomesafen y fluazifop-p-butil, pero resultó moderadamente afectado por los herbicidas preemergentes. Solamente las plantas aplicadas con oxifluorfen y fomesafen evidenciaron una reducción significativa del peso seco, con excepción de las plantas de *P. phaseoloides* aplicadas con fomesafen. **Conclusión.** Las leguminosas evaluadas resultaron tolerantes a la mayoría de los herbicidas aplicados para control de monocotiledóneas y dicotiledóneas.

design was completely randomized. **Results.** All the evaluated species, except for *P. phaseoloides*, were tolerant to bentazon, cletodim and fluazifop-p-butil. These species were also tolerant to alachlor, linuron, and pendimethalin. *P. phaseoloides* was tolerant to fomesafen and fluazifop-p-butyl, but resulted moderately affected by the preemergent herbicides. Only plants treated with oxyfluorfen and fomesafen showed a significant dry weight reduction, except for *P. phaseoloides* plants sprayed with fomesafen. **Conclusion.** The evaluated legumes were tolerant to the majority of the sprayed herbicides for the control of both dicotyledonous and monocotyledonous weeds.

INTRODUCCIÓN

La siembra de cultivos de cobertura en rotación o en asocio con el cultivo principal es una práctica agrícola con múltiples beneficios, entre ellos el manejo de malezas (Hodgdon *et al.* 2016, Wayman *et al.* 2015), prevención de erosión del suelo (Plaza-Bonilla *et al.* 2015), manejo de organismos fitopatógenos (Claudius-Cole *et al.* 2014, Cullen y Holm 2013), aporte de nutrientes e incorporación de materia orgánica (Jani *et al.* 2016, Martins *et al.* 2015). Según el sitio donde se establecen estas coberturas es necesario darles cuidados propios de cualquier cultivo, tales como el control de malezas en sus estadíos iniciales mientras logran cubrir adecuadamente el suelo. En áreas con una alta densidad de especies de plantas perjudiciales o en presencia de especies de crecimiento muy agresivo es deseable contar con herbicidas que controlen las malezas y no dañen a las coberturas. La información sobre la tolerancia de los cultivos de cobertura a esos productos es muy escasa en la literatura internacional, y los estudios que existen se refieren a la selección de esas sustancias para eliminar las

coberturas antes de sembrar el cultivo principal (Bressanin *et al.* 2015).

Las especies pertenecientes a la familia Fabaceae, comúnmente llamadas leguminosas y que son utilizadas como coberturas, son potencialmente benéficas para el agroecosistema, principalmente por su rápido crecimiento y su capacidad de fijar nitrógeno atmosférico, el cual estará disponible para el cultivo una vez que se incorpore y descomponga la materia orgánica (Favero *et al.* 2000). Algunas de las principales leguminosas de cobertura que se han establecido en Mesoamérica en las últimas décadas incluyen a la mucuna o frijol terciopelo (*Mucuna pruriens*), el cual se siembra en laderas o terrenos de baja fertilidad para mejorar las condiciones del suelo, o en rotación con cultivos anuales para disminuir el banco de semillas de malezas (Buckles *et al.* 2002). El kudzu (*Pueraria phaseoloides*) se siembra extensivamente en plantaciones jóvenes de palma aceitera para el control de malezas (Sancho y Cervantes 1997). La vigna o rabiza (*Vigna radiata*) se ha cultivado como un frijol comestible, pero su rusticidad, rápido crecimiento y cubrimiento del suelo indica su potencial como leguminosa de cobertura. La crotalaria

(*Crotalaria spectabilis*) se ha establecido en plantaciones de papaya y café para el aporte de nitrógeno, control de malezas y de nematodos (Mendonça *et al.* 2017).

Debido a que las coberturas no son consideradas por el agricultor como un cultivo, y más bien son establecidas sin insumos externos como fertilizantes o herbicidas, existe poca información sobre estos últimos, selectivos a estas especies. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue evaluar la susceptibilidad de las leguminosas *Mucuna pruriens* (L) DC cv. preta, *M. pruriens* (L) DC cv. cinza, *Vigna radiata* (L.) Wilczek, *Pueraria phaseoloides* (Roxb) Benth. y *Crotalaria spectabilis* Roth a herbicidas preemergentes y postemergentes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron 2 estudios, uno con herbicidas preemergentes y otro posemergentes, en un invernadero en la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno (EEAFBM), Universidad de Costa Rica, situado en Alajuela (840 msnm), Costa Rica. Las semillas utilizadas de *M. pruriens* cultivares preta (mucuna negra) y cinza (mucuna gris), así como *C. spectabilis* fueron compradas a la empresa Wolf Seeds (Brasil). Se decidió evaluar 2 cultivares de mucuna que la empresa productora reporta como de distinto crecimiento. La semilla de *Vigna radiata* fue comprada a la empresa Servicios Científicos Agropecuarios (SCA, Costa Rica) y multiplicada en la EEAFBM. La semilla de *P. phaseoloides* fue comprada a la empresa Palma Tica. Todas las semillas fueron adquiridas en el 2012 y guardadas en cámara fría a 4°C, hasta 2 semanas antes de su siembra.

Herbicidas preemergentes. El experimento se llevó a cabo en el primer semestre del 2014 (época seca) y se repitió en el segundo semestre de ese año (época lluviosa). Se sembraron 5 semillas de cada una de las leguminosas en suelo franco-arcilloso, proveniente de la EEAFBM, contenido en pots plásticos de 1,5 litros de capacidad. El suelo se esterilizó previamente

con vapor de agua según la metodología descrita por Castillo-Luna y Gómez-Gómez (2016). Se dejaron sólo 3 plantas por pote cuando las plantas mostraron su primera hoja verdadera, con el fin de minimizar la competencia interespecífica.

Se evaluó la tolerancia de las leguminosas *M. pruriens* cv. preta, *P. phaseoloides* (kudzú), *V. radiata* (vigna) y *C. spectabilis* (crotalaria) a los preemergentes pendimetalina (1000 g i.a./ha), oxifluorfen (600 g i.a./ha), alaclor (1920 g i.a./ha) y linuron (450 g i.a./ha). Previo a la aplicación se humedeció el suelo en los pots por capilaridad para asegurar una condición de humedad uniforme. La aplicación del oxifluorfen se realizó una semana antes de la siembra según la recomendación de la empresa distribuidora para evitar una posible fitotoxicidad al cultivo. Los demás herbicidas se aplicaron el mismo día de la siembra de las leguminosas. Se utilizó un equipo de aplicación de mochila con boquilla de abanico plano TeeJet 8002, presión de 2 kg.cm⁻² y volumen de aplicación de 300 litros por hectárea. Se sembró también un tratamiento control de cada leguminosa sin aplicación de herbicidas. Se utilizó un diseño experimental irrestricto al azar, con 4 repeticiones.

Se evaluó semanalmente, a partir de los 7 días después de la aplicación (dda), el grado de daño a cada planta con una escala de 0-10 (0=sin daño, 10=planta muerta; 1-3 leve, 4-6 moderado, 7-9 severo) descrita por Camper (1986), y la altura de cada planta. Debido a sus diferencias en crecimiento, las plantas se cortaron a los 21, 42, 42 y 36 días después de la siembra (dds) de *M. pruriens*, *P. phaseoloides*, *C. spectabilis* y *V. radiata*, respectivamente. Las plantas se secaron en un horno a 65°C durante 72 horas y luego se determinó el peso seco promedio por planta.

Para el análisis de la altura de planta se utilizó como variable respuesta el área bajo la curva de la altura promedio de las plantas de cada pote (ABC altura). Para el grado de daño se calculó un promedio del daño de las plantas de cada pote y para el peso seco se calculó el peso seco total de las plantas de cada pote y se dividió entre el número de plantas.

El modelo utilizado para el análisis del peso seco y ABC altura fue el correspondiente a un arreglo factorial de 2 factores, época a 2 niveles y herbicida a 5 niveles, por separado para cada una de las leguminosas. Para efectos del análisis del peso seco y del cálculo de potencias de prueba para esta variable se consideró relevante una diferencia de 0,5 gramos para todas las leguminosas.

Para el análisis de la tendencia del daño provocado por los herbicidas se realizó, para cada leguminosa por separado, un análisis para mediciones repetidas (MANOVA) con prueba de esfericidad y prueba de Greenhouse-Geiser para la significancia de los efectos en los casos en que no se cumple el supuesto de esfericidad, para determinar si la tendencia lineal del daño es la misma para cada una de las sustancias y en cada una de las 2 épocas. También se realizó un análisis de variancia a los 7, 21 y 36 días después de la aplicación. Este enfoque permitió estudiar comparativamente el cambio del daño en cada periodo. Se analizó la tendencia cuadrática para *P. phaseoloides* por cuanto el comportamiento de los datos muestrales sugirió este tipo de tendencia.

Para la separación de medias en los casos en que procedía hacerlo se utilizó la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5%. El mismo nivel de significancia se utilizó para las pruebas de los efectos de los factores.

Herbicidas posemergentes. El experimento se llevó a cabo de octubre a diciembre del 2012, y se repitió de agosto a setiembre del 2013. Se utilizó suelo franco-arcilloso proveniente de la EEAFBM y se esterilizó con vapor de agua, con la metodología descrita por Castillo-Luna y Gómez-Gómez (2016). Se llenaron con suelo pots de 1,5 litros de capacidad y se sembraron 5 semillas de cada una de las leguminosas *M. pruriens* cv. preta, *M. pruriens* cv. cinza, *P. phaseoloides*, *V. radiata* y *C. spectabilis*. Cuando las plantas mostraron la primera hoja verdadera se dejaron sólo 3 plantas por pote con la finalidad de minimizar la competencia interespecífica.

Se aplicaron los herbicidas posemergentes cletodim (180 g i.a./ha), fluazifop-p-butil (175 g

i.a./ha), fomesafen (99 g i.a./ha) y bentazón (960 g i.a./ha) cuando la vigna, el kudzu y las 2 mucunas tenían la segunda hoja trifoliada desarrollada y cuando la crotalaria tenía 6 hojas verdaderas. Se determinó este momento de aplicación, a partir del cultivo del frijol como referencia, en el cual las aplicaciones se deben hacer después de este estado de desarrollo para evitar fitotoxicidad. Se calculó un volumen de aplicación de 300 l.ha⁻¹, y se utilizó un equipo de aplicación de espalda con una boquilla Tee Jet 8002. Además, se incluyó un tratamiento control sin aplicación de herbicida.

El diseño experimental fue irrestricto al azar con 4 repeticiones. El grado de daño ocasionado por los herbicidas a las leguminosas se evaluó semanalmente durante las siguientes 4 semanas después de la aplicación con una escala de 0 a 10 (0=sin daño, 10=planta muerta; 1-3 leve, 4-6 moderado, 7-9 severo) descrita por Camper (1986). El peso seco por planta se determinó al final del experimento (30 dds). Las plantas cortadas se secaron durante 72 h en una estufa a 65°C y posteriormente se pesaron.

El modelo estadístico utilizado para el análisis del peso seco fue el correspondiente a un arreglo factorial de 2 factores, experimento (época) a 2 niveles y herbicida a 4 niveles, por separado para cada una de las leguminosas. Para efectos del análisis y del cálculo de potencias de prueba para esta variable se consideró relevante una diferencia de 0,5 gramos. Se realizó un análisis de contrastes a la variable peso seco, entre el testigo y el conjunto de herbicidas aplicados, disponibles para malezas de hoja angosta vs. los que controlan hojas anchas, y entre los 2 herbicidas que controlan sólo malezas de hoja ancha.

El análisis de la tendencia del daño provocado por cada producto se realizó por separado para cada leguminosa. Se escogió un análisis para mediciones repetidas para determinar si la tendencia lineal del daño fue la misma para cada uno de los herbicidas y en cada una de las 2 épocas evaluadas. También se realizó un análisis de varianza para cada uno de los momentos o tiempo de medición. Este enfoque permitió estudiar

comparativamente el cambio de la variable grado de daño en cada semana y facilitó la identificación de tendencias no lineales en forma sencilla.

La separación de medias, en los casos en que procedía hacerlo, se realizó mediante la prueba de Tukey con un nivel de significancia del 5%. El mismo nivel de significancia se utilizó para las pruebas de los efectos de los factores principales (herbicidas y experimento). El análisis estadístico de ambos estudios se realizó con el programa JMP versión 15 de SAS Institute.

RESULTADOS

Herbicidas preemergentes. *V. radiata*. Los efectos “herbicida” y “herbicida x época” resultaron no significativos ($p=0,2230$ y $p=0,3855$, respectivamente) para la variable área bajo la curva de la altura por planta (ABC altura). Solamente se dio una diferencia significativa en el efecto simple “época” ($p<0,0001$). Los promedios fueron 380 para la época 1 y 859 para la época 2, es decir, las plantas crecieron mucho más durante la estación lluviosa en el sitio donde se realizaron los experimentos.

De igual manera que para el área bajo la curva, los efectos “herbicida” y “herbicida x

época” resultaron no significativos ($p=0,5569$ y $p=0,4774$) para la variable peso seco. La potencia de la prueba para una diferencia mínima a detectar de 0,5 gramos fue de 0,9749. Solamente se dio una diferencia significativa en el efecto simple “época” ($p<0,0001$). Los promedios fueron 1,32 para la época 1 y 3,18 para la época 2, es decir, la acumulación de biomasa fue mayor durante la época lluviosa, sin importar el tratamiento.

El análisis de la variable grado de daño produjo una interacción “tiempo x herbicida x época” significativa ($p=0,0021$ en la prueba de Greenhouse-Geiser), por lo que se realizó un análisis por separado para cada una de las épocas. En el análisis de la época 1 la interacción “tiempo x herbicida” resultó significativa ($p=0,0299$), lo mismo que en la época 2 ($p=0,0293$).

Tanto la significancia de la interacción triple como la de las interacciones dobles en cada una de las épocas es provocada por la tendencia del daño cuando se aplicó oxifluorfen (Figura 1). La magnitud del daño provocado por este herbicida fue mayor y durante un periodo mayor en el primer experimento. Por su parte el alaclor y el linurón no produjeron un daño importante a las plantas de *V. radiata*. Las plantas aplicadas con pendimetalina no mostraron ningún síntoma de daño.

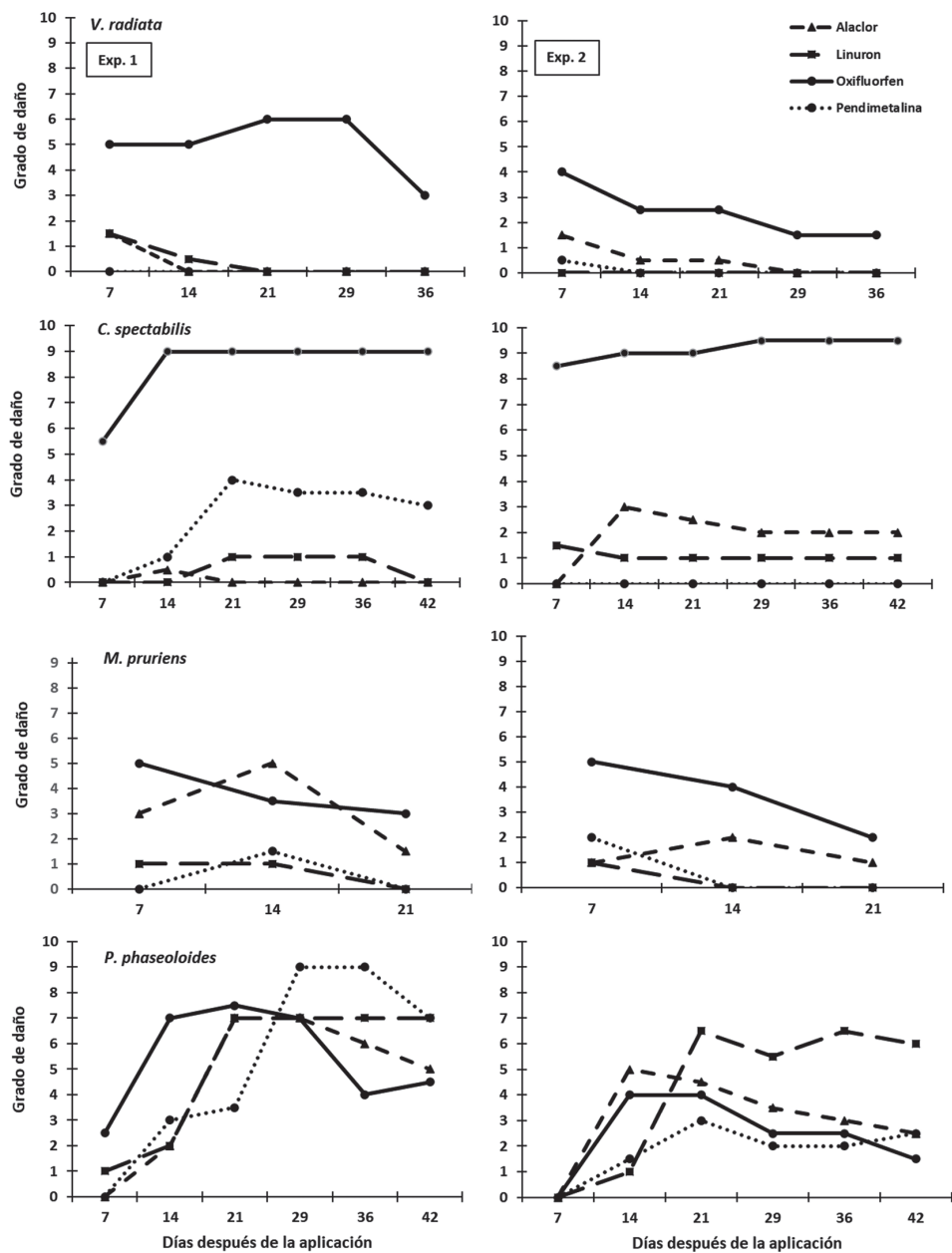


Figura 1. Grado de daño provocado por los herbicidas preemergentes alaclor, linuron, oxifluorfen y pendimetalina a plantas de *V. radiata*, *C. spectabilis*, *M. pruriens* y *P. phaseoloides* aplicadas en 2 experimentos (Exp. 1 y Exp. 2). Alajuela, Costa Rica. 2014.

***M. pruriens*.** El efecto de los herbicidas sobre el área bajo la curva de la altura por planta fue significativamente diferente en cada una de las épocas (interacción época x herbicida = $p < 0,0001$). La interacción se dio porque en la época 1 el oxifluorfen mostró promedio inferior a los demás, mientras que en la época 2 no hubo diferencia alguna significativa entre los promedios (Tabla 1). La menor ABC altura de las plantas aplicadas con oxifluorfen indican un efecto fitotóxico que afectó el crecimiento de la leguminosa.

Tabla 1. Área promedio bajo la curva de la altura de planta de *M. pruriens* aplicada con herbicidas preemergentes en 2 épocas distintas. Alajuela, Costa Rica. 2014.

Herbicida	Época 1	Época 2
Linuron	319,40	110,98
Alachlor	318,30	163,92
Oxifluorfen	96,47*	199,56
Pedimetalina	304,41	178,21
Testigo	355,48	131,25

*Único promedio distinto al testigo.

Los productos no generaron efecto alguno sobre el peso seco promedio de mucuna ($p=0,3670$ para la interacción época x herbicida; $p=0,7885$ para el efecto simple herbicida). Se determinó un menor peso seco de las plantas en la época seca en comparación con la época lluviosa (1,38 g y 1,67 g, respectivamente).

El grado de daño provocado por las distintas sustancias fue significativamente diferente en cada época ($p=0,0256$). Se analizaron por tanto los efectos herbicida y tiempo por separado para cada una de las épocas. En la época 1 la tendencia del daño provocado por linuron y oxifluorfen fue lineal y decreciente, mientras que el daño provocado por pendimetalina y alaclor creció hasta el

día 14 y luego decreció (Figura 1). En general, el daño provocado por linuron y pendimetalina fue muy leve y las plantas se recuperaron luego de 21 días. En la época 2 la tendencia decreciente se dio por igual para todos, pero el grado de daño promedio provocado por el oxifluorfen fue significativamente mayor (Figura 1).

***C. spectabilis*.** El efecto de las sustancias sobre el área bajo la curva de la altura por planta fue significativamente diferente en cada una de las épocas (época x herbicida, $p=0,0044$). En la época seca el ABC de la altura fue significativamente menor en las plantas aplicadas con pendimetalina y oxifluorfen en comparación con los demás tratamientos y el testigo. En el experimento realizado en época lluviosa, sólo el ABC de altura de las plantas aplicadas con oxifluorfen fue significativamente diferente al testigo y los demás tratamientos (Tabla 2).

Tabla 2. Área bajo la curva promedio de la altura de plantas de *C. spectabilis* aplicadas con herbicidas preemergentes. Alajuela, Costa Rica. 2014.

Herbicida	Época 1	Época 2
Linuron	480,88	348,71
Alachlor	455,83	378,08
Oxifluorfen	5,75*	1,67*
Pedimetalina	296,59*	396,90
Testigo	462,67	407,17

*Promedios significativamente diferentes a los demás.

La interacción época x herbicida del peso seco de la parte aérea fue significativa. El peso seco de las plantas aplicadas con oxifluorfen fue significativamente menor que el peso de las plantas de los demás tratamientos, en ambas épocas. El efecto negativo del oxifluorfen fue mayor en la época lluviosa (Tabla 3).

Tabla 3. Peso seco promedio de plantas de *C. spectabilis* aplicadas con herbicidas preemergentes. Alajuela, Costa Rica. 2014.

Herbicida	Época 1	Época 2
Linuron	1,23	1,95
Alachlor	1,21	2,13
Oxifluorfen	0,02*	0,01*
Pedimetalina	1,06	2,04
Testigo	1,54	2,11

*Promedios significativamente diferentes a los demás.

Se determinaron diferencias en el grado de daño de los herbicidas según la época de realización del experimento ($p=0,0004$). En la época seca, el grado de daño causado por oxifluorfen y pendimetalina fue significativamente mayor que en los demás tratamientos, mientras que en la época lluviosa sólo el grado de daño causado por oxifluorfen fue mayor al del resto de tratamientos (Figura 1). El oxifluorfen dañó severamente a las plantas de *C. spectabilis*, mientras que el grado de daño provocado por linuron y alachlor fue muy leve, en ambas épocas.

***P. phaseoloides*.** La interacción época x herbicida no resultó significativa en la variable área bajo la curva de la altura por planta ($p=0,0924$), por lo que se analizaron los datos de ambos experimentos juntos. El ABC de la altura de plantas de kudzu fue menor cuando se aplicó linuron y pendimetalina (Tabla 4).

Tabla 4. Área bajo la curva promedio de la altura de plantas de *P. phaseoloides* aplicadas con herbicidas preemergentes. Alajuela, Costa Rica. 2014.

Herbicida	Área bajo la curva promedio
Linuron	69,21*
Alachlor	120,80
Oxifluorfen	97,47
Pedimetalina	68,72*
Testigo	151,79

*Promedios significativamente diferentes a los demás.

No se presentaron diferencias significativas en el peso seco aéreo entre tratamientos. El crecimiento de las plantas de *P. phaseoloides* fue significativamente mayor ($p=0,0004$) en la época lluviosa en comparación con la época seca (0,66 g y 0,31 g, respectivamente).

Se observaron diferencias en el grado de daño entre épocas, pero no se determinaron diferencias significativas entre herbicidas aplicados. En general, todos provocaron un daño de moderado a severo en el primer experimento, mientras que el daño generado en el segundo experimento fue de leve a moderado y disminuyó de manera importante a partir del día 14 después de la aplicación, con excepción de las plantas tratadas con oxifluorfen (Figura 1).

Herbicidas posemergentes. *V. radiata*.

Se encontraron diferencias significativas en el grado de daño causado en plantas de vigna. La interacción triple tiempo x experimento x herbicida resultó no significativa ($p=0,1242$), lo cual indicó que la tendencia del daño en cada uno se dio por igual en los 2 experimentos. La interacción tiempo x herbicida resultó significativa ($p=0,008$), lo que explica que al menos uno de los herbicidas presentó una tendencia diferente al resto.

El fomesafen provocó un daño significativamente superior en las plantas de vigna en comparación con los demás herbicidas (Figura 2). Este daño se consideró moderado-alto, los síntomas se presentaron como una quema de hojas, similar al efecto que este provocó en el frijol común, pero las plantas no murieron. Las pruebas de separación de medias de Tukey en cada uno de los días de observación indicaron que los promedios de daño de los otros 3 herbicidas no fueron significativamente diferentes entre sí. El daño provocado por cletodim, fluazifop-p-butyl y bentazon fue leve y disminuyó en el tiempo.

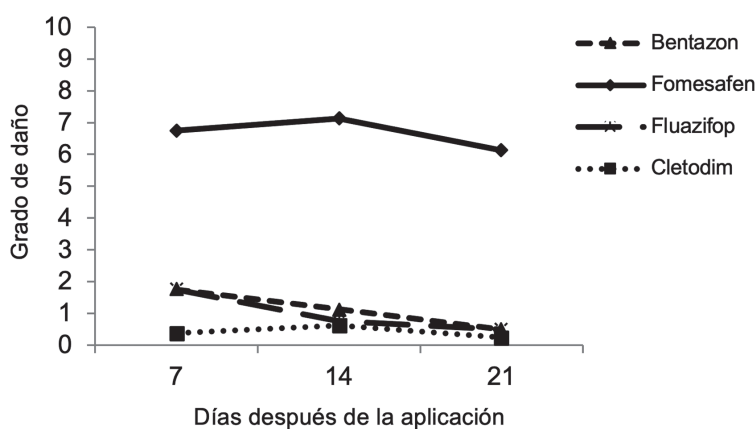


Figura 2. Grado de daño ocasionado a *V. radiata* por la aplicación de 4 herbicidas posemergentes. Alajuela, Costa Rica. 2014.

La interacción herbicida x experimento resultó significativa ($p=0,0003$) para la variable peso seco, por lo que se analizó de manera separada para cada experimento. No se determinaron diferencias significativas en el peso seco de las leguminosas en el primer experimento al realizar la prueba de Tukey de separación de medias, pero sí se determinó un menor peso seco de las plantas aplicadas con fomesafen en el segundo experimento (Tabla 5). La potencia de prueba ($1-\beta$) obtenida para detectar una diferencia de 0,5 gramos en las comparaciones no significativas fue de 1,0000.

La prueba de contrastes resultó significativa solamente en el segundo experimento (Tabla 5). Las diferencias detectadas estuvieron relacionadas con el menor peso seco observado en las plantas aplicadas con fomesafen.

Tabla 5. Peso seco promedio (g) por planta de *Vigna radiata* a los 30 días después de que se aplicaron 4 herbicidas posemergentes, en 2 experimentos. Alajuela, Costa Rica. 2014.

Herbicida	Exp. 1	Exp. 2
Bentazon	0,71	3,36
Fomesafen	0,55	1,53 ¹
Fluazifop-p-butil	0,67	2,88
Cletodim	0,79	3,17
Testigo	0,47	3,74
Contrastes		Valor <i>p</i>
Testigo vs. herbicidas	0,3928	0,0003
Fluazifop-p-butil y cletodim vs. bentazon y fomesafen	0,6564	0,0104
Bentazon vs. fomesafen	0,5996	1,7 x e ⁻⁶

¹ Promedio significativamente menor a los demás, según prueba Tukey al 5%.

C. spectabilis. Se realizó un análisis para cada experimento por separado debido a que la interacción triple herbicida x experimento x tiempo fue significativa ($p=0,0009$). En ambos experimentos el fluazifop-p-butil ocasionó el menor daño con una tendencia nula al crecimiento (Figura 3). La interacción con el factor experimento fue provocada por el comportamiento

diferente del bentazón y el cletodim. Pruebas de Tukey sustentaron que en el primer experimento el cletodim resultó más dañino, mientras que en el segundo experimento ambos ocasionaron el mismo daño. En los 2 experimentos el herbicida que causó significativamente el mayor daño fue el fomesafen.

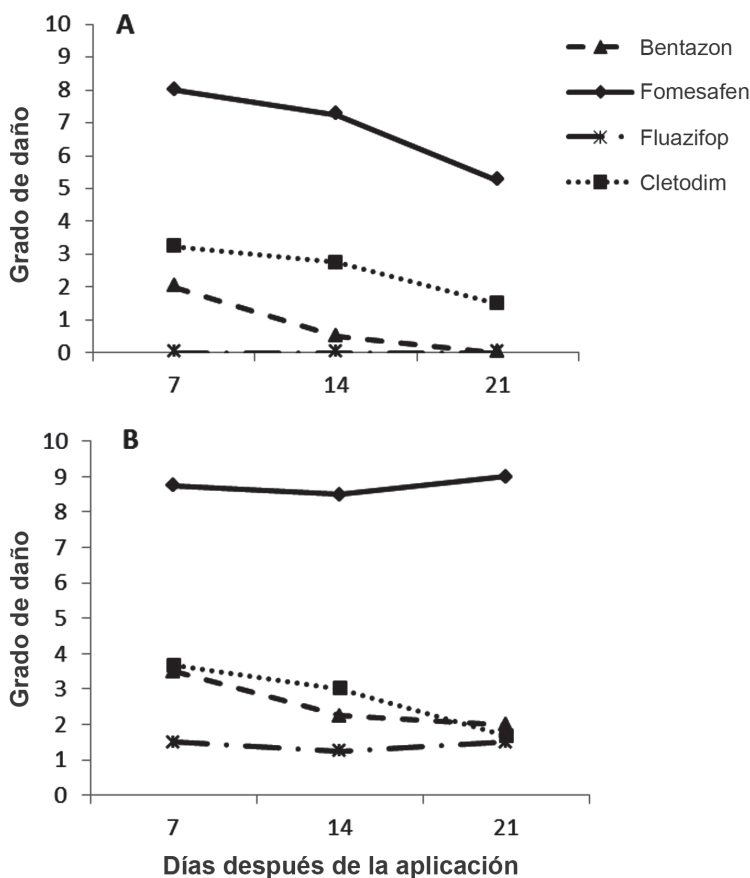


Figura 3. Grado de daño ocasionado a *Crotalaria spectabilis* por la aplicación de 4 herbicidas posemergentes, en el primer experimento (A) y en el segundo experimento (B). Alajuela, Costa Rica. 2014.

El daño causado por los herbicidas para control de hoja angosta, fluazifop-p-butil y cletodim, fue un leve amarillamiento de las

hojas durante los primeros 7 días después de la aplicación.

Al igual que con vigna, la interacción entre experimento y herbicida resultó significativa ($p < 0,0001$) para la variable peso seco por planta. En ambos experimentos la prueba de contrastes indicó un menor peso seco de las plantas aplicadas con fomesafen en comparación con aquellas aplicadas con bentazon (Tabla 6). Asimismo, en el segundo experimento el peso seco en el tratamiento con fluazifop-p-butil fue menor al peso seco del tratamiento con cletodim, pero ninguno de los 2 fue diferente del promedio del testigo (Tabla 6).

Tabla 6. Peso seco promedio (g) por planta de *Crotalaria spectabilis*, a los 30 días después que se aplicaron 4 herbicidas posemergentes, en 2 experimentos. Alajuela, Costa Rica. 2014.

Herbicida	Exp. 1	Exp. 2
Bentazon	1,33	4,70
Fomesafen	0,38	0,40
Fluazifop-p-butil	1,01	5,38
Cletodim	0,91	6,45
Testigo	0,97	5,79
Contrastes	Valor <i>p</i>	
Testigo vs. herbicidas	0,8426	$3,9 \times 10^{-5}$
Fluazifop-p-butil y cletodim vs. bentazon y fomesafen	0,7253	$4,0 \times 10^{-12}$
Bentazon vs. fomesafen	0,0268	$2,0 \times 10^{-11}$
Fluazifop-p-butil vs. cletodim	0,8005	0,0203

P. phaseoloides. En el análisis del grado de daño la interacción época x experimento x herbicida resultó significativa ($p < 0,0001$). En el primer experimento no hubo diferencias significativas en los promedios para ninguno de los momentos de medición. Las aplicaciones causaron un grado de daño leve que disminuyó con el tiempo. En el segundo experimento se determinó un significativo mayor grado de daño, según prueba Tukey, causado por el bentazon y el cletodim, en comparación con fomesafen y fluazifop-p-butil. El daño ocasionado por los primeros herbicidas mencionados, catalogado como moderado, también disminuyó con el tiempo, de forma más acentuada que en el primer experimento (Figura 4).

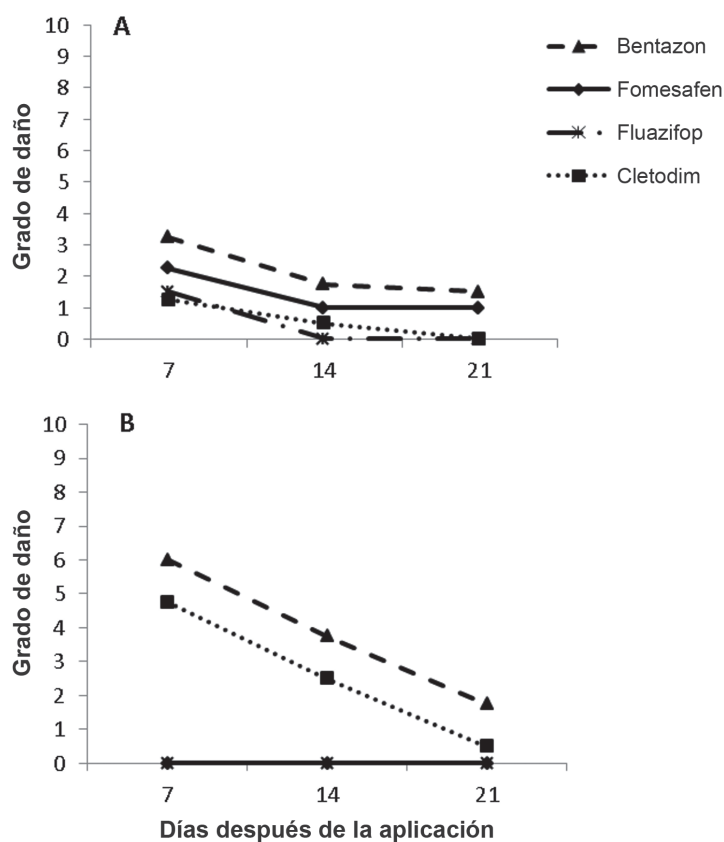


Figura 4. Grado de daño ocasionado a *Pueraria phaseoloides* por la aplicación de 4 herbicidas posemergentes, en el primer experimento (A) y en el segundo experimento (B). Alajuela, Costa Rica. 2014.

La comparación entre herbicidas ($p=0,0903$) y la interacción herbicidas x experimento ($p=0,1727$) resultaron no significativas para la variable peso seco por planta. Solamente resultó significativa ($p<0,001$) la comparación de los promedios globales de los 2 experimentos: 0,28 g en el primer experimento y 0,96 en el segundo (Tabla 7), lo cual indicó mayor crecimiento de las plantas en la época en la que se realizó el segundo experimento.

Tabla 7. Peso seco promedio (g) por planta de *Pueraria phaseoloides* a los 30 días después de que se aplicaron 4 herbicidas posemergentes, en 2 experimentos. Alajuela, Costa Rica. 2014.

Herbicide	Exp. 1	Exp. 2
Bentazon	0,22	0,43
Fomesafen	0,21	1,14
Fluazifop-p-butil	0,35	1,60
Cletodim	0,31	0,65
Testigo	0,30	1,00

***M. pruriens*.** No se encontraron diferencias significativas ($p=0,5504$) en el grado de daño entre cultivares de mucuna ni entre experimentos, sólo en las tendencias de los herbicidas evaluados ($p<0,0001$). El cletodim y el

fluazifop-p-butil no causaron daño a las plantas de mucuna, mientras que el daño del bentazon fue leve al inicio y disminuyó rápidamente en el tiempo. El fomesafen causó un daño moderado-alto según la escala utilizada (Figura 5).

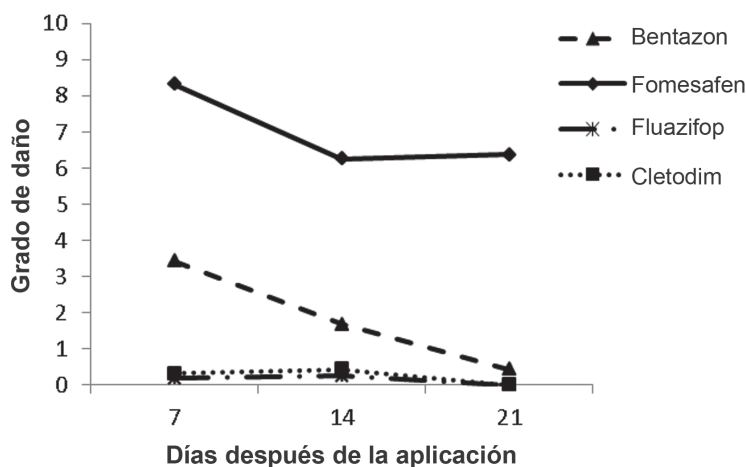


Figura 5. Grado de daño en 2 cultivares de *Mucuna pruriens* ocasionado por la aplicación de 4 herbicidas posemergentes. Alajuela, Costa Rica. 2014.

La interacción especie x herbicidas resultó significativa ($p=0,009$) para la variable peso seco de las plantas de mucuna evaluadas. El peso de las plantas de *M. pruriens* cv. cinza fue menor cuando se les aplicó fomesafen y bentazon en comparación con el peso del testigo, según prueba de Tukey (Tabla 8). Por su parte, las plantas de *M. pruriens* cv. preta crecieron menos en comparación con el testigo cuando se les aplicó fomesafen, según prueba de contrastes (Tabla 8).

Tabla 8. Peso seco promedio (g) por planta de *M. pruriens* var. cinza y *M. pruriens* var. preta, a los 30 días después de que se aplicaron 4 herbicidas posemergentes. Alajuela, Costa Rica. 2014.

Herbicida	Mucuna cinza	Mucuna preta
Bentazon	1,15*	1,12
Fomesafen	0,64*	0,77*
Fluazifop-p-butil	1,62	1,76
Cletodim	1,83	1,59
Testigo	2,15	1,47
Contrastes	Valor <i>p</i>	
Testigo vs. herbicidas	$9,6 \times 10^{-8}$	0,2459
Fluazifop-p-butil y cletodim vs. bentazon y fomesafen	$6,7 \times 10^{-9}$	$2,4 \times 10^{-7}$
Bentazon vs. fomesafen	0,0043	0,0612
Fluazifop-p-butil vs. cletodim	0,2412	0,3438

*Promedios significativamente diferentes al testigo, según prueba Tukey al 5%.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en estos estudios permitieron determinar que las leguminosas de cobertura evaluadas, son tolerantes a varios herbicidas pre y posemergentes. Esto indica que sería posible controlar múltiples especies de malezas al establecer estas coberturas vivas en varias condiciones agrícolas.

V. radiata fue tolerante a 3 herbicidas pre-emergentes, pendimetalina, alaclor y linuron, y a 3 posemergentes, bentazon, fluazifop-p-butil y cletodim. El grado de daño observado luego de la aplicación preemergente fue muy leve, y no afectó el crecimiento de las plantas. La tolerancia de *V. radiata* a fluazifop-p-butil también fue reportada en estudios realizados en India con variedades comestibles (Balyan y Malik 1989).

C. spectabilis toleró la aplicación de los preemergentes linuron y alaclor, y mostró un daño leve luego de la aplicación de pendimetalina, sin embargo, no hubo afectación en el peso seco de estas plantas. Es necesario por tanto realizar pruebas en campo para descartar un posible efecto fitotóxico de la pendimetalina antes de considerar su uso en siembras de esta leguminosa. Las aplicaciones de los posemergentes bentazon, cletodim y fluazifop-p-butil provocaron un daño leve y las plantas se recuperaron rápidamente luego de siete días, lo que se evidenció al no afectarse el peso seco y concuerda con lo reportado por Silva *et al.* (2018). La tolerancia de *C. spectabilis* al cletodim fue también observada en estudios realizados en Brasil, donde se sembró en asocio con café (Braz *et al.* 2015).

Las plantas de *M. pruriens* mostraron un daño moderado durante los primeros 7 días después de la aplicación del preemergente oxifluorfen, pero se recuperaron rápidamente y su peso no fue diferente al de las plantas de los demás tratamientos preemergentes. Esta especie fue por tanto la única que toleró de manera moderada el efecto de este herbicida. Aún así, con el linurón y el pendimetalina, se observó un grado de daño sumamente leve en plantas de *M. pruriens* y su posible uso debería considerarse antes que oxifluorfen. Los posemergentes bentazon, cletodim

y fluazifop-p-butil no causaron daño importante a *M. pruriens* ni afectaron su crecimiento. El fomesafen, por su parte, no fue tolerado por esta leguminosa en aplicación posemergente, aunque las plantas no murieron y se observó el inicio de rebrote de hojas. En comparación, Silva *et al.* (2018) determinaron la tolerancia de varias especies de mucuna a imazapic y clomazone.

El daño de los preemergentes en plantas de *P. phaseoloides* fue mayor, en comparación con las otras especies de leguminosas. Si bien el daño observado fue menor en el segundo experimento, casi todos los herbicidas provocaron un daño moderado o severo. Antes de optar por el uso de los preemergentes en siembras de kudzu, se recomienda evaluar su selectividad en campo, en áreas pequeñas. Adicionalmente, se observó un daño moderado del posemergente bentazon, contrario a lo observado en las otras especies evaluadas. Los herbicidas posemergentes que provocaron el menor daño en el kudzu fueron por tanto fomesafen, fluazifop-p-butil y cletodim. De manera similar, Carmona (1991) encontró buena tolerancia de *P. phaseoloides* a lactofen y fomesafen aplicados para el control de malezas de hoja ancha en plantaciones de palma aceitera.

Por otro lado, al realizar el estudio en 2 épocas del año, seca y lluviosa, se determinaron diferencias en el crecimiento de las especies de leguminosas. En la época lluviosa vigna y kudzu produjeron mayor biomasa, mientras que lo contrario ocurrió con las plantas de mucuna. No consideramos que este fuera un efecto de la aplicación de los herbicidas, ni de diferencias en la humedad del suelo, sino de otros factores que no fueron medidos, tales como radiación, temperatura del aire y humedad relativa. También es posible que la semilla utilizada haya perdido algo de vigor mientras estuvo almacenada.

La tolerancia del linuron en preemergencia y del bentazon en posemergencia por parte de todas las leguminosas evaluadas, con excepción del kudzu, permitiría el control de varias especies de malezas de hoja ancha (Abdallah *et al.* 2021, Piekarczyk *et al.* 2020). De forma similar, la aplicación de pendimetalina en preemergencia

y el cletodim o el fluazifop butil en posemergencia, tolerados por todas las leguminosas, con excepción también del kudzu, haría posible el control de múltiples especies de gramíneas (Poaceae) (Abdallah *et al.* 2021, Soltani *et al.* 2020).

CONCLUSIONES

Las especies de leguminosas de cobertura observadas fueron tolerantes a la mayoría de los herbicidas evaluados, los cuales se podrían emplear para el control de malezas en áreas donde el establecimiento de las leguminosas de cobertura resulte particularmente complejo, debido a la alta densidad y la competencia de las malezas del sitio.

LITERATURA CITADA

- Abdallah, IS; Abdelgawad, KF; El-Mogy, MM; El-Sawy, MB; Mahmoud, HA; Fahmy, MA. 2021. Weed control, growth, nodulation, quality and storability of peas as affected by pre-and postemergence herbicides. *Horticulturae* 7(9):307.
- Balyan, R; Malik, R. 1989. Control of horse purslane (*Trianthema portulacastrum*) and barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) in mung bean (*Vigna radiata*). *Weed Science* 37:695-699.
- Braz, GB; Oliveira, RS; Constantin, J; Takano, HK; Chase, CA; Fornazza, FG; Raimondi, RT. 2015. Selection of herbicides targeting the use in crop systems cultivated with showy croton. *Planta Daninha* 33(3):521-534.
- Bressanin, FN; Giancotti, PRF; Neto, NJ; do Amaral, CL; da Alves, PL. 2015. Efficacy of herbicides solo in pre and post-emergence to control velvet bean. *Revista Brasileira de Ciências Agrárias* 10(3):426-431.
- Buckles, D; Triomphe, B; Sain, G. 2002. Los Cultivos de Cobertura en la Agricultura de Laderas: Innovación de los Agricultores con *Mucuna*. Canada: Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (CIID), Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMY). Turrialba, Costa Rica, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 207 p.
- Camper, N. 1986. *Research Methods in Weed Science*. 3^a ed. Illinois, United States, Southern Weed Science Society. 420 p.
- Carmona, A. 1991. Flex (fomesafen) and Cobra (lactofen): two products with potential for broadleaf weed control for leguminous covers in oil palm plantations. *ASD Technical Bulletin*. p. 1-5.
- Castillo-Luna, MP; Gómez-Gómez, R. 2016. Efecto de la esterilización del suelo con vapor de agua sobre semillas de malezas". *Agronomía Mesoamerica* 27:1-5.
- Claudius-Cole, AO; Fawole, B; Asiedu, R; Coyne, DL. 2014. Management of *Meloidogyne incognita* in yam-based cropping systems with cover crops. *Crop Protection* 63:97-102.
- Cullen, EM; Holm, KM. 2013. Aligning insect IPM programs with a cropping systems perspective: cover crops and cultural pest control in Wisconsin organic corn and soybean. *Agroecology and Sustainable Food Systems* 37(5):550-577.
- Favero, C; Jucksch, I; Costa, LM; Alvarenga, RC; Neves, JCL. 2000. Crescimento e acúmulo de nutrientes por plantas espontâneas e por leguminosas utilizadas para adubacao verde. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 24(1):171-177.
- Hodgdon, EA; Warren, ND; Smith, RG; Sideman, RG. 2016. In-season and carry-over effects of cover crops on productivity and weed suppression. *Agronomy Journal* 108(4):1624-1635.
- Jani, AD; Grossman, J; Smyth, TJ; Hu, S. 2016. Winter legume cover-crop root decomposition and N release dynamics under disking and roller-crimping termination approaches. *Renewable Agriculture and Food Systems* 31(03):214-229.
- Martins, BH; Araujo-Junior, CF; Miyazawa, M; Vieira, KM; Milori, MBP. 2015. Soil organic matter quality and weed diversity in coffee plantation area submitted to weed control and cover crops management. *Soil and Tillage Research* 153:169-174.
- Mendonça, EdS; Lima, PCd; Guimaraes, GP; Moura, WdM; Andrade, FV. 2017. Biological nitrogen fixation by legumes and N uptake by coffee plants. *Revista Brasileira de Ciencia do Solo* 41:1-10.
- Piekarczyk, M; Wenda-Piesik, A; GaÅ, L; Kotwica, K. 2020. Weed control in legumes with reduced doses of linuron and clomazone. *Acta Scientiarum Polonorum Agricultura* 19(3):157-164.
- Plaza-Bonilla, D; Nolot, JM; Raffailac, D; Justes, E. 2015. Cover crops mitigate nitrate leaching in cropping systems including grain legumes: field evidence and model simulations. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 212:1-12.
- Sancho, F; Cervantes, C. 1997. El uso de plantas de cobertura en sistemas de producción de cultivos perennes y anuales en Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 21(1):111-120.
- Silva, HAC; Malardo, MR; Monquero, PA; Da Silva, PV. 2018. Differential tolerance of croton species to herbicides. *Comunicata Scientiae* 8(3):414-423.

- Soltani, N; Shropshire, C; Sikkema, PH. 2020. Weed management in white beans with soil-applied grass herbicides plus halosulfuron. *American Journal of Plant Sciences* 11(12):1998-2011.
- Wayman, S; Cogger, C; Benedict, C; Collins, D; Burke, I; Bary, A. 2015. Cover crop effects on light, nitrogen, and weeds in organic reduced tillage. *Agroecology and Sustainable Food Systems* 39(6):647-665.



Agronomía Costarricense. Universidad de Costa Rica. Se encuentra licenciada con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA, GENOTÍPICA Y ENSAYOS DE AUTOPOLINIZACIÓN EN 18 ACCESIONES DE ACHIOTE (*Bixa orellana* L.) EN COSTA RICA

Enio Remberto Duque-Y Duque¹, Milena Belén Aguirre-Saltos²,
Ana Cristina Tamayo-Domínguez^{3/*}

Palabras clave: Achiote; *Bixa orellana* L.; autopolinización; bixina; región ITS2; relaciones filogenéticas; variabilidad genética.

Keywords: Annatto; *Bixa orellana* L.; self-pollination; bixin; ITS2 region; phylogenetic relationships; genetic variability.

Recibido: 17/11/2021

Aceptado: 20/05/2022

RESUMEN

Introducción. El achiote (*Bixa orellana* L.) es una especie valiosa debido al contenido de bixina presente en el arilo de sus semillas, pigmento que es utilizado en la industria alimentaria, cosmética y medicinal. La caracterización de germoplasma es el punto de partida para iniciar programas de fitomejoramiento y para identificar la variabilidad genética de un banco de germoplasma. **Objetivo.** Evaluación de las diferencias fenotípicas y genotípicas de 18 accesiones de achiote del Banco de Germoplasma de la Universidad EARTH. **Materiales y métodos.** El fenotipo se caracterizó por medio de descriptores generales y botánicos que detallan características morfológicas y productivas de los cultivares. El genotipo se caracterizó a partir del análisis de la región ITS2 del ADN ribosómico para establecer relaciones filogenéticas entre las accesiones y determinar las relaciones entre características fenotípicas y moleculares. También se realizaron

ABSTRACT

Phenotypic and Genotypic Characterization and pollination tests of 18 Annatto (*Bixa orellana* L.) accessions in Costa Rica. Introduction. Achiote (*Bixa orellana* L.) is a valuable species due to the bixin content present in the aril of its seeds; this pigment is used in the food, cosmetic and medicinal industries. Germplasm characterization is the starting point to initiate breeding programs and to identify the genetic variability of a germplasm bank. **Objective.** This project evaluated the phenotypic and genotypic differences of 18 achiote accessions from the EARTH University Germplasm Bank. **Materials and methods.** Phenotype was characterized by general and botanical descriptors detailing morphological and productive characteristics of the cultivars. Genotype was characterized based on analysis of the ITS2 region of ribosomal DNA to establish phylogenetic relationships among accessions and

* Autora para correspondencia. Correo electrónico: atamayo@earth.ac.cr

1 Universidad EARTH, Colecciones de Germoplasma, Limón, Costa Rica.
 0000-0002-2682-816X.

2 Universidad EARTH, Colecciones de Germoplasma, Limón, Costa Rica.

 0000-0001-5100-3808.

3 Universidad EARTH, Colecciones de Germoplasma, Limón, Costa Rica.

 0000-0003-0004-732X.

ensayos de autopolinización para evaluar la respuesta de las accesiones a este método que condujera a la obtención de líneas puras. **Resultados.** Los resultados a partir del dendrograma Maximum Parsimony permitieron diferenciar 5 grupos filogenéticos, los cuales poseen una estrecha relación con el grado de espinosidad de las cápsulas. Al condensar el dendrograma a un 50% se obtuvieron 2 grupos diferenciados por la presencia o ausencia de espinas en las cápsulas, esto posiciona a esta característica como la determinante para el agrupamiento de los materiales. Las accesiones con espinas presentan mayor número de semillas por cápsula, mientras que las accesiones sin espinas poseen mayor contenido de bixina y mayor peso de semilla. Los ensayos de autopolinización revelaron una aparente autoincompatibilidad de acción tardía en algunas accesiones. **Conclusión.** Esta investigación generó información sobre la identificación de las accesiones, como una primera fase encaminada a la obtención de líneas homocigotas para conservar la identidad genética de las accesiones del Banco de Germoplasma de la Universidad EARTH.

INTRODUCCIÓN

El achiote (*B. orellana* L.) es una especie originaria del Amazonas (Record y Hess 1949, Molau 1983) que pertenece a la división Magnoliophyta y a la familia Bixacea (Thorne 1992, Eguiarte *et al.* 2003). Tiene mucha importancia desde los antepasados debido a su valor comercial como colorante, sus características medicinales y como parte de la cultura indígena. Actualmente el uso de la bixina, el pigmento vegetal principal del achiote se ha visto impulsado por el biocomercio sostenible, aprovechamiento de recursos ecológicos y además por ser una excelente alternativa ante los efectos carcinógenos y alergénicos ocasionados por pigmentos químicos

to determine relationships between phenotypic and molecular characteristics. Self-pollination trials were also carried out to evaluate the response of the accessions to this method leading to the obtention of pure lines. **Results.** The results from the Maximum Parsimony dendrogram allowed to differentiate five phylogenetic groups, which are closely related to the degree of spinosity of the capsules. By condensing the dendrogram to 50%, 2 groups were obtained, differentiated by the presence or absence of spines in the capsules, which positions this trait as a determinant for the grouping of materials. Accessions with spines had a higher number of seeds per capsule, while accessions without spines had a higher bixin content and higher seed weight. Self-pollination assays revealed apparent late-acting self-incompatibility in some accessions. **Conclusion.** This study generated information on the identification of the accessions and is a first phase aimed at obtaining homozygous lines to preserve the genetic identity of the accessions in the EARTH University Germplasm Bank.

sintéticos (Leal y Michelangeli 2010). En el 2014, el mercado mundial de carotenoides fue valorado en USD 1.5 mil millones, de lo cual el achiote tuvo una producción alrededor de 10 millones de megagramos, principalmente en Perú y Kenia, con los principales consumidores EE. UU., la Unión Europea, el Reino Unido y Dinamarca (Abdo 2015, März 2015).

Según un estudio sistemático del género, realizado por Baer (1976), reconoce 5 especies de *Bixa* (*B. orellana*, *B. arborea*, *B. excelsa*, *B. platycarpa* y *B. urucurana*), estas se distinguen por el hábito de crecimiento, como árboles o arbustos. Ambrósio *et al.* (2015) afirman la propuesta taxonómica de Pilger publicada por Kuntze (1925), quien clasifica a *B. urucurana* como una

variedad de *B. orellana* L. para identificar así, al ancestro salvaje del achioté cultivado.

El achioté es un cultivo del Neotrópico, que puede cultivarse con facilidad desde el nivel del mar hasta los 1400 msnm, con rangos de temperatura óptima que oscilan entre 20°C y 30°C, el cultivo se adapta a amplias condiciones de precipitaciones anuales desde 600 mm hasta 2000 mm (Arce Portuguese 1999). El cultivo empieza su producción a los 2 años y a partir de los 4 años su producción es mayor y más uniforme, con una densidad de 1111 árboles, el rendimiento será de 2597 kg de semilla por hectárea por año (Quiñones Bravo y Yunda Romero 2014). La floración característica del cultivo de achioté es escalonada descendente (Arriaza Meza 1990). Según Rodríguez y Enríquez (1983) la apertura de las flores inicia entre las 4:00 am y 5:00 am y el grano de polen permanece viable por un período de 10 horas a 11 horas, en las condiciones de Turrialba, Costa Rica.

Las semillas de achioté son consideradas ortodoxas, resisten la desecación y esto tiene relevancia para la conservación y almacenamiento del germoplasma (Velho Do Amaral *et al.* 2000). En las semillas se encuentra la bixina, cuya nomenclatura química es monometil éster del ácido norbixin dicarbónico ($C_{25}H_{30}O_4$) y representa del 80% al 90% de los colorantes totales del achioté (Smith *et al.* 1992). El mínimo porcentaje de bixina aceptable en el mercado internacional para variedades comerciales es de 2,5% (Arce Portuguese 1984).

A nivel citogenético el achioté cuenta con un número cromosómico haploide $n=7$ y un número cromosómico diploide $2n=14$ (Lombello y Pinto-Maglio 2014). *Bixa orellana* L. ha sido una especie domesticada, lo cual se evidencia en las diferencias con los ancestros silvestres en los contenidos variables de bixina que poseen los materiales silvestres, que sugiere, ha existido un flujo de genes responsables de esta característica desde dichos materiales hasta los cultivados (Ambrósio *et al.* 2015).

Actualmente, para la identificación de especies y clasificaciones taxonómicas, se ha

recurrido a utilizar técnicas moleculares para respaldar los resultados, es por esto que han cobrado importancia términos como “DNA Barcoding” (código de barras de ADN). Las regiones DNA Barcoding deben tener una buena amplificación por PCR universal, poder de diferenciación entre especies, complementación entre loci, amplitud en aplicación taxonómica y análisis bioinformático (Erickson *et al.* 2008). Dentro de estas regiones se encuentran las secuencias espaciadoras internas transcritas (ITS) ITS1 e ITS2 que presentan una cantidad pequeña de nucleótidos como 565 pb a 700 pb en angiospermas que pueden amplificarse fácilmente por PCR y secuenciarse con iniciadores universales (Baldwin *et al.* 1995).

La secuenciación del ADN consiste en determinar el orden de nucleótidos que conforman el ADN en un segmento específico. Existen varios métodos para realizarlo, como el método Sanger, pirosecuenciación, secuenciación por nanoporos, entre otros (Bleidorn 2017). La comparación de las secuencias de ADN es la base del análisis bioinformático, así como el primer paso para el análisis estructural y funcional. El proceso más elemental en este tipo de comparación es la alineación de secuencias, donde se realiza una comparación mediante la búsqueda de patrones de caracteres comunes y el establecimiento de los residuos de correspondencia entre las secuencias relacionadas. Este proceso es fundamental en la búsqueda de similitudes y el alineamiento de secuencias múltiples (Meneses *et al.* 2011).

Para el alineamiento de secuencias múltiples, se tienen disponibles varias herramientas, el alineamiento MUSCLE es una de ellas, se basa en el algoritmo Needleman-Wunsch y se puede utilizar para alinear las secuencias de ADN o de proteínas con el objetivo de evidenciar la topología, así como su origen evolutivo (Meneses *et al.* 2011).

Un árbol filogenético es la representación gráfica de las relaciones genéticas existentes entre organismos; para la construcción de un árbol filogenético existen en general 2 métodos, el basado en distancias y el basado en caracteres, este último utiliza directamente las secuencias de ADN o proteínas, un ejemplo es el método

Maximum Parsimony, el cual es el más popular de la sistemática cladística y se basa en reconstruir un dendrograma que represente la relación genética entre las especies en estudio, el método busca la representación que tenga el menor número de cambios genéticos con respecto a la secuencia de un ancestro común (Acero Barraza 2007).

Se debe considerar, la importancia de la conservación de la identidad genética de las accesiones en un banco de germoplasma para futuros programas de fitomejoramiento, ya que es fundamental conducir hacia la homocigosis de los cultivares, con diversos métodos: autopolinización, hermanos completos y medios hermanos (ordenados según la rapidez para obtener endogamia). Los sistemas de fitomejoramiento que conducen a la endogamia se basan en apareamientos no aleatorios, esto va en contra del equilibrio de Hardy-Weinberg (Acquaah 2012). Por tanto, también es importante conservar la heterocigosis y de esta forma mantener la diversidad genética de la especie, que es una fuente de genes para futuras necesidades en cuanto al mejoramiento del cultivo.

Como objetivo principal del proyecto se tuvo, evaluar diferencias fenotípicas y moleculares de 18 accesiones del Banco de Germoplasma de Achiote (*Bixa orellana* L.) de la Universidad EARTH, para demostrar por medio de un dendrograma, la topología que existe entre estas y de esta forma establecer relaciones basadas entre rasgos fenotípicos y marcadores moleculares. Con el fin de establecer una primera fase para la obtención de líneas homocigotas, se realizaron ensayos de autopolinizaciones en las distintas accesiones de achiote.

Por tanto, este proyecto procuró generar información valiosa para la conservación tanto in situ como ex situ y el manejo de la diversidad genética, por medio del uso de herramientas biotecnológicas que faciliten la implementación de programas de fitomejoramiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Ubicación y descripción del banco de germoplasma. El proyecto se realizó en la

Finca Académica de la Universidad EARTH, Las Mercedes, Guácimo, Limón, Costa Rica, entre las coordenadas 10°12'25'' N y 83°35'59'' O, a una elevación de 44 msnm. La temperatura promedio anual de la zona es de 25°C, con una humedad relativa promedio anual de 85% y una precipitación promedio anual de 3687 mm (Universidad EARTH 2021). El Banco de Germoplasma de Achiote (*Bixa orellana* L.) de la Universidad EARTH fue establecido en 1993 y cuenta con un total de 18 accesiones procedentes de Guatemala, Costa Rica y Panamá (Tabla 1), que fueron previamente seleccionadas del Banco de Germoplasma del CATIE como genotipos promisorios debido a su alto contenido de bixina.

Tabla 1. Procedencia e inventario de plantas (año 2021) de las distintas accesiones existentes en el Banco de Germoplasma de la Universidad EARTH.

Accesión	País de procedencia	Ubicación	Inventario de plantas año 2021
EARTH-FIO	Costa Rica	Guácimo	18
EARTH-1	Costa Rica	Guácimo	8
10707-1	Panamá	Veraguas	4
10707-2	Panamá	Veraguas	9
10707-3	Panamá	Veraguas	17
10752-1	Panamá	Veraguas	24
10752-2	Panamá	Veraguas	8
11395-2	Guatemala	Izabal	16
11549-2	Guatemala	Petén	15
11549-4	Guatemala	Petén	2
11646-2	Guatemala	Palencia, Guatemala	14
12300-3	Guatemala	Retalhuleu	12
12883-2	Costa Rica	Cartago	14
12887-1	Costa Rica	Cartago	18
12891-1	Costa Rica	Cartago	21
6112-2	Guatemala	Suchitepéquez	18
9931-1	Costa Rica	Alajuela	11
9932-2	Costa Rica	Alajuela	19

Caracterización fenotípica. Se seleccionaron de 2 a 5 plantas de cada accesión según la disponibilidad dentro del Banco de Germoplasma de la Universidad EARTH. Se evaluaron características morfológicas de tallo, hoja, flor y fruto de las 18 accesiones de achiote con las que

cuenta la colección. Para la evaluación en campo se utilizaron descriptores generales y botánicos desarrollados por Arce Portuguese (1983), en donde se enlistan los criterios de clasificación en función de las características morfológicas (Tabla 2).

Tabla 2. Descriptores fenotípicos utilizados para la caracterización del Banco de Germoplasma de Achiote de la Universidad EARTH.

Descriptor fenotípico	Descripción y forma de medición
País y lugar de procedencia	País y punto geográfico de procedencia del germoplasma.
Estado fisiológico	Estado de desarrollo en el que se encuentra la planta al momento de realizar la caracterización, la escala de medición es la siguiente: 3 = estado vegetativo, se observa activo crecimiento y mucho follaje; 5 = estado reproductivo, período entre la aparición de los primeros botones florales hasta la formación de más del 50% de las cápsulas; 7 = estado de fructificación: período entre la aparición de las primeras cápsulas y la madurez comercial.
Altura de planta (m)	Altura de la planta tomada con un clinómetro, expresada en metros desde la base del suelo hasta el ápice.
Diámetro de copa (m)	Diámetro de la planta expresado en metros en la parte más ancha.
Circunferencia del tallo (cm)	Circunferencia del tallo expresado en centímetros tomado con un flexómetro, medido a 20 cm del suelo.
Hábito de crecimiento	La relación entre altura (m) y diámetro de copa (m) y escala de medición es: 1 = redondeado; 2 = piramidal; 3 = ovoide; 4 = achatado; 5 = alargado.*
Número de panículas	Número total de panículas por planta.
Promedio de cápsulas por panícula	Promedio del número de cápsulas por panícula, cuantificado en una muestra de diez panículas.
Visibilidad de panículas	Grado de visibilidad que reflejan las panículas en la planta, se expresa: 3 = bajo; 5 = intermedio; 7 = alto.*
Longitud y ancho de la lámina foliar y peciolo (cm)	Longitud desde la base al ápice y ancho en la parte más ancha del limbo de la hoja expresado en centímetros.
Color del haz, envez y peciolo	Color obtenido a partir de la paleta de colores.
Color de la flor	Color de los pétalos obtenidos a partir de la paleta de colores.
Longitud, ancho y longitud a la parte más ancha de la cápsula (cm)	Longitud desde la base al ápice de la cápsula; ancho de la cápsula en la sección más ancha y longitud desde la base a la parte más ancha, todas las mediciones expresadas en centímetros.
Color de cápsula inmadura y madura	Color en estado maduro e inmaduro de la cápsula según la paleta de colores.
Grado de espinosidad y longitud de las espinas	El grado de espinosidad se refiere a la presencia o ausencia de espinas en la cápsula, se expresa: 0 = sin espinas; 1 = muy bajo; 3 = bajo; 5 = intermedio; 7 = alto; 9 = muy alto.* La longitud de las espinas se expresa en la siguiente escala: 1 = muy cortas; 3 = cortas; 5 = intermedias; 7 = largas; 9 = muy largas.*
Dehiscencia de la cápsula en madurez comercial	Se refiere a la apertura de la cápsula en punto de cosecha, se expresa: 0 = Indehiscente + = dehiscente.*

Descriptor fenotípico	Descripción y forma de medición
Número de semillas por cápsula	Cantidad de semillas por cápsula, contabilizadas y promediadas a partir de diez cápsulas.
Forma del ápice y base de la cápsula	La forma del ápice tomada en frutos en madurez comercial se clasifica en: 1 = redondeado; 2 = agudo; 3 = acuminado; 4 = otro.* La forma de la base tomada en frutos en madurez comercial se clasifica en: 1 = redondeada; 2 = obtusa; 3 = cordada.*
Forma de la cápsula	Forma del fruto tomada en madurez comercial se clasifica en: 1 = hemisférica; 2 = ovoide; 3 = cónica.*
Peso seco de 100 semillas (g)	Peso de 100 semillas expresado en gramos, después de secar en un horno durante 48 horas a 65°C.
Contenido de bixina (%)	Porcentaje de bixina que presentan las semillas, los datos fueron recolectados del proyecto de graduación desarrollado en el mismo Banco de Germoplasma de la Universidad EARTH por Villalobos (1997), quien utilizó la metodología de KALSEC (Herrera 1995). Se pesan 10 g de semilla extraída y se transfieren a un Erlenmeyer de 225 mL. Se añade 150 mL de solución extractora, la cual es compuesta de 4,42% de hidróxido de amonio, 58,64% de metanol y 37% de cloruro de metileno. Se agitan las muestras durante una hora colocadas en columnas de condensación. Después, las muestras se filtran al vacío y la solución se transfiere a un balón de fondo plano de 250 mL y se afora con acetona. Esta solución se agita y se pipetea 0,25 mL de solución uniforme que se colocan en un balón de 100 mL y se afora nuevamente con acetona. Se toman lecturas de absorbancia en el espectrofotómetro, calibrado a una longitud de 487 nanómetros (Longitud de onda a la cual el pigmento presenta mayor absorbancia según los laboratorios de KALSEC, Michigan, Estados Unidos de América). El contenido de bixina se calcula por la siguiente fórmula (61,8 es la absorbancia que reporta la bixina en estado puro, según los laboratorios de KALSEC, Michigan Estados Unidos de América): $\% \text{ de bixina} = (\text{Absorbancia (longitud de onda 487)} \times 100) / 61,8.$
Longitud y ancho de la semilla (mm)	Se refiere a la longitud desde la base al ápice y el ancho en la sección más ancha de la semilla expresados en milímetros.
Susceptibilidad a plagas	Se refiere al estado fitosanitario general de la planta, se clasifica como: 0 = no susceptible, 3 = poco susceptible, 5 = susceptibilidad media, 7 = susceptibilidad alta.*

*(Arce Portuguese 1999).

Caracterización genotípica. Se tomaron muestras foliares de una planta en campo por cada accesión, las muestras se procesaron de la siguiente manera: se pesaron 2 g de tejido que fueron colocados en tubos Falcon de 50 mL y luego se liofilizaron por 48 horas para asegurar la calidad del tejido, posteriormente se extrajo el ADN genómico y la determinación de la cantidad e integridad mediante Nanodrop y gel de electroforesis; luego se realizó el ajuste de la concentración de ADN mínimo a 50 ng.μL⁻¹. Después la amplificación de la región ITS2

se llevó a cabo mediante la técnica PCR con imprimadores universales UniPlantF (5'-TGT-GAATTGCARRATYCMG-3') y UniplantR (5'-CCCGHYTGAYYTGRGGTCDC-3') (Moorhouse-Gann *et al.* 2018). Posteriormente, se hizo la visualización de la amplificación de productos de PCR en gel de electroforesis y la limpieza de los productos con un el kit de purificación Thermo Scientific™ K0701. Para la secuenciación de la región ITS2 se utilizó el método Sanger y el kit Thermo Fisher Scientific A38073 en secuenciador ABI 3500.

Análisis de datos fenotípicos y genotípicos. Se efectuó un análisis estadístico descriptivo con el programa R para las variables fenotípicas cuantitativas analizadas. Para las relacionadas al tamaño de la cápsula, semilla y hoja, previamente en Excel se hizo un filtrado por rangos y posteriormente un análisis de frecuencias, con el fin de obtener grupos o clases de tamaño estadísticamente representativos respecto a la población.

Los electroferogramas se cargaron al programa MEGA-X donde se procedió a realizar un alineamiento de secuencias múltiple mediante el método MUSCLE, luego se realizó un árbol filogenético mediante el método Maximum Parsimony (MP), en el parámetro prueba de filogenia se añadió un soporte de Bootstrap con 1000 réplicas. Después este árbol filogenético fue condensado al 50% para incrementar el soporte estadístico de los clados y relacionarlo con las características morfológicas.

Adicionalmente, se efectuó un análisis de la relación entre los datos moleculares obtenidos a partir de la creación del dendrograma MP y las características morfológicas: color de cápsula, grado de espinosidad de la cápsula, longitud de espigas de la cápsula, número de panículas por planta por cosecha, número de cápsulas por panícula, número de semillas por cápsula, peso seco de 100 semillas (g) y contenido de bixina (%), para lo cual se elaboraron gráficas de medias clasificadas según los grupos filogenéticos.

Ensayos de autopolinización. Se realizaron ensayos de emasculación y autopolinización de botones florales previo a la antesis entre las 5:00 am a 8:00 am, los botones florales

autopolinizados se cubrieron con sobres de papel de dimensiones 177 mm x 89 mm para evitar el ingreso de insectos a la flor que pudieran contaminarla con polen externo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Caracterización fenotípica. El Banco de Germoplasma de la Universidad EARTH muestra diferencias marcadas en las características relacionadas al color, forma y espinosidad de la cápsula (Figura 1). Existe una relación entre el color de la cápsula y flor, cuando las cápsulas son rojas y amarillas las flores son de color rosado, cápsulas de color verde presentan coloración blanca o rosada pálida en sus flores, mientras que cápsulas de color marrón tendrán flores rosadas y violetas (Arce Portuguese 1984). Estos datos concuerdan con la caracterización fenotípica realizada en este estudio en el Banco de Germoplasma de Achiote de la Universidad EARTH, las accesiones EARTH-FIO y 12300-3 presentan flores blancas y cápsulas de color verde, mientras que el resto de los materiales presentan flores rosadas y cápsulas rojas, amarillas o cápsulas de color intermedio entre rojo y verde. El color de la cápsula tiene relevancia porque existe una alta correlación estadística entre el color de la cápsula y la susceptibilidad a plagas y enfermedades, los frutos con coloración roja y café tienen un mayor grado de susceptibilidad a *Oidium* spp., por otra parte, frutos de color verde y café son susceptibles al ataque de *Leptoglossus zonatus* (Arce Portuguese 1984).

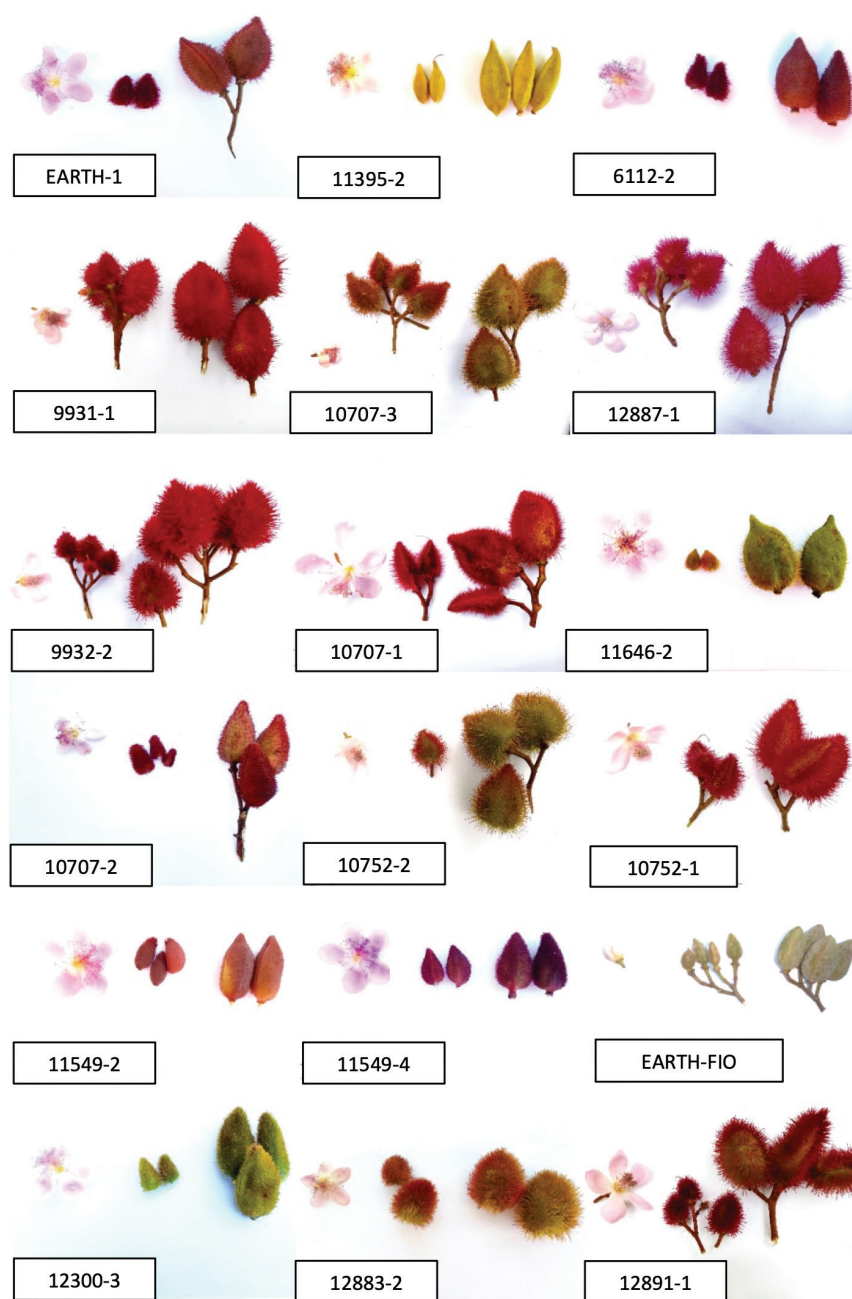


Figura 1. Diferencias fenotípicas entre las accesiones del Banco de Germoplasma de Achote de la Universidad EARTH.

Las variables morfológicas asociadas a la forma de la cápsula y semilla muestran diferencias fenotípicas marcadas (Tabla 3), estas características morfológicas están relacionadas con el volumen y cantidad de semillas que puede albergar un material en sus cápsulas, esto influye directamente en el rendimiento del cultivar. Adicionalmente, la presencia de espinas determina

la facilidad para el manejo postcosecha de las cápsulas, donde los cultivares glabros son los deseados, para tener un proceso postcosecha más limpio. Una de las características deseadas en cultivares comerciales es la indehiscencia al punto de madurez comercial para reducir la degradación de la bixina por fotooxidación.

Tabla 3. Variables fenotípicas de las distintas accesiones del Banco de Germoplasma de Achioté de la Universidad EARTH.

Accesión	Grado de espinosidad	Longitud de espinas	Forma del fruto	Tamaño de cápsula	Tamaño de hoja	Hábito de crecimiento	Susceptibilidad a plagas	Visibilidad de panículas
EARTH-1	Alto	Largas	Ovoide	Mediano	Mediano	Ovoide	Poca	Intermedia
EARTH-FIO	Sin espinas	Muy cortas	Cónica	Muy pequeño	Muy pequeño	Redondeado	Alta	Alta
10707-1	Alto	Largas	Ovoide	Mediano	Mediano	Redondeado	Intermedia	Alta
10707-2	Bajo	Cortas	Cónica	Mediano	Mediano	Redondeado	Poca	Poca
10707-3	Muy alto	Largas	Ovoide	Mediano	Mediano	Ovoide	Intermedia	Alta
10752-1	Muy alto	Largas	Ovoide	Mediano	Mediano	Achatado	Poca	Intermedia
10752-2	Muy alto	Largas	Ovoide	Pequeño	Mediano	Piramidal	Intermedia	Alta
11395-2	Sin espinas	Muy cortas	Cónica	Pequeño	Mediano	Ovoide	Intermedia	Alta
11549-2	Sin espinas	Muy cortas	Cónica	Pequeño	Muy pequeño	Piramidal	Poca	Poca
11549-4	Alto	Cortas	Cónica	Pequeño	Pequeño	Ovoide	Poca	Poca
11646-2	Bajo	Largas	Ovoide	Mediano	Mediano	Redondeado	Intermedia	Intermedia
12300-3	Alto	Largas	Cónica	Grande	Mediano	Piramidal	Intermedia	Alta
12883-2	Muy alto	Muy largas	Hemisférica	Pequeño	Mediano	Achatado	Alta	Poca
12887-1	Muy alto	Muy largas	Ovoide	Mediano	Mediano	Redondeado	Alta	Alta
12891-1	Alto	Cortas	Hemisférica	Grande	Grande	Achatado	Alta	Intermedia
6112-2	Bajo	Largas	Ovoide	Mediano	Mediano	Piramidal	Poca	Alta
9931-1	Muy alto	Largas	Ovoide	Muy grande	Mediano	Redondeado	Intermedia	Intermedia
9932-2	Muy alto	Largas	Ovoide	Pequeño	Mediano	Redondeado	Intermedia	Intermedia

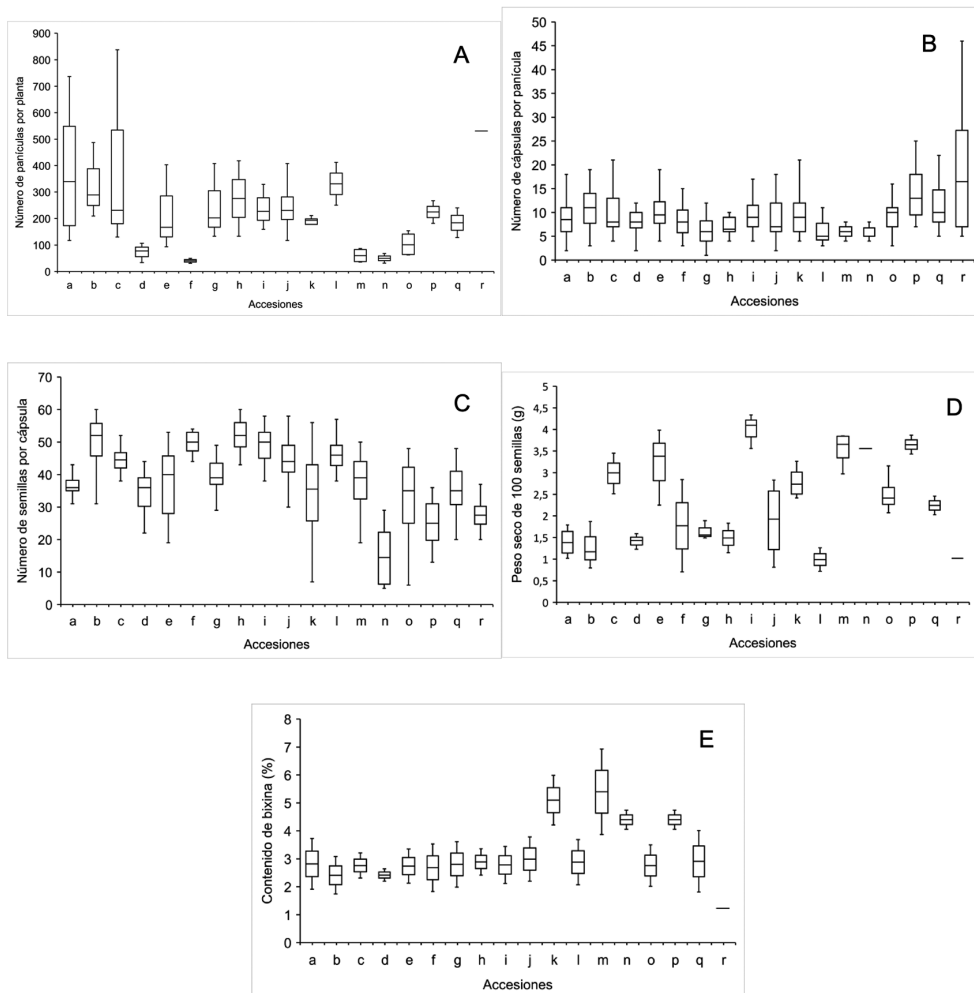
En la mayoría de los casos, las accesiones que presentaron una mayor resistencia a plagas y enfermedades fueron las que no tenían espinas o que poseían un grado de espinosidad bajo o bien que presentaban espinas cortas. Por otra parte, las más susceptibles eran las que presentaban

alto grado de espinosidad y espinas largas. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Arce Portuguese (1984) quien encontró que materiales de achioté con pocas espinas o con ausencia de ellas presentaban mayor resistencia al ataque de *Leptoglossus zonatus* y Lepidópteros, esto puede

relacionarse con la mayor consistencia y grosor de la epidermis de la cápsula en materiales sin espinas. De igual forma accesiones como la 12891-1 con una arquitectura de planta achatada que permite poca ventilación y con hojas grandes propicia el incremento de sombra y esto favorece el desarrollo de *Oidium* spp.

Se presenta una amplia variabilidad genética en cuanto a las variables relacionadas al rendimiento de las accesiones (Figura 2), se tienen unas con características contrastantes, por ejemplo la accesión 11549-2 presenta valores menores

para las variables número de panículas por planta (menor a 100) y número de cápsulas por panícula (menor a 10), sin embargo, posee valores más altos para las variables número de semillas por cápsula (entre 20 semillas y 50 semillas), peso de 100 semillas (3 g a 4 g) y contenido de bixina (4% a 7%), por lo que el banco de germoplasma representa una fuente de alelos para poder iniciar con programas de mejoramiento genético y proyectos de investigación acerca de la genética de la especie.



Código	a	b	c	d	e	f	g	h	i
Accesión	10707-3	10752-1	12887-1	10752-2	10702-2	12883-2	9932-2	10707-1	EARTH-1
Código	j	k	l	m	n	o	p	q	r
Accesión	12891-1	11646-2	9931-1	11549-2	11549-4	6112-2	11395-2	12300-3	EARTH-FIO

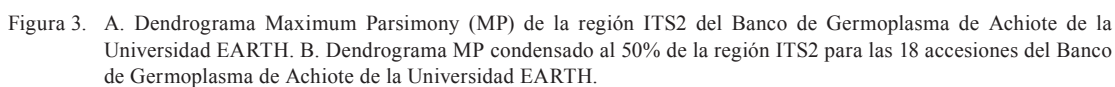
Figura 2. Diferencias fenotípicas del banco de germoplasma de la Universidad EARTH para las variables: A. Número de panículas por planta. B. Número de cápsulas por panícula. C. Número de semillas por cápsula. D. Peso seco de 100 semillas (g) E. Contenido de bixina (%).

Análisis de datos moleculares. Al analizar la tipología del dendrograma del Banco de Germoplasma de Achiote de la Universidad EARTH obtenido a partir de las secuencias de la región ITS2 (Figura 3A), es posible observar que las accesiones se agrupan en 5 clados, los cuales conservan una similitud interna con base en características fenotípicas, como grado de espinosidad y longitud de las espinas de la cápsula; en cuanto al color de las cápsulas no es notable ningún patrón de agrupación debido a que en los diferentes grupos se observó una variación de colores verde, rojo y amarillo y algunas como la 10707-3, 12883-2, 10752-2 y la 12891-1 con colores intermedios entre verde y rojo, por lo que se puede considerar una posible recombinación genética si se toma en cuenta que las accesiones fueron establecidas por semilla y que el achiote es una especie alógama.

Por su parte, el dendrograma MP condensado al 50% de la región ITS2, el cual elimina los clados con menor soporte estadístico y se enfatiza en regiones más confiables de los patrones de ramificación, lo que hace una diferenciación de las accesiones en 2 grupos filogenéticos con base

en la presencia o ausencia de espinosidad (Figura 3B), donde las 11549-2, 11395-2 y EARTH-FIO son las que carecen de espinas, mientras que las otras 15 accesiones presentaron espinas. Adicionalmente se podrían analizar otras regiones del genoma a partir del ADN del cloroplasto como las regiones *ndhF* and *trnL-F*, ya que este al ser heredado de la madre, puede proporcionar secuencias de genes específicos o regiones intergénicas que son filogenéticamente informativas (Akiyama *et al.* 2011) y de esta forma fortalecer las relaciones entre cultivares del mismo linaje, y por tanto facilitar el estudio de relaciones de parentesco entre cultivares.

Hay que tomar en cuenta que las accesiones provienen del Banco de Germoplasma del CATIE y es posible evidenciar recombinación genética en características fenotípicas como el color de las cápsulas, que según Dequigiovanni *et al.* (2018) encontraron una alta correlación entre la distancia genética y distancia geográfica entre 10 poblaciones silvestres de achiote en el Amazonas, lo cual en ese estudio sugiere que la diferenciación genética se debe a la distancia geográfica.



En este estudio no se encontró una asociación concluyente entre la distancia geográfica y la distancia genética de los cultivares.

Relación entre rasgos fenotípicos y datos moleculares. En cuanto a la relación entre los grupos filogenéticos (Figura 3A) y las variables cuantitativas, se evidenció que existe una relación entre los grupos filogenéticos con los rasgos morfológicos de las accesiones que conforman dichos grupos. Para la variable número de panículas por planta el grupo filogenético que presenta mayores resultados es el compuesto por las accesiones 10752-1, 11646-2, 10707-2 y EARTH-1 (Figura 4A). En el caso de la variable número de cápsulas por panícula fueron las 11549-2, 11395-2 y EARTH-FIO las que presentaron mayor media (Figura 4B). Esos resultados se deben a que en las accesiones previamente mencionadas, se observaron altos niveles de floración. La variable número de semillas por cápsula, fueron las 12883-2, 9931-1, 10707-1, 12300-3 y 12887-1 las que presentaron mayor media (Figura 4C). Estos resultados están relacionados a que esas accesiones presentan un tamaño de cápsula grande y semillas pequeñas, lo que concuerda con los resultados obtenidos por Medina *et al.* (2001) quienes asocian el mayor número de semillas con un mayor tamaño de cápsula. Para la variable peso seco de 100 semillas fueron las 11549-2, 11395-2 y

EARTH-FIO las que presentaron mayores resultados (Figura 4D). Este grupo presentó cápsulas pequeñas, sus semillas son más grandes y por ende registran un mayor peso. Del mismo modo para la variable contenido de bixina fueron las 11549-2, 11395-2 y EARTH-FIO las que presentaron resultados más altos (Figura 4E), también es importante destacar que fue posible observar que son las accesiones sin espinas las que poseen un mayor peso de semilla y un mayor contenido de bixina (11549-2, 11395-2 y EARTH-FIO) esto puede estar relacionado con la presión de selección que se ha realizado hacia materiales cultivables con altos contenido de bixina y sin presencia de espinas que faciliten el proceso postcosecha, Ambrosio *et al.* (2015) mencionan que la especie no cultivada *Bixa urucurana*, el ancestro más cercano a *Bixa orellana* cuenta con espinosidad en la cápsula en ese estudio encontraron altos contenidos de bixina en poblaciones de achiote silvestre cercanas a áreas de cultivo de achiote, lo que sugiere un fuerte flujo de genes e introgresiones entre poblaciones silvestres y cultivadas.

En general el banco de germoplasma cuenta con diferentes materiales que presentan rasgos fenotípicos contrastantes por lo que este estudio sirve como base para poder iniciar con programas de mejora del cultivo.

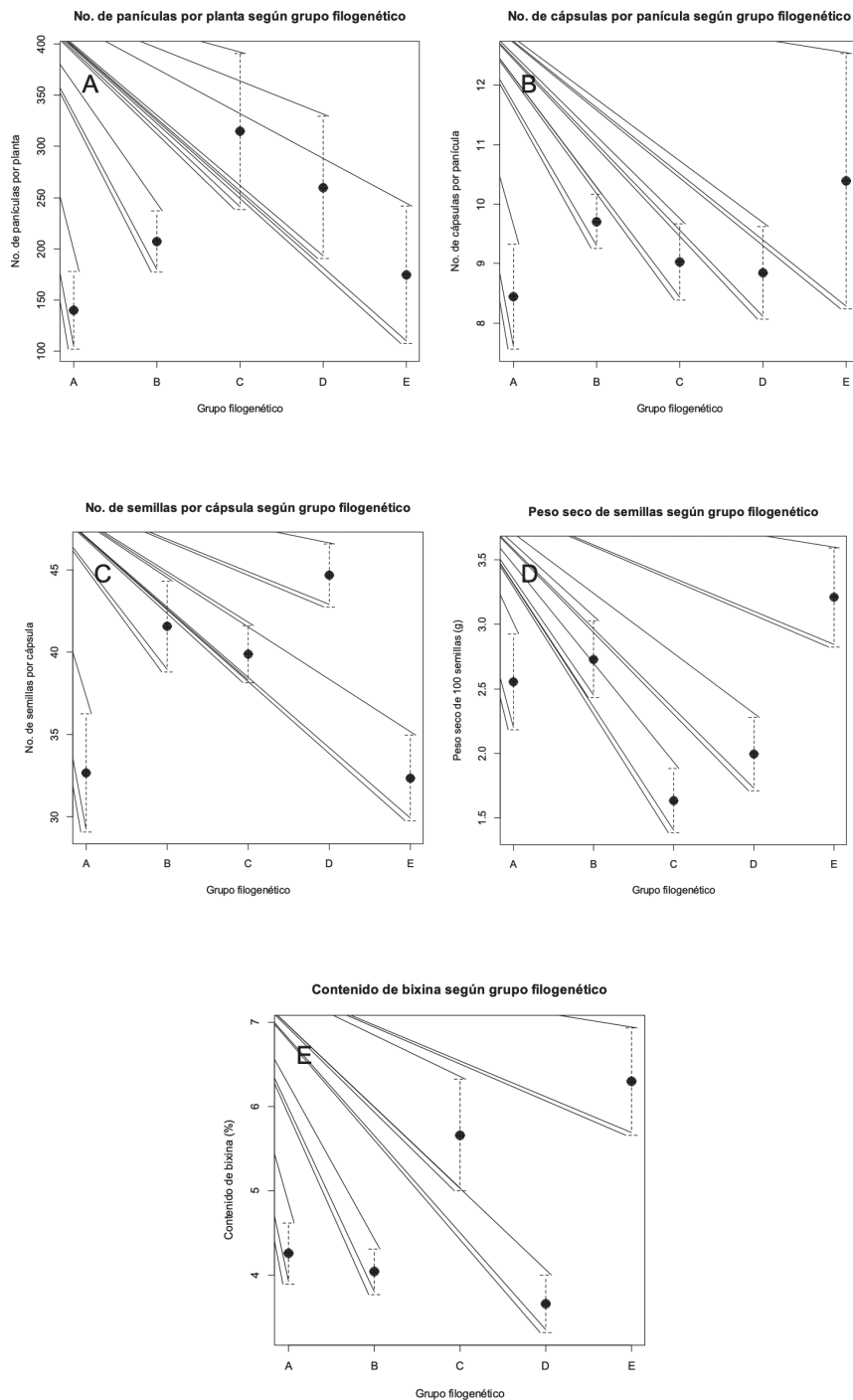


Figura 4. Relación entre grupos filogenéticos y las variables: A. Número de panículas por planta. B. Número de cápsulas por panícula. C. Número de semillas por cápsula. D. Peso seco de 100 semillas (g) E. Contenido de bixina.

Análisis de autopolinizaciones. Los resultados de los ensayos de autopolinización mostraron en promedio 33,33% de fecundación del total de 72 autopolinizaciones realizadas en 17 accesiones de achioté. En 4 (11395-2, 11646-2, 12300-3 y 6112-2) no fue posible obtener ninguna autofecundación con éxito, a pesar de ser en las

que más se realizaron ensayos (Tabla 4) lo que se puede relacionar con una autoincompatibilidad genética, pues es conocido que el achioté es una especie alógama con tasas de polinización cruzada de 57% y tasas de autopolinización de 37,5% (Rivera y Flores 1988).

Tabla 4. Resultados de las autopolinizaciones realizadas y fecundación obtenida en las accesiones del Banco de Germoplasma de Achioté de la Universidad EARTH.

Accesión	Autopolinizaciones realizadas	Autofecundaciones	Porcentaje de autofecundación
10707-1	2	2	100,00
10707-2	5	3	60,00
10752-1	2	2	100,00
11395-2	9	0	0,00
11549-2	6	1	16,67
11549-4	1	0	0,00
11646-2	9	0	0,00
12300-3	10	0	0,00
12887-1	2	2	100,00
12891-1	4	3	75,00
6112-2	6	0	0,00
9931-1	5	4	80,00
EARTH-1	5	3	60,00
12883-2	1	1	100,00
10707-3	1	1	100,00
10752-2	1	1	100,00
EARTH-FIO	3	1	33,33
Total	72	24	33,33

Una estrategia de las plantas alógamas para evitar la endogamia es la autoincompatibilidad genética, esta puede darse de distintas formas, que a nivel enzimático no exista compatibilidad entre el polen y el estigma, de modo que no se permita la emergencia del tubo polínico, también puede ser autoincompatibilidad de acción tardía y en esta puede ocurrir la penetración del tubo polínico, la descarga de gametos masculinos en sacos embrionarios e incluso la

fertilización, pero de una u otra forma la embriogénesis no continuará (Seavey y Bawa 1986).

En las accesiones 11395-2, 11646-2, 12300-3 y 6112-2 que no fue posible obtener cápsula por esta vía; se observaron señales de posible fecundación durante la primera semana, pero, luego de este tiempo las cápsulas abortaban, esto puede ser un indicador de autoincompatibilidad de acción tardía en estos genotipos. Varios autores en los últimos años han presentado resultados

acerca de sistemas de autoincompatibilidad de acción tardía en distintas familias como Bignoniaceae, Bombacaceae y Amaralidaceae (Bittencourt *et al.* 2003, Gibbs *et al.* 2004, Vaughton *et al.* 2010).

CONCLUSIONES

El presente estudio permitió determinar la amplia variabilidad genética del Banco de Germoplasma de la Universidad EARTH aspecto que facilitó el análisis de las relaciones filogenéticas entre las 18 accesiones. Se logró observar un patrón de agrupamiento que guarda relación con la característica fenotípica espinosidad de la cápsula y además se observaron signos de recombinación genética entre los cultivares. Las accesiones sin espinas en la cápsula presentaron mayor peso seco de semillas y el contenido de bixina más alto. Adicionalmente se identificó que las que tenían espinas en su fruto presentaron un número superior de semillas por cápsula, por lo que basados en este estudio, una identificación genotípica de materiales en estados tempranos sería un factor influyente para el aumento de la productividad en las plantaciones comerciales. Este proyecto estableció una primera fase encaminada hacia la obtención de líneas homocigotas, para la conservación de la identidad genética de los cultivares de achiote como fuente de alelos en futuros programas de fitomejoramiento.

LITERATURA CITADA

- Abdo, BM. 2015. Isolation, characterization and biological activities of food colorants from *Bixa orellana*. Tesis MSc. Haramaya, Etiopía, Haramaya University. 66 p.
- Acero Barraza, SM. 2007. Algoritmo para análisis filogenético: UPGMA. Tesis Ing. Sist. Barranquilla, Colombia, Universidad del Norte. 84 p.
- Acquaah, G. 2012. Principles of plant genetics and breeding. 2 ed. Maryland, Estados Unidos de América, Wiley. 756 p.
- Akiyama, Y; Goel, S; Conner, JA; Hanna, WW; Akiyama, HY; Ozias-Akins, P. 2011. Evolution of the apomixes transmitting chromosome in *Pennisetum*. BMC Evolutionary Biology 11(289):2-16.
- Ambrósio Moreira, P; Lins, J; Dequigiovanni, G; Veasey, EA; Clement, CR. 2015. Domestication of annatto (*Bixa orellana*) from *Bixa urucurana* in Amazonia. Economic Botany 69:127-135.
- Arce Portuquez, J. 1983. Aspectos sobre el achiote para Costa Rica y perspectivas para Costa Rica. Serie Técnica. Informe técnico n.º 47. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 169 p.
- Arce Portuquez, J. 1984. Caracterización de 81 plantas de achiote (*Bixa orellana* L.) de la colección del CATIE procedentes de Honduras y Guatemala y propagación vegetativa por estacas. Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 149 p.
- Arce Portuquez, J. 1999. El achiote: cultivo promisorio para el trópico. Guácimo, Costa Rica, EARTH. 62 p.
- Arriaza Meza, AD. 1990. Caracterización agromorfológica de 15 cultivares de achiote (*Bixa orellana* L.) en el Centro de Agricultura Tropical "Bulbuxya", San Miguel Panan, Suchitepequez, Guatemala. Tesis Lic. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala. 64 p.
- Baer, DF. 1976. Systematics of the genus *Bixa* and geography of the cultivated annatto tree. California, Estados Unidos de América, UCLA. 218 p.
- Baldwin, GB; Sanderson, MJ; Porter, JM; Wojciechowski, MF; Campbell, CS; Donoghue, MJ. 1995. The its region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Annals of the Missouri Botanical Garden 82(2):247-277.
- Bittencourt Jr, NS; Gibbs, PE; Semir, J. 2003. Histological study of post-pollination events in *Spathodea campanulata* Beauv. (Bignoniaceae), a species with late-acting self-incompatibility. Annals of Botany 91(7):827-834.
- Bleidorn, C. 2017. Phylogenomics: an introduction. Madrid, España, Springer. 235 p.
- Dequigiovanni, G; Ferreyra Ramos, SL; Gomes Lopes, MT; Roland Clement, C; Picanço Rodrigues, D; Gomes Fabri, E; Zucchi, MI; Veasey, EA. 2018. New microsatellite loci for annatto (*Bixa orellana*), a source of natural dyes from Brazilian Amazonia. Crop Breeding and Applied Biotechnology 18(1):116-122.
- Eguarte, LE; Castillo, A; Souza, V. 2003. Evolución molecular y genómica en angiospermas. Interciencia 28(3):141-147.
- Erickson, DL; Spouge, J; Resch, A; Weigt, LA; Kress, J. 2008. DNA barcoding in land plants: developing standards to quantify and maximize success. TAXON 57(4):1304-1316.
- Herrera, F. 1995. Caracterización de 126 genotipos de achiote (*Bixa orellana* L.) en una finca de la Región Atlántica de Costa Rica. Tesis Lic. Guácimo, Costa Rica, Universidad EARTH. 58 p.

- Gibbs, P; Bianchi, MB; Taroda Ranga, N. 2004. Effects of self-, chase and mixed self/cross-pollinations on pistil longevity and fruit set in *Ceiba* species (Bombacaceae) with late-acting self-incompatibility. *Annals of Botany* 94(2):305-310.
- Kuntze, C. 1925. Bixaceae. 2 ed. In Engler, A; Prantl, K (eds.). *Die natürlichen Pflanzenfamilien*. Leipzig, Alemania. 315 p.
- Leal, F; Michelangeli de Clavijo, C. 2010. Acerca de la historia, taxonomía, botánica y usos de *Bixa orellana* L. *Revista UNELLEZ de Ciencia y Tecnología* 28(1):78-86.
- Lombello, RA; Pinto-Maglio, CAF. 2014. Cytogenetics and reproductive biology of *Bixa orellana* L. (Bixaceae). *Cytologia* 79(3):379-386.
- März, U. 2015. The global market for carotenoids. BCC Publishing. FOD025E:1-173.
- Medina, AM; Michelangeli, C; Ramis, C; Díaz, A. 2001. Identificación y variabilidad genética de genotipos de onoto (*Bixa orellana* L.) mediante el uso de proteínas hidrosolubles e isoenzimas. *ResearchGate* 52:24-33.
- Meneses Escobar, CA; Rozo Murillo, LV; Franco Soto, J. 2011. Tecnologías bioinformáticas para el análisis de secuencias de ADN. *Scientia Et Technica* 16(49):116-121.
- Molau, U. 1983. *Bixaceae*. In Harling, G; Sparre, B (eds.). *Flora of Ecuador*. Göteborg, Suecia, University of Göteborg. 127 p.
- Moorhouse-Gann, RJ; Dunn, JC; de Vere, N; Goder, M; Cole, N; Hipperson, H; Symondson, WOC. 2018. New universal ITS2 primers for high-resolution herbivory analyses using DNA metabarcoding in both tropical and temperate zones. *Scientific Reports* 8(8542):1-15.
- Quiñones Bravo, X; Yunda Romero, MC. 2014. El achiote *Bixa orellana* L. como posible alternativa productiva para el Departamento del Meta. *Revista Sistemas De Producción Agroecológicos* 5(1):142-173.
- Record, SJ; Hess, RW. 1949. *Timbers of the New World*. Londres, Gran Bretaña, New Haven University Press. 640 p.
- Rivera, DI; Flores, EM. 1988. Morfología floral del achiote, *Bixa orellana* L. (Bixaceae). *Revista de Biología Tropical* 36(2B):499-509.
- Rodríguez, R; Enríquez, GA. 1983. Estudio preliminar del desarrollo de ramas y la biología floral en *Bixa orellana*. In Arce, J (ed.). *Aspectos sobre el achiote y perspectivas para Costa Rica*. Serie Técnica. Informe técnico n.º 47. Turrialba, Costa Rica, CATIE. p. 58-76.
- Seavey, SR; Bawa, KS. 1986. Late-acting self-incompatibility in Angiosperms. *The Botanical Review* 52(2): 195-219.
- Smith, N; Williams, J; Plucknett, D; Talbot, J. 1992. *Tropical forests and their crops*. Nueva York, Estados Unidos de América, Cornell University Press. 568 p.
- Thorne, RF. 1992. An updated classification of flowering plants. *ALISO* 13(2):365-368.
- Universidad EARTH. 2021. Base de datos climáticos (documento en Excel). Guácimo, Costa Rica, EARTH. sp.
- Vaughton, G; Ramsey, M; Johnson, SD. 2010. Pollination and late-acting self-incompatibility in *Cyrtanthus breviflorus* (Amaryllidaceae): implications for seed production. *Annals of Botany* 106:547-555.
- Velho Do Amaral, LI; Pereira, MF; Cortelazzo, AL. 2000. Germinação de sementes em desenvolvimento de *Bixa orellana*. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 12(3):273-285.



Agronomía Costarricense. Universidad de Costa Rica. Se encuentra licenciada con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr

Nota técnica

COMUNIDAD DE AVES Y DAÑOS QUE GENERAN EN LA PRODUCCIÓN AGRÍCOLA EN ALAJUELA, COSTA RICA

Carol Sánchez-Núñez¹, Javier Monge-Meza^{2/*}

Palabras clave: Avifauna; vertebrados plaga; agroecosistemas.

Keywords: Birds; vertebrate pest; agroecosystems.

Recibido: 07/09/2021

Aceptado: 15/12/2021

RESUMEN

Introducción. El conocimiento de la avifauna de agroecosistemas permite tener una visión de su función en estos sistemas de producción. **Objetivo.** Caracterizar la comunidad de aves que utilizan las áreas de cultivo de la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno y describir los daños que ocasionaron en la producción agrícola en el sitio. **Materiales y métodos.** Se efectuaron muestreos quincenales y se utilizó la técnica de puntos de observación, para el registro de las especies, la cantidad de individuos por especie, el cultivo en que se encontraban, la actividad que realizaban e impacto dañino en ese ambiente. **Resultados.** Se registraron 967 individuos pertenecientes a 55 especies de aves. Las especies *Volatina jacarina* y *Crotophaga sulcirostris* fueron las más abundantes con un 18,8% y 10,2% de los individuos registrados. Otras especies fueron *Dives dives* (9,8%), *Zenaida asiatica* (7,9%), *Turdus grayi* (6,1%) *Columbina inca* (6%) y *Patagioenas flavirostris* (5,9%). Se identificaron 12 especies (22%)

ABSTRACT

Birds' community and the damage they generate in agricultural production in Alajuela, Costa Rica. Introduction. Knowledge of agroecosystems' avifauna allows to have a vision of its function in such production systems. **Objective.** To characterize the community of birds that uses the farming areas of Fabio Baudrit Moreno Agricultural Experimental Station and to describe the damage they produced to the crops on the site. **Materials and methods.** We carried out biweekly samplings using observation points. In each point we annotated richness, number of individuals per species, activity they performed, and if they were causing any damage. **Results.** We registered 967 individuals belonging to 55 species of birds. The species *Volatina jacarina* and *Crotophaga sulcirostris* were the most abundant with 18.8% and 10.2%, respectively, of the individuals recorded. Other species were *Dives dives* (9.8%), *Zenaida asiatica* (7.9%), *Turdus grayi* (6.1%) *Columbina inca* (6%) and *Patagioenas flavirostris* (5.9%). Twelve species

* Autor para correspondencia. Correo electrónico: javier.monge@ucr.ac.cr

1 Universidad de Costa Rica, Escuela de Agronomía, Centro de Investigación en Protección de Cultivos e Instituto de Investigaciones Agrícolas, Costa Rica.
 0000-0001-9464-869X.

2 Universidad de Costa Rica, Escuela de Agronomía, Centro de Investigación en Protección de Cultivos, Costa Rica.

 0000-0003-1530-5774.

que generaron algún daño a la producción. Los daños se registraron en frijol, tomate, papaya, maíz, mango, pepino y melón. Otro tipo de daño observado fue en el sistema de riego por goteo, provocado por *Quiscalus mexicanus*. El cultivo más visitado por las aves fue el de mango, donde se observó la presencia de 29 especies de aves y le siguieron en orden de importancia, los cultivos de acerola, frijol y maíz, con la presencia de 20, 18 y 16 especies, respectivamente. **Conclusión.** En el sitio se registró un 6% de especies de aves del país, lo que sugiere que el sitio ofrece condiciones para el establecimiento de especies que se adaptan a estos ecosistemas. El 22% de las especies de aves registradas ocasionaron algún tipo de daño; en frijol se registraron 48 individuos, seguido de tomate (22) y maíz (18).

INTRODUCCIÓN

Las aves son organismos comunes en los agroecosistemas y cumplen diferentes funciones en estos ambientes. Algunas de las interacciones mutualistas, como la polinización con participación de aves (Guix 2021, Cuta-Pineda *et al.* 2020) o bien el control de plagas insectiles (Igua-Muñoz *et al.* 2020) son consideradas beneficiosas y a veces pasan desapercibidas, mientras que aquellas interacciones que las personas consideran perjudiciales son más fácilmente detectadas y en algunos casos sobrevaloradas (Bucher 1998), lo que conlleva a generar una percepción parcial y negativa acerca de la acción de las aves en esos sistemas de producción (Zaccagnini y Canavelli 1998).

En las áreas de producción agrícola, la disponibilidad, abundancia y variedad de alimentos, la presencia de sitios para reproducción y protección, así como la reducción de depredadores naturales, ha favorecido que algunas especies de vertebrados entren en conflicto con los productores al causar daños en sus cultivos

(22%) caused some damage to the production. Damage was recorded in beans, tomatoes, papaya, corn, mangoes, cucumbers, and melon. Damage was also observed in the irrigation system caused by *Quiscalus mexicanus*. Mango was the crop birds visited the most with 29 species observed followed by acerola, beans, and corn crops with the presence of 20, 18, and 16 species respectively. **Conclusion.** The site recorded 6% of the country's avifauna suggesting that it offers conditions for the establishment of species that adapt to its ecosystems. 22% of the recorded bird species caused some kind of damage. Most of the individuals generating damage were recorded in beans (48 individuals), tomato (22), and corn (18).

(Eliás y Valencia 1984). En Latinoamérica se ha reconocido la generación de daños por aves en diferentes cultivos, tales como arroz, maíz, sorgo, cítricos, girasol, entre otros (De Grazio y Besser 1970, Agüero *et al.* 2005, Romero-Banderas *et al.* 2006, Monge 2013), sin embargo, existen pocos estudios con evaluaciones precisas de daños (Sedano 2003), lo que limita, determinar para algunas especies, en forma objetiva si han alcanzado la condición de plaga, es decir aquella que pone en riesgo la rentabilidad de la actividad productiva, en un área geográfica o momento determinado (Monge 2013, Bucher 1984). En Costa Rica, la información existente referente a las especies de aves dañinas se limita a su identificación y no se dispone de información relacionada con la magnitud de los daños, así como de la caracterización de la problemática, la época en que ocurre, el comportamiento de los individuos, la dinámica poblacional de las especies, y menos aún acerca de resultados de prácticas de manejo (Monge 2013).

El desconocimiento de la problemática de las aves en la agricultura ha generado

históricamente, que el manejo de las aves se efectúe mediante la implementación de soluciones urgentes, basadas en daños sobreestimados y poco fundamentados. Esta situación ha llevado a la utilización de métodos de control poco selectivos y de gran impacto ambiental (Rodríguez y Zaccagnini 1998), como el uso de productos tóxicos o bien técnicas de ahuyentamiento que afectan a diferentes especies.

Un aspecto fundamental para el manejo de aves que generan daños en los cultivos es la correcta identificación de las especies implicadas en la generación del problema. Las especies de aves dañinas pertenecen principalmente a los órdenes Passeriformes, Columbiformes y Psittasiformes (González 2003). Dentro de estos 3 grupos, existen especies que por sus hábitos de alimentación y dinámica poblacional pueden alcanzar la condición de plaga. Sin embargo, es importante tener en cuenta que la presencia de una especie en un cultivo no implica necesariamente que provoque un daño, ya que podría sólo alimentarse de semillas de rastrojo y no del cultivo en pie, o bien, consumir insectos perjudiciales para un cultivo y semillas de malezas presentes (Dolbeer *et al.* 1994).

Además de una adecuada identificación de las especies, se deben considerar aspectos ecológicos de las mismas, los cuales son necesarios para entender el problema y determinar así una adecuada estrategia para el manejo de aves dañinas en cultivos agrícolas. Entre estos aspectos está la distribución espacial y temporal de las especies en relación con los cultivos vulnerables, así como la densidad o abundancia de la especie en las zonas afectadas, a fin de determinar cambios anuales y estacionales de las concentraciones de individuos y sus requerimientos del hábitat (Dyer y Ward 1977).

Otro elemento importante, es el ciclo de reproducción de la especie, tales como periodos de anidación y reclutamiento, información que permitiría establecer épocas durante las cuales podría incrementarse la tasa de daños en los cultivos, lo que ayudaría a establecer el momento

indicado para la aplicación de una estrategia efectiva de control poblacional (González 2003).

La dieta y el comportamiento de alimentación de las especies dañinas, así como la disponibilidad de alimentos naturales y cultivados, son aspectos importantes para considerar dentro de un programa de investigación para el manejo de aves (González 2003). Estos aspectos tienen relación con la distribución e intensidad del daño que generan en los cultivos, ya que determinará el tamaño de la población y sus fluctuaciones, la migración y la estacionalidad en la reproducción de la especie plaga (Dyer y Ward 1977).

Según los aspectos ecológicos que influyen en la dinámica aves-cultivos, es importante tener claro que los daños generados por las aves tienden a ser irregulares en el espacio y en el tiempo, por lo que definir claramente la problemática requiere un muestreo y diagnóstico exhaustivo (Bucher 1984). Asimismo, se debe tener en cuenta que los resultados que describen la problemática en una región, no deben ser estandarizados para diferentes áreas o periodos. Es importante considerar que, si bien el impacto de las aves en la agricultura generalmente no presenta valores altos de pérdidas en los estimados de la producción nacional, existen situaciones puntuales donde los daños pueden ser severos, principalmente cuando se afecta la producción de pequeños y medianos productores (González 2003).

El propósito de este estudio fue caracterizar la comunidad de aves que utilizan las áreas de cultivo de la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno y describir los daños que ocasionan en la producción agrícola en el sitio.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se desarrolló en la Estación Experimental Agrícola Fabio Baudrit Moreno (EEAFBM) ubicada en La Garita de Alajuela (10°01' Latitud Norte y 84°16' Longitud Oeste) a una altitud de 840 msnm y con una extensión de 53,6 ha. El sitio se caracteriza por una temperatura promedio anual de 23,3°C, 6,6 horas

de brillo solar, una precipitación anual de 1745,4 mm y una humedad relativa de 79% (IMN s. f.). La toma de datos se realizó de junio de 2017 a junio del 2018.

Para caracterizar la comunidad de aves presente en la EEAFBM, se utilizó la técnica de puntos de observación sin radio definido, los cuales se evaluaron de manera quincenal desde las 07:30 a 10:00 horas. Se establecieron como mínimo 2 puntos de observación por cada tipo de cultivo, con una distancia de separación de 100 metros entre puntos. Para las observaciones se utilizó binoculares (Bushnell 8x40) y se estableció un periodo máximo de observación de 5 min por punto. En cada punto de observación se registró los individuos y especies de las aves detectadas (Martínez *et al.* 2008, Ralph *et al.* 1996), además la actividad que realizaban sin disponerse de una lista predefinida, el tipo de cultivo y las características del cultivo en la cual se encontraban, tales como si el cultivo se encontraba en floración, en fructificación, el estado de madures de los frutos, si el cultivo fue recientemente plantado o se concentraba en estado de crecimiento temprano (plántula).

Para evaluar la incidencia de aves en los cultivos, se registró la especie y cantidad de individuos observados que generaron algún tipo de daño a la producción agrícola y se describió el tipo de daño ocasionado.

RESULTADOS

Durante el presente estudio se registraron un total de 967 individuos pertenecientes a 55 especies de aves, observadas en el interior de los campos de cultivo de la EEAFBM (Tabla 1). Esas especies pertenecen a 10 órdenes y 20 familias, donde el orden más representado fue Passeriformes con 11 familias, 36 especies y 586 individuos. A nivel de familia, la más representada fue Parulidae con 8 especies, seguida por Icteridae, Thraupidae y Vireonidae con 5 especies y Columbidae con 4 especies. Otras familias representaron por 1 a 3 especies. En cuanto a individuos por familia, de Thraupidae se observaron 243 individuos, seguidos de Columbidae con 205, Icteridae con 142, Cuculidae con 102 y Turdidae con 59, mientras que el resto de las familias observadas representaron menos de 50 individuos durante el periodo de estudio.

Las especies *Volatina jacarina* y *Crotophaga sulcirostris* fueron las más abundantes en la mayoría de los cultivos, con un total de 182 y 99 individuos registrados (18,8% y 10,2%), respectivamente. Las especies que le siguen con mayor abundancia fueron *Dives dives* (9,8%), *Zenaida asiatica* (7,9%), *Turdus grayi* (6,1%) *Columbina inca* (6%), *Patagioenas flavirostris* (5,9%), *Colinus cristatus* (5,1%) y *Quiscalus mexicanus* (4,1%), que en conjunto representan el 74% de los avistamientos.

Tabla 1. Lista de especies de aves registradas en los campos de cultivo de la EEAFCM y su abundancia.

Orden	Familia	Nombre científico	Nombres comunes	Individuos observados
Passeriformes	Thraupidae	<i>Volatinia jacarina</i>	Semillerito negro azulado, brea, pius, piusillo negro, saltapalito	182
Cuculiformes	Cuculidae	<i>Crotophaga sulcirostris</i>	Garrapatero piquiestriado, tijo, tinco, zopilotillo	99
Passeriformes	Icteridae	<i>Dives dives</i>	Tordo cantor	95
Columbiformes	Columbidae	<i>Zenaida asiatica</i>	Paloma aliblanca, arrocera	76
Passeriformes	Turdidae	<i>Turdus grayi</i>	Mirlo pardo, yigüirro	59
Columbiformes	Columbidae	<i>Columbina inca</i>	Tortolita colilarga, San Juan, tórtola	58
Columbiformes	Columbidae	<i>Patagioenas flavirostris</i>	Paloma piquirroja, paloma morada común	57
Galliformes	Odontophoridae	<i>Colinus cristatus</i>	Codorniz crestada, codorniz de monte	49
Passeriformes	Icteridae	<i>Quiscalus mexicanus</i>	Zanate grande, sanate, zanate	40
Passeriformes	Thraupidae	<i>Sporophila moreletti</i>	Espiguero collarejo, setillero collarejo	25
Passeriformes	Tyrannidae	<i>Pitangus sulphuratus</i>	Bienteveo grande, Cristo fue, pecho amarillo	24
Passeriformes	Thraupidae	<i>Thraupis episcopus</i>	Tangara azuleja, viudita, viuda	22
Passeriformes	Troglodytidae	<i>Campylorhynchus rufinucha</i>	Soterrey nuquirrufo, chico piojo, botijón, salta piñuela	21
Passeriformes	Tyrannidae	<i>Tyrannus melancholicus</i>	Tirano tropical, pecho amarillo	18
Columbiformes	Columbidae	<i>Columbina talpacoti</i>	Tortolita rojiza, tortolita, palomita colorada	14
Passeriformes	Thraupidae	<i>Saltator coerulescens</i>	Saltator grisáceo, come puntas, come chayote, sensontle, sinsonte	12
Passeriformes	Parulidae	<i>Setophaga petechia</i>	Reinita amarilla, canarita	12
Passeriformes	Hirundinidae	<i>Stelgidopteryx ruficollis</i>	Golondrina alirrasposa sureña	12
Passeriformes	Passerellidae	<i>Peucaea ruficauda</i>	Sabanero cabecilistado, pájaro chicle, albarda nueva, ratoncillo	11
Piciformes	Picidae	<i>Melanerpes hoffmanni</i>	Carpintero de Hoffmann	7
Psittaciformes	Psittacidae	<i>Psittacara finschi</i>	Perico frentirrojo, cotorra, chucuyo, perico colilarga o de palmera	5
Passeriformes	Icteridae	<i>Molothrus aeneus</i>	Vaquero ojirrojo, pius	5
Passeriformes	Troglodytidae	<i>Troglodytes aedon</i>	Soterrey cucarachero, soterrey, soterré	5
Passeriformes	Vireonidae	<i>Vireo philadelphicus</i>	Vireo amarillento	5
Passeriformes	Vireonidae	<i>Vireo flavifrons</i>	Vireo pechiamarillo	4
Passeriformes	Tyrannidae	<i>Contopus</i> sp.	Pibí	3
Passeriformes	Fringillidae	<i>Euphonia lanirostris</i>	Eufonia piquigruesa, agüío	3

Orden	Familia	Nombre científico	Nombres comunes	Individuos observados
Passeriformes	Cardinalidae	<i>Passerina caerulea</i>	Picogruoso azul, alondra	3
Cuculiformes	Cuculidae	<i>Piaya cayana</i>	Cuco ardilla, bobo chiso, cacao, San Miguel	3
Passeriformes	Vireonidae	<i>Vireo olivaceus</i>	Vireo ojirrojo, chiguisa	3
Accipitriformes	Accipitridae	<i>Buteo nitidus</i>	Gavilán gris rayado, gavilán pollero	2
Falconiformes	Falconidae	<i>Micrastur ruficollis</i>	Halcón de monte barreteado	2
Falconiformes	Falconidae	<i>Milvago chimachima</i>	Caracara cabecigualdo	2
Passeriformes	Parulidae	<i>Leiothlypis peregrina</i>	Reinita verdilla, cazadorcita	2
Passeriformes	Thraupidae	<i>Sporophila funerea</i>	Semillero picogruoso	2
Passeriformes	Parulidae	<i>Parkesia noveboracensis</i>	Reinita acuática norteña, menea cola, tordo de agua	2
Passeriformes	Cardinalidae	<i>Passerina ciris</i>	Azulillo sietecolores, arcoiris, siete colores	2
Passeriformes	Parulidae	<i>Protonotaria citrea</i>	Reinita cabecidorada	2
Passeriformes	Parulidae	<i>Setophaga pinus</i>	Reinita de pinos	2
Passeriformes	Parulidae	<i>Setophaga striata</i>	Reinita rayada	2
Apodiformes	Trochilidae	<i>Amazilia tzacatl</i>	Amazilia rabirrufa, gorrión	1
Psittaciformes	Psittacidae	<i>Brotogeris jugularis</i>	Periquito barbinaranja, perico, zapoyolito, chimbolito, catano	1
Accipitriformes	Accipitridae	<i>Buteo plagiatus</i>	Águila solitaria	1
Falconiformes	Falconidae	<i>Caracara plancus</i>	Caracara cargahuesos, cargahuesos, querque, quebrantahuesos	1
Passeriformes	Parulidae	<i>Cardellina pusilla</i>	Reinita gorrinegra, curruquita	1
Piciformes	Picidae	<i>Dryocopus lineatus</i>	Carpintero lineado	1
Passeriformes	Fringillidae	<i>Euphonia hirundinacea</i>	Eufonia gorgiamarilla, agüío, caciquita	1
Passeriformes	Parulidae	<i>Helmitheros vermivorum</i>	Reinita gusanera	1
Passeriformes	Vireonidae	<i>Pachysylvia decurtatus</i>	Verdillo menudo	1
Passeriformes	Icteridae	<i>Icterus galbula</i>	Bolsero norteño, cacique veranero, cación, naranjero	1
Coraciiformes	Momotidae	<i>Momotus lessonii</i>	Momoto coroniazul, pájaro bobo, bobo azul	1
Passeriformes	Cardinalidae	<i>Piranga rubra</i>	Tangara veranera, cardenal veranero, pan de achote, sangre toro	1
Passeriformes	Icteridae	<i>Psarocolius montezuma</i>	Oropéndola de Moctezuma, oropéndola	1
Accipitriformes	Accipitridae	<i>Rupornis magnirostris</i>	Gavilán chapulinero, pata podrida	1
Passeriformes	Vireonidae	<i>Vireo carmioli</i>	Vireo aliamarillo	1

En su mayoría, se registraron individuos perchados o alimentándose de forraje del suelo o entre la vegetación herbácea ubicada en los linderos de las áreas de cultivo. Del total de especies observadas en los campos de cultivo de la EEAFBM, se contabilizaron 12 especies que provocaron algún tipo de daño a la producción. Estos daños se registraron en los cultivos de frijol

(*Phaseolus vulgaris*), tomate (*Solanum lycopersicum*), papaya (*Carica papaya*), maíz (*Zea mays*), mango (*Mangifera indica*), pepino (*Cucumis sativus*) y melón (*Cucumis melo*) (Tabla 2). Los cultivos de soya, sandía, piña, palma aceitera, malanga, chile picante, chile dulce, camote, berenjena, mucuma, ayote, jatropha y acerola no fueron afectados por aves.

Tabla 2. Lista de especies de aves registradas que provocaron daños en cultivos de la EEAFBM.

Especie	Individuos	Cultivo dañado
<i>Patagioenas flavirostris</i>	46	Frijol (40) y maíz (6)
<i>Turdus grayi</i>	26	Tomate (16) y papaya (10)
<i>Zenaida asiatica</i>	9	Maíz
<i>Colinus cristatus</i>	7	Frijol
<i>Psittacara finschi</i>	5	Mango
<i>Quiscalus mexicanus</i>	5	Tomate
<i>Dives dives</i>	4	Maíz (3) y frijol (1)
<i>Thraupis episcopus</i>	3	Papaya
<i>Melanerpes hoffmannii</i>	1	Papaya
<i>Saltator coerulescens</i>	1	Tomate
<i>Vireo flavifrons</i>	1	Pepino
<i>Vireo philadelphicus</i>	1	Melón

Durante el periodo de estudio, la especie que se registró en mayor actividad que provocara daños fue *Patagioenas flavirostris* con un total de 46 individuos, en los cultivos de frijol y maíz. La segunda especie más abundante fue *Turdus grayi*, con el registro de 26 individuos observados alimentándose de los cultivos de tomate y papaya. Los daños se debieron al consumo de frutos, tanto en estado maduro, como próximos a la maduración. También se observaron especies migratorias, como *Vireo flavifrons* y *Vireo philadelphicus*, los cuales se alimentaron de los cultivos de pepino y melón, respectivamente.

En el cultivo de frijol los daños consistieron principalmente en consumo de semillas expuestas en el suelo durante la etapa de siembra (35) y de flores (13). En segundo lugar,

estuvo el cultivo de tomate con 22 individuos, cuyos daños se dieron principalmente por el consumo de frutos, y en un caso en los brotes durante la etapa de crecimiento de la plántula. El siguiente cultivo fue el maíz con 18 individuos con daños y deterioro de la mazorca y el consumo de granos tiernos. En el cultivo de papaya y de mango, los daños se registraron por consumo de los frutos en etapa de maduración, mientras que en el melón, ocurrió en los brotes y en pepino en el fruto.

Otro tipo de daño observado fue en el sistema de riego por goteo, provocado por *Quiscalus mexicanus*. Este daño consistió en el picoteo y apertura de agujeros en las mangueras empleadas para el transporte de agua, con el objetivo de acceder a dicho recurso. Este tipo de daño

se observó en 2 ocasiones durante febrero, que corresponde a la época seca en el sitio de estudio.

En cuanto a la diversidad de especies de aves por cultivo, se determinó que el cultivo más visitado fue el de mango, donde se observó la

presencia de 29 especies de aves. A este cultivo le siguieron en orden de importancia, los cultivos de acerola (*Malpighia emarginata*), frijol y maíz, con la presencia de 20, 18 y 16 especies, respectivamente (Figura 1).

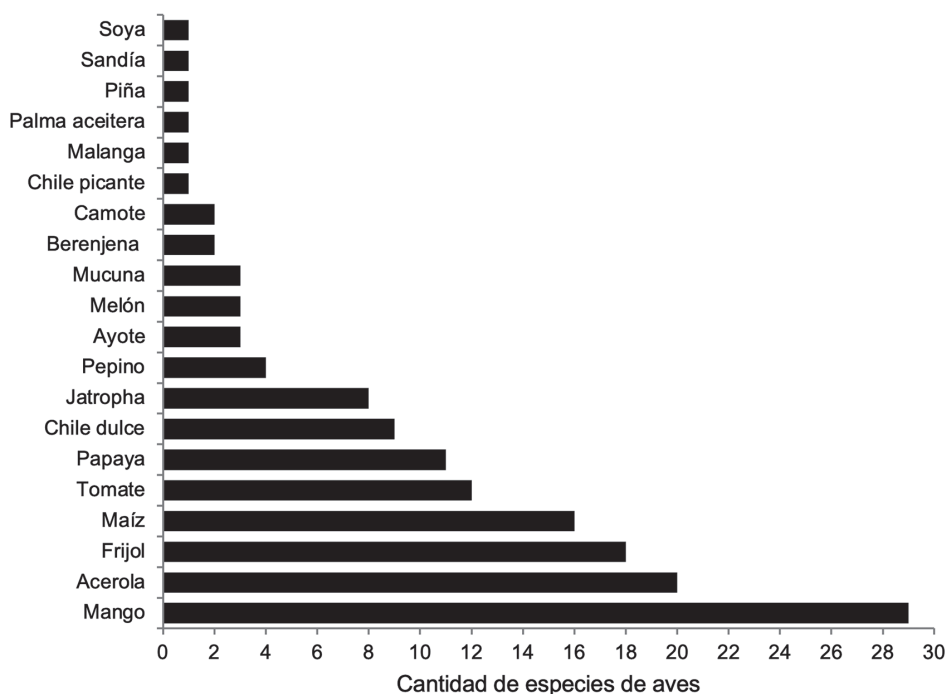


Figura 1. Cantidad de especies de aves registradas en los tipos de cultivo evaluado de la EEAFBM.

DISCUSIÓN

El registro de 55 especies de aves en las áreas de producción agrícola de la EEAFBM, correspondió a un 6% de especies de aves del país (Garrigues *et al.* 2020). La presencia de estas especies sugiere que el sitio ofrece condiciones para el establecimiento de especies que se adaptan a estos ecosistemas. La riqueza y abundancia de aves presentes en áreas agrícolas están asociadas comúnmente con la complejidad estructural y la estratificación de la vegetación (Heikkinen *et al.* 2004, Nájera y Simonetti 2010), ya que la complejidad estructural de la

vegetación incide en el número y diversidad de nichos, que condicionan la abundancia local de gremios o especies que utilicen recursos similares (De la Montaña *et al.* 2006). Esto explica la presencia de especies de aves registrada en la EEAFBM, dada la coexistencia de diferentes cultivos con estructuras diferentes a lo largo del año. Esta diversidad vegetal ofrece una variedad de recursos para la avifauna, que le permite suplir las necesidades de alimentación y refugio a especies con requerimientos diferentes. Adicionalmente, la rotación de cultivos, como ocurre en el sitio, es otro factor que permite

la disponibilidad constante de recursos, lo que ayuda a garantizar la reproducción y presencia de las especies (Ayllón *et al.* 2010).

De las 55 especies observadas, se han reportado al menos 8 gremios alimenticios, donde el consumo de invertebrados fue el más frecuente y utilizado por 42 especies, seguido por el consumo de frutos por 29 especies; semillas y granos consumidos por 18, vertebrados por 13 y néctar por 9 especies. Otros componentes menos frecuentes fueron hojas, flores y carroña (Stiles y Skutch 2007). De 9 especies observadas en este estudio, se ha reportado que consumen de forma exclusiva o predominantemente invertebrados (larvas y adultos de insectos y arañas), 2 son exclusivamente granívoras (semillas y granos) y 2 frugívoras, así como una nectarívora y una carnívora (vertebrados pequeños). Las demás especies incluyeron entre 2 y 8 componentes en su dieta, y con mayor frecuencia, la combinación de “frutos, semillas e invertebrados”, así como “invertebrados y vertebrados”, ambos para 5 especies de aves. Las combinaciones de “frutos e invertebrados”, la de “frutos, vertebrados e invertebrados”, así como la de “invertebrados y semillas” han sido reportados para 3 especies en cada caso (Stiles y Skutch 2007).

En cuanto el impacto a cultivos, de las 55 especies observadas en este estudio, 12 provocaron algún tipo de daño, lo que representa al 22% de las especies de aves vistas. A su vez, 11 del total de especies observadas habían sido reportadas como dañinas para los siguientes cultivos: *B. jugularis* (maíz), *C. cristatus* (frijol y maíz), *C. talpacoti* (sorgo y arroz), *D. dives* (maíz), *I. galbula* (tomate y cítricos), *M. aeneus* (tomate, sorgo, maíz y arroz), *P. flavirostris* (maíz y sorgo), *P. finschi* (maíz y sorgo), *Q. mexicanus* (maíz, arroz, sorgo y melón), *S. morelleti* (sorgo y arroz) y *Z. asiatica* (sorgo) (De Grazio 1984, Elías y Valencia 1984, Arnold 1991, Guido 1992, Del Villar-González 2000, Stiles y Skutch 2007). Algunos de estos reportes coinciden con los observados en este estudio, tales como: *C. cristatus* (frijol), *D. dives* (maíz) y *P. flavirostris* (frijol), mientras para *P. finschi* y *Q. mexicanus*

se observaron daños en cultivos diferentes a los reportados previamente.

Al considerar los hábitos alimenticios de las especies observadas en este estudio y el reporte de generación de daños en algún estudio previo (Del Villar-González 2000, Elías y Valencia 1984, De Grazio y Besser 1970, Stiles Skutch 2007), 26 especies (47%) podrían eventualmente ocasionar algún daño. A su vez, es importante considerar que, si bien muchas especies fueron registradas perchadas sobre los cultivos o en el suelo alrededor de estos, no deben ser consideradas como dañinas, ya que su presencia podría deberse a que buscaban invertebrados o pequeños vertebrados presentes en los cultivos. En este sentido, puede asumirse que cumplían una función de controladores naturales de posibles plagas, como sería el caso de las rapaces *Micrastur ruficollis*, *Rupornis magnirostris* y *Caracara plancus*, las cuales visitan los campos de cultivo en busca de pequeños vertebrados como roedores, reptiles e incluso aves.

La especie *P. flavirostris* con bandadas de hasta 45 individuos fue la que registró una mayor cantidad de individuos que provocan daños, su comportamiento se ha documentado en cultivos de cereales, frutas y huertos, en los cuales se ha observado que consumen semillas, frutos, flores y brotes (Keppie y Braun 2000). Un aspecto importante a resaltar para este grupo de aves, es que el tamaño de la bandada funge como un factor determinante en el nivel de daño generado. El dato concuerda con lo registrado en la presente investigación, donde el mayor grupo de paloma morada consumió semilla de frijol, así como de maíz, por lo que ha sido considerada como una plaga local para el cultivo de maíz y sorgo (Stiles y Skutch 2007). La otra especie con más registros de individuos alimentándose de cultivos fue simultáneamente, *T. grayi*, con 26 individuos en una misma área, su comportamiento también fue reportado por Cortés-Suárez (2016), quien indicó que la alimentación de la especie representa un consumo importante de frutos, los cuales obtenían en zonas de cultivos, cafetales y huertos. La especie *V. jacarina*,

si bien se alimenta principalmente de semillas de gramíneas e insectos (Stiles y Skutch 2007), también se ha referido por la participación en bandadas de aves pequeñas que pueden llegar a generar importantes daños en cultivos de cereales, como el sorgo (De Grazio y Besser 1970); sin embargo, en este estudio no se observó que ocasionara daños a algún cultivo.

En cuanto al perjuicio por cultivo, el frijol fue en el que se registró más afectación (48 individuos), seguido por el tomate (22 individuos) y maíz (18 individuos). Adicionalmente, el comportamiento gregario de las especies de aves registradas, promueven daños, como lo hace *P. flavirostris*, *Z. asiatica*, que se caracterizan por formar bandadas para alimentarse (Gibbs *et al.* 2010).

Se ha identificado que factores como el tipo de cultivo y superficie de estos, influyen de manera importante sobre la abundancia y riqueza de aves en ambientes agrícolas (Taft y Haig 2006). Según los resultados obtenidos en la presente investigación, las áreas de cultivo conformada por árboles y arbustos, como el mango y la acerola, son las que presentaron una mayor presencia de aves. Este resultado podría estar influenciado por su característica de ser cultivos perennes y de gran cobertura, lo que lo hace además un área estable y segura para el refugio, alimentación y reproducción de las especies, así como la oportunidad de anidar. Adicionalmente, ofrecen una fuente importante de alimento para las aves, ya sea durante las etapas de floración y fructificación, o por la presencia permanente de insectos existentes en la madera y corteza de los árboles.

Con base en la información existente sobre aves en agroecosistemas en Costa Rica y la obtenida en este estudio, se recomienda realizar otros que permitan evaluar el nivel de daño que ocasionan las especies con mayor presencia de individuos como la paloma morada (*P. flavirostris*) en los cultivos de frijol y maíz, el yigüirro (*T. grayi*) en tomate y papaya, la paloma aliblanca (*Z. asiatica*) en maíz, lo cual permitirá determinar si se requiere algún tipo de manejo.

CONCLUSIONES

Con las observaciones realizadas a la avifauna de la EEAFCB se concluye que en el sitio estuvieron presentes en áreas de producción agrícola al menos 55 especies, pertenecientes a 10 órdenes y 20 familias, cantidad de especies que representan el 6% de especies de aves presentes en el país.

De las especies de aves presentes, 12 provocaron daños a los cultivos, en particular la paloma morada (*P. flavirostris*) de la que se observaron más individuos en los cultivos de frijol y maíz. La otra especie con más individuos fue el yigüirro (*T. grayi*) que expuso daños en frutos de tomate y papaya, seguida de la paloma aliblanca (*Z. asiatica*) en el cultivo de maíz.

De los 20 cultivos incluidos en este estudio, 7 fueron afectados por aves, mientras que otros 13 no fueron afectados, aunque en todos fueron registradas aves.

LITERATURA CITADA

- Agüero, DA; Poleo J; Duno G. 2005. Especies de aves plaga. In Plagas vertebradas. Fundación Nacional del Arroz: Venezuela. s. p.
- Arnold, KA. 1991. *Quiscalus mexicanus* (zanate, Zanzates, sanate, Great-tailed Grackle). In Janzen, D (ed.). Historia Natural de Costa Rica. San José, Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica. 822 p.
- Ayllón, D; *et al.* 2010. Sostenibilidad en la gestión de los sistemas agrarios y forestales: beneficios para la biodiversidad. Junta de Andalucía. Sevilla, España, Signatura Ediciones de Andalucía. 194 p.
- Bucher, E. 1984. Las aves como plaga en la Argentina. Publicación del Centro de Zoología Aplicada 9:1- 20. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Córdoba, Argentina, Universidad de Córdoba. 17 p.
- Bucher, E. 1998. Criterios básicos para el manejo integrado de aves plaga. In Rodríguez, EN; Zaccagnini, ME (eds.). Manual de capacitación sobre manejo integrado de aves perjudiciales a la agricultura. FAO. s. p.
- Cortés-Suárez, J. 2016. Variación del comportamiento de forrajeo del yigüirro (*Turdus grayi*, Turdidae) en hábitats urbanos, Costa Rica. Zedonia 20(1):23-28.

- Cuta-Pineda, JA; Barbosa-Camargo, SF; Ramos-Montaño, C. 2020. Polinización por aves *In* Ramos-Montaño, C; Barbosa, SF; Cuenca-Gallo, N; Cuta-Pineda, JA; Espinosa-Blanco, A; Higuera-Blanco, A; Igua-Muñoz, JS; Pulido-Herrera, K; Ruiz-Barajas, CA; Vega-Cabra, SL (eds.). Aves asociadas a cafetales en el Valle de Tenza: Panorama y recomendaciones para asegurar la prestación de servicios ecosistémicos brindados por las aves. Tunja, Colombia, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Editorial UPTC. p. 27-50.
- De Grazio, JW. 1984. Vertebrate pest problems of Ecuador, The Galápagos Islands, and Costa Rica. Trip Report. Colorado, USA, Denver Wildlife Research Center: Denver. s. p.
- De Grazio, J; Besser, J. 1970. Bird damage problems in Latin America. *In* Dana RH (ed.). Proceedings of the 4th Vertebrate Pest Conference. El Rancho Hotel West Sacramento, California, March 3, 4 and 5. California Vertebrate Pest Committee. California: USA. p. 162-167.
- De La Montaña, E; Rey-Benayas, JM; Carrascal, LM. 2006. Response of bird communities to silvicultural thinning of Mediterranean maquis. *Journal of Applied Ecology* 43:651-659.
- Del Villar-González, D. 2000. Principales vertebrados plaga en México: situación actual y alternativas para su manejo. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 6(1):41-54.
- Dolbeer, R; Holler, N; Hawthorne, D. 1994. Identification and control of wildlife damage. *In* Bookhout, TA (ed.). Research and Management Techniques for Wildlife and Habitats. Bethesda, Maryland, The Wildlife Society. 740 p.
- Dyer, M; Ward, P. 1977. Management of pest situations. *In* Pinowski, J; Kendeigh, S. (eds.). Granivorous birds in Ecosystems. International Biological Programme: United Kindom, Cambridge University Press. 431 p.
- Elías, D; Valencia, D. 1984. La agricultura latinoamericana y los vertebrados plaga. *Interciencia* 9(4):223-229.
- Garrigues, R; Camacho-Varela, P; Montoya, M; O'Donnell, P; Zook, J. 2020. Lista oficial de aves de Costa Rica 2019-2020 (en línea). Comité de Especies raras y Registro Ornitológicos (Comité Científico). Asociación Ornitológica de Costa Rica. Consultado 13 may. 2021. Disponible en <https://listaoficialavesdecostarica.wordpress.com/lista-oficial/>
- Gibbs, D; Barnes, E; Cox, J. 2010. Pigeons and doves: A guide to the pigeons and doves of the World. Soho Square, London, A&C Black Publisher Ltd. 616 p.
- González, J. 2003. Análisis preliminar de los daños causados por las aves silvestres a la agricultura en la Amazonia oriental del Perú. *In* Polanco-Ochoa, R (ed.). Manejo de Fauna Silvestre en la Amazonia y Latinoamérica. Bogotá, Colombia, CITES, Fundación Natura. 446 p.
- Guido, MY. 1992. Caracterización de daño de pericos y loras (Aves: Psittacidae) en el cultivo de maíz (*Zea mays* L.) y evaluación de métodos para su combate en Cóbano, Puntarenas, Costa Rica. Tesis M.Sc. Heredia, Costa Rica, Universidad Nacional Autónoma. 107 p.
- Guix, JC. 2021. Interacciones mutualistas entre animales y plantas. I.Introducción general. Publicacions del Centre de Recursos de Biodiversitat Animal. Barcelona, España, Universitat de Barcelona. Vol. 7. 45 p.
- Heikkinen, RK; Luoto, M; Virkkala, R; Rainio, K. 2004. Effects of habitat cover, landscape structure and spatial variables on the abundance of birds in an agricultural-forest mosaic. *Journal of Applied Ecology* 41:824-835.
- Igua-Muñoz, JS; Vega-Cabra, SL. Ramos-Montaño, C. 2020. Control de plagas por aves insectívoras *In* Ramos-Montaño, C; Barbosa, SF; Cuenca-Gallo, N; Cuta-Pineda, JA; Espinosa-Blanco, A; Higuera-Blanco, A; Igua-Muñoz, JS; Pulido-Herrera, K; RuizBarajas, CA; Vega-Cabra, SL. (eds.). Aves asociadas a cafetales en el Valle de Tenza: Panorama y recomendaciones para asegurar la prestación de servicios ecosistémicos brindados por las aves. Tunja, Colombia, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Editorial UPTC. p. 79-102.
- Instituto Meteorológico Nacional (IMN). s. f. Datos meteorológicos de la Estación Fabio Baudrit. Instituto Meteorológico Nacional, San José, Costa Rica. s. p.
- Keppie, D; Braun, C. 2000. Band tailed pigeon - Patagioenas fasciata. *In* Poole, A; Stettenheim, P; Gill, F (eds.). Birds of North America. N°. 530. The American Ornithologists' Union, The Academy of Natural Sciences. Washington: USA. p. 1-28.
- Martínez, A; DeClerck, F; Florian, E; Estrada, N. 2008. Manual de técnicas para la identificación de aves silvestres. Costa Rica, Programa Monitoreo de Aves - CATIE. 43 p.
- Monge, J. 2013. Lista actualizada de aves dañinas en Costa Rica (2012). Cuadernos de Investigación UNED 5(1):111-120.
- Nájera, A; Simonetti, J. 2010. Enhancing avifauna in commercial plantations. *Conservation Biology* 24(1):319-324.
- Ralph, C; Geupel, G; Pyle, P; Martin, T; DeSante, D; Milá, B. 1996. Manual de métodos de campo para el monitoreo de aves terrestres. General Technical Report PSW-GTR-159. Albany, California, EEUU. 51 p.
- Rodríguez, E; Zaccagnini, M. 1998. Manual de Capacitación sobre Manejo Integrado de Aves Perjudiciales a la Agricultura. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

- (FAO). Proyecto “Control Integrado de Aves Plaga”. Uruguay-Argentina. 171 p.
- Romero-Banderas, K; Naranjo, EJ; Morales, HH; Nigh, RB. 2006. Daños causados por vertebrados silvestres al cultivo de maíz en la Selva Lacandona, Chiapas, México. *Interciencia* 31(4):276-283.
- Sedano, R. 2003. Los humedales y la ocupación de aves en los cultivos de arroz. *Revista Foro Arrocero Latinoamericano* (Colombia) 9(1):25-28.
- Stiles, G; Skutch, A. 2007. Guía de Aves de Costa Rica. 4ª ed. Santo Domingo de Heredia, Costa Rica, INBio. 680 p.
- Taft, O; Haig, S. 2006. Landscape context mediates influence of local food abundance on wetland use by wintering shorebirds in an agricultural valley. *Biological Conservation* 128(3):298-307.
- Zaccagnini, ME; Canavelli, S. 1998. El manejo integrado de plagas (MIP): su aplicación a la resolución de problemas con aves perjudiciales a la agricultura. *In* Rodríguez, EN; Zaccagnini, ME (eds.). Manual de capacitación sobre manejo integrado de aves perjudiciales a la agricultura. FAO. s. p.



Agronomía Costarricense. Universidad de Costa Rica. Se encuentra licenciada con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr

Nota técnica

ANÁLISIS DEL COMPORTAMIENTO DE TRES HÍBRIDOS DE PIMIENTO BAJO DIFERENTES SISTEMAS DE RIEGO

Bertha Holguín-Burgos^{1/*}, Allan Alvarado-Aguayo²,
Danilo Delgado-Delgado³, Mónica Munzón-Quintana⁴

Palabras clave: Aprovechamiento del agua; eficiencia; evaporación; utilidad.

Keywords: Water use; efficiency; evaporation; utility.

Recibido: 15/10/2021

Aceptado: 10/01/2022

RESUMEN

Introducción. Se buscó optimizar los sistemas de riego para el consumo de agua en el pimiento (*Capsicum annuum* L.), cultivo importante en la industria alimenticia, cuyos híbridos superan la productividad de las variedades comerciales. A diferencia del sistema de riego por goteo presurizado, que aplica pequeñas cantidades en forma controlada a la zona radicular, el método Kondenskompressor, o riego solar, emula el ciclo de evaporación del agua formando un ambiente cerrado con botellas de Polietileno Tereftalato (PET) de 6 lt que cubren el área radicular y la humedad resultante de la evaporación se condensa en las paredes interiores de botellas PET de 500 cc que regresan al suelo. **Objetivo.** Realizar una evaluación financiera de la productividad de 3 híbridos de pimiento denominados Nathalie, Martha R y Zapata, mediante la comparación de los sistemas

ABSTRACT

Behavior analysis of three pepper hybrids under 2 different irrigation systems.

Introduction. The aim is to optimize irrigation systems for water consumption in bell pepper (*Capsicum annuum* L.), an important crop in the food industry, whose hybrids exceed the productivity of commercial varieties. Unlike the pressurized drip irrigation system, which applies small quantities in a controlled manner to the root zone, the Kondenskompressor method, or solar irrigation, emulates the water evaporation cycle by forming a closed environment with 6 lt Polyethylene Terephthalate (PET) bottles that cover the root area, and the moisture resulting from evaporation condenses on the inner walls of 500 cc PET bottles and returns to the soil. **Objective.** To perform an financial evaluation of the productivity of 3 bell pepper hybrids called Nathalie, Martha R and Zapata, by comparing

* Autora para correspondencia. Correo electrónico: bholguin@uagraria.edu.ec

1 Universidad Agraria del Ecuador – UAE, El Triunfo, Guayas, Ecuador.

 0000-0002-0082-1066.

2 Universidad Agraria del Ecuador – UAE, El Triunfo, Guayas, Ecuador.

 0000-0003-2245-7661.

3 Universidad Agraria del Ecuador – UAE, El Triunfo, Guayas, Ecuador.

 0000-0001-9915-2730.

4 Universidad Agraria del Ecuador – UAE, El Triunfo, Guayas, Ecuador.

 0000-0002-4036-5632.

de goteo presurizado y Kondenskompressor. **Materiales y métodos.** Se utilizaron tratamientos en parcelas divididas con arreglo factorial de A x B con 6 tratamientos y 4 repeticiones, en el cantón El Triunfo, Guayas, Ecuador. Se usaron diferentes tratamientos para evaluar la eficiencia del riego por goteo solar y riego presurizado, con base en las variables, números de frutos por planta, dimensión del fruto, productividad, peso del fruto, costos totales, costos por trasplante y relación beneficio-coste. **Resultados.** Los mejores resultados financieros fueron para el tratamiento 6, con la aplicación del híbrido Zapata y riego presurizado, con una producción de 26 200 kg.ha⁻¹, un beneficio neto de \$5012, y una relación beneficio costo de 0,98, el consumo de agua para la producción fue de 1,29 m³.ha⁻¹. **Conclusiones.** Aunque el sistema de riego presurizado optimiza el consumo de agua, su inconveniente fue la importante inversión monetaria. Por ello el riego solar o Kondenskompressor es más aplicable para pequeños y medianos agricultores con bajos recursos monetarios, ya que implica menos costos y generación de beneficios por montos aproximados al 25% superiores a sus costos totales.

pressurized drip and Kondenskompressor systems. **Materials and methods.** Split-plot treatments with A x B factorial arrangement with 6 treatments and 4 replications were used in El Triunfo canton, Guayas, Ecuador. Different treatments were used to evaluate the efficiency of solar drip irrigation and pressurized irrigation, based on the variables, number of fruits per plant, fruit size, productivity, fruit weight, total costs, transplanting costs and benefit-cost ratio. **Results.** The best financial results were for treatment 6, with the application of the Zapata hybrid and pressurized irrigation, with a production of 26 200 kg.ha⁻¹, a net benefit of \$5012, and a benefit-cost ratio of 0.98, water consumption for production was 1.29 m³.ha⁻¹. **Conclusions.** Although the pressurized irrigation system optimizes water consumption, its drawback was the significant monetary investment. Therefore, solar irrigation or Kondenskompressor is more applicable for small and medium farmers with low economic levels, since it implies lower costs and the generation of benefits 25% higher than their total costs.

INTRODUCCIÓN

El pimiento es una de las principales hortalizas de consumo en el mundo, su origen es de los países de América del Sur (Frutas Hortalizas s. f.), aunque con el paso de los años su producción se ha extendido a otras regiones del mundo, con calidad y mejoras en sus métodos de producción (Macías 2010).

La hortaliza más significativa económicamente es el tomate, seguida del pimiento (Chuitarco *et al.* 2021), cuya producción mundial en el 2019 alcanzó 36,9 millones de toneladas, con China como el mayor productor, seguida por México y Turquía (Orús 2020). En el continente

europeo, España lidera el rendimiento de este cultivo; en América destaca México, quien distribuye hacia mercados de Estados Unidos y Canadá (Díaz 2019); Alemania es el mayor importador y la India destina la mayor cantidad de superficie de suelo para su producción. En América Latina, Argentina destaca en la producción de esta hortaliza (Vaca y Basantes 2021).

Ecuador posee características en el suelo adecuadas para este cultivo, destina parte de sus suelos a la producción de esa hortaliza. En el 2019, el área de uso para los cultivos transitorios y barbecho, dentro de los cuales se encuentra clasificado el pimiento fue de 822 516 hectáreas (INEC 2020). Ese país en los últimos años ha

incrementado la producción y consumo de las hortalizas, entre ellas el pimiento, debido a su alta composición de nutrientes y vitaminas lo que ha permitido que tanto pequeños como grandes productores lo incluyan en sus procesos productivos (Mantilla 2018).

Algunas provincias de la costa y sierra ecuatoriana se dedican a la producción agrícola de este vegetal, en la región Litoral están Guayas, Santa Elena, Manabí y El Oro, y en la región Interandina, Imbabura, Chimborazo y Loja (Marcalla 2020); sin embargo, una de las limitantes es el alto costo de producción que minimizan las utilidades de los productores, así como los niveles de precios en los mercados de consumo (Burgos 2020). La técnica utilizada para la cosecha de pimientos es manual, una vez que el producto esté dispuesto para la siega; que corresponde al periodo entre marzo a mayo (MAGAP s. f.).

La producción de pimiento verde está dirigida al consumo interno, en su característica de pimiento fresco, aunque también es destinado para exportación en conserva, en pequeñas cantidades (Guato y Dobronski 2017).

Uno de los mercados donde se da la mayor comercialización de pimiento, es las ferias de Guayaquil, pues se ofertan diferentes tipos de híbridos procedente de la región sierra y de la costa en costales de 20 y 40 kilos, a precios de 0,60 y 0,66 dólares respectivamente (Lindao y Ayerve 2018).

Sistema de producción bajo riego. El sistema de riego por goteo presurizado es el método de aplicar agua en pequeñas cantidades en forma controlada a la zona radicular de las plantas. Consiste en una serie de cintillas con emisores integrados que se colocan sobre las camas, en donde se encuentran las plantas principalmente de hortalizas, debido al alto costo. Normalmente se obtiene mayor rendimiento y es más eficiente que los sistemas de riego por aspersión. Si se combina la fertirrigación y el uso de acolchados con un manejo adecuado, el incremento del rendimiento, calidad de producto y precocidad se mejoran en forma drástica (Apaza y López 2016).

Por su parte, el método Kondenskompresor utiliza la energía solar para utilizar el agua que imita su ciclo natural, por ello se le conoce como riego solar. Para esta técnica se emplean botellas plásticas transparentes. Con este método se pueden regar los cultivos solamente con la cantidad de agua necesaria y que evita así la evaporación excesiva, lo cual permite reducir significativamente la cantidad de riego. Su uso representa una ventaja en zonas con acceso limitado a fuentes de agua. Resultante de la radiación solar, la humedad de la evaporación se condensa en las paredes interiores de la botella y cae en forma de gotas que regresan al suelo (Cordero 2021).

El aporte de agua es un factor determinante para el desarrollo y producción, por lo tanto, favorece el desarrollo del pimiento en todas sus fases: germinación, desarrollo vegetativo, maduración y cosecha, por lo que las necesidades hídricas se hacen más apremiantes en las etapas previas a la floración. Si el pimiento presenta deficiencia de agua se detiene su desarrollo y afecta la calidad del fruto, que además ocasiona rajaduras o pudrición apical. Al favorecer el ahorro mediante el riego solar, se reducen las posibilidades de afecciones por enfermedades radiculares asociadas a hongos como *Phytophthora* y *Fusarium* (Gómez *et al.* 2010).

El objetivo de la investigación consistió en realizar una evaluación financiera de la productividad de 3 híbridos de pimiento, bajo 2 sistemas de riego diferentes, en el cantón El Triunfo, provincia del Guayas, en una unidad experimental que pertenece a la Universidad Agraria del Ecuador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Diseño experimental. Se aplicó un diseño experimental de parcelas divididas con arreglo factorial de A x B con 6 tratamientos y 4 repeticiones, a partir de la metodología de Gutiérrez (2019), para obtener un total de 24 parcelas experimentales. Los tratamientos fueron de la siguiente manera: T1: Híbrido Nathalie x riego goteo solar, T2: Híbrido Martha R x riego goteo

solar, y el T3: Híbrido Zapata x riego goteo solar, T4: Híbrido Nathalie x riego goteo presurizado, T5: Híbrido Martha R x riego goteo presurizado, T6: Híbrido Zapata x riego goteo presurizado (Quezada *et al.* 2019).

Necesidades hídricas del cultivo. El cálculo de la evapotranspiración de referencia (ET_o) se realizó con el programa gratuito en línea CROPWAT 8.0 de la FAO; se recopiló información climatológica de la Estación meteorológica Ingenio Agro Azúcar periodo 2000-2018, donde abril registró la ET_o más alta 3,18 mm.día⁻¹, valor considerado para los cálculos posteriores al

diseño agronómico. Es lo que se denomina diseño agronómico de riego, que consiste en calcular los turnos, caudales y tiempos de riego determinados por el tipo de suelo, clima y cultivo.

Es importante mencionar que en el cultivo de pimiento, el dato del coeficiente de cultivo (K_c) se encuentra en primera etapa y es 0,35; la segunda etapa 0,70; la tercera etapa 1,05; y en la última etapa 0,90, valores que se consideraron de la tabla 12 del Manual 56 de la FAO. Se considera que la etapa de mayor demanda es la etapa III donde hay una necesidad hídrica de 3,3 mm.día⁻¹ como se observa en la Tabla 1.

Tabla 1. Cálculo de la ET_c del cultivo de pimiento.

Fecha	Etapas	Duración	Eto media	K_c	ET_c del cultivo mm/día
14/agosto al 8 sept/2019	I	25 días	3,18	0,35	1,11
9 agosto al 13 octubre 2019	II	35 días	3,18	0,70	2,22
14 octubre al 22 nov 2019	III	40 días	3,18	1,05	3,33
23 nov al 12 diciembre 2019	IV	20 días	3,18	0,90	2,86

Para el cálculo de la ET_c se utilizó la siguiente ecuación:

$$ET_c = ET_o * K_c$$

Donde

ET_o = Evapotranspiración de referencia

K_c = Coeficiente del cultivo

Cálculo del diseño agronómico de riego por goteo presurizado. Una vez realizado el cálculo de la ET_o , se procedió realizar el Diseño agronómico del sistema de riego por goteo presurizado con el programa TLALOC v1.0. Se obtuvieron los siguientes resultados: lámina de agua disponible a una profundidad radicular efectiva 11.760 mm/zr, volumen de agua disponible a una profundidad radicular efectiva 117.600 mm/ha/zr, lámina de agua aprovechable a una profundidad efectiva radicular 3528 mm/zr, porcentaje

de área bajo riego 80%, precipitación horaria de riego 10 mm, intervalo de riego = 3 días, ciclo de riego 2 días, lámina de riego ajustada 12,52 mm, lámina Bruta 13,91 mm, dosis Bruta 111,29 mm, horas de riego por turno 1,39, turno de riego por día 8 turnos/día, número de turnos por ciclo 16 turnos/ciclo, superficie bajo riego por turno 0,0032375 ha/turno, dosis de riego bruta por turno 0,360 m³, caudal requerido 0,258 m³/h, volumen bruto por ciclo de riego 5,76 m³/ciclo, caudal específico Q_e 4,98 m³/ha/h, caudal específico Q_e de 4,98 x 0,2777 1,38 l/s.

Con los datos obtenidos, se procedió a la instalación del sistema de riego en el área del proyecto, con una tubería principal PVC E/C 50mm X 0,8 MPa de 74 m de largo y 7 m de ancho, que abastecía directamente a los laterales de riego los cuales tenían una longitud de 6 m c/u, y una distancia de separación de un metro. Se dividió la tubería principal en 3 secciones con su respectiva

válvula, colocando goteros autocompensables con capacidad de 4 lph por cada planta trasplantada a 0,50 metros de distancia. De acuerdo con la demanda hídrica del cultivo, la lámina de riego proporcionada para el sistema por goteo presurizado fue suficiente para cubrir su necesidad.

Establecimiento de riego por goteo solar o método kondenskompressor. Se utilizaron botellas PET de agua con una capacidad de 250 cc; se procedió a realizar un pequeño hoyo cerca de la planta de pimiento, donde se vacía el agua en la botella, aspecto importante para que se pueda

formar una columna de agua y se facilitara el trabajo de instalación del kondenskompressor el cual emula el ciclo de evaporación del agua por medio de las botellas plásticas transparentes que forman un ambiente cerrado en el área radicular donde la humedad resultante de la evaporación se condensa en las paredes interiores de la botella y regresa al suelo. Como cúpula se utilizaron botellas de agua de 6 litros y paja seca alrededor y material vegetativo existente alrededor de la plantación, que al secarse lo sellará para llegar al proceso de evaporación como se observa en las Figuras 1, 2 y 3.



Figura 1. Botella de plástico (PET) utilizada para la prueba por goteo solar.



Figura 2. Colocación de botellas (PET) en el campo.



Figura 3. Hidratación por medio del ciclo de evaporación del agua en botellas con ambiente cerrado que integran el agua al suelo.

En este sistema de riego por goteo solar en la plantación de pimiento se evidenció lo siguiente: la tasa de evaporación en el Tratamiento H1R1 durante todo el ciclo vegetativo 120 días fue 76,56 ml, el tratamiento H2R1 fue de 76,08 ml y el tratamiento H3R1 fue de 74,90 ml, con una evaporación de agua total de 227,51 ml o su equivalente 227,51 cc.

A los 60 días después del trasplante del cultivo de pimiento se realizó una exploración física de manera aleatoria en los diferentes tratamientos y repeticiones del riego por goteo solar para determinar la profundidad del área de humedecimiento que proporcionaba el sistema kondenskompressor en el área del sistema radicular, en donde la mayoría de las muestras estaban humedecidas a profundidad aproximada de 8 y 12 cm.

Variables agronómicas

Número de frutos por planta. Se determinó mediante el conteo aleatorio de 10 plantas, en cada cosecha. Se realizaron 3 cosechas a los 64 días, 85 días y 112 días después del trasplante (Jiménez *et al.* 2018).

Dimensiones del fruto. Las mediciones de longitud y diámetro de los frutos se realizaron a las 10 plantas seleccionadas.

Productividad. Esta variable se analizó con datos de número de frutos y su peso correspondiente en las 3 cosechas, expresados en $\text{kg} \cdot \text{ha}^{-1}$ (Monge 2015).

Peso del fruto. Se realizó con una balanza para las plantas seleccionadas aleatoriamente de cada tratamiento; se pesaron y los resultados se registraron en gramos (Reséndiz *et al.* 2010).

Para la provisión del recurso hídrico se colocó un tanque elevado con una capacidad de 5000 litros, potencia máxima 3600 rpm, a una altura de 15 metros, el mismo que estaba bombeado por una bomba de succión de 3 pulgadas, posteriormente para llegar al punto de distribución del agua, baja por gravedad para ser distribuido al sistema de tuberías.

Relación beneficio-costos. Costos totales, se consideran los costos sin incluir los tratamientos tales como preparación del suelo, siembra manual, control fitosanitario, insumos agroquímicos, control de malezas, glifosato, fertilización edáfica, análisis de suelo, abono, urea, muriato, y otros costos (Velasco y Sánchez 2015).

Además, los costos por trasplante, incluyeron los costos generados en una ha de pimiento por trasplante con riego por goteo solar y riego por goteo presurizado (Bernaola *et al.* 2015).

La relación beneficio-costos, se utilizó, para el análisis financiero de los tratamientos, según la producción total cosechada en kg.ha⁻¹ por año; además se estimaron los ingresos con el precio de venta al término del ensayo de 0,32 USD por kg, mediante la siguiente ecuación matemática (Márquez y Castro 2015):

$$RBC = \frac{INGRESOS\ TOTALES}{COSTOS\ TOTALES} - 1$$

Análisis estadístico. Se desarrolló el análisis de varianza (ANDEVA) y de las fuentes de variación de las diferentes interacciones (A x B) que presentaron significación estadística, se realizaron con la Prueba de Tukey a un nivel de probabilidad del 5%, en los cuales se estudiaron los distintos tratamientos (Olivio 2017).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla 2, la productividad en kg.ha⁻¹ se calculó con el número promedio de frutos, el peso, para la densidad de 0,50 m entre planta y 1 m entre hilera. Se pesaron todos los frutos del área útil y se proyectó a la productividad por ha.

Tabla 2. Cuantificación de variables de los híbridos experimentales con aplicación del sistema de riego por goteo y riego presurizado.

Tratamientos	Diámetro del fruto (cm)	Promedio de frutos (uds)	Peso de frutos (gr)	Productividad (kg.ha ⁻¹)
T1	4,22 b [†]	9,50 b [†]	94,50 c [†]	17980 b [†]
T2	4,38 b	9,75 b	94 c	18520 b
T3	4,70 b	9,75 b	98 bc	19120 b
T4	6,05 a	11,25 ab	111,75 a	25090 a
T5	6,13 a	11,75 a	108,50 ab	25510 a
T6	6,45 a	11,75 a	111,50 a	26200 a

[†]Valores con la misma letra son iguales (p>0,05).

Asimismo, de acuerdo con las medias producidas por los tratamientos, se determinó que la combinación del T6, en la variable diámetro del fruto presentó el mayor valor de 6,45 cm, similar al reportado por Díaz *et al.* (2013) en plantas inoculadas del hongo micorrízico R intradices a plantas de pimiento que alcanzaron el grado > a 6,35 cm. En la variable promedio de frutos, los tratamientos T5 y T6 fueron los más representativos con un promedio de 11,75 unidades inferior al que presentó Reyes *et al.* (2021) con la variedad Magaly en un sistema de regaderas manuales con un promedio de frutos 13,42 unidades. La variable peso de frutos la más significativa fue el

T4 con 111,75 g; resultado inferior al registrado por Sánchez *et al.* (2017) de 130 g. Posiblemente por el efecto que presentó la densidad de la siembra, el rendimiento disminuyó con el aumento del número de la población, ya que Flores *et al.* (2018) reportó pesos de 200 g con fertirriego.

De igual forma, se realizó el cálculo de la productividad que evidenció que el T6 fue el más productivo, ya que alcanzó 26 200 kg.ha⁻¹, superior a lo señalado por Moreno *et al.* (2011) con el híbrido Orión a partir del riego por medio de 3 líneas de cintillas de goteo tamaño 8000 y a los reportados por Alemán *et al.* (2018) de 22 400 kg.ha⁻¹ en la cosecha del híbrido de pimiento

Nathalie a campo abierto en la región Amazónica del Ecuador.

Con las medias adquiridas de los tratamientos se observó que la combinación de híbrido Zapata y riego presurizado presentaron la mejor respuesta productiva en la variable promedio de frutos, con una clara diferencia frente a lo que presenta Quiñonez *et al.* (2020) de un promedio de frutos por planta de 7,36 unidades que, probablemente obedece al uso de fertilización

orgánica como guano de murciélago, humus de lombriz y humivita.

Los costos que se consideraron para la producción de una ha de pimiento por trasplante sin considerar los costos por riego, están considerados en la Tabla 3, que expone valores totales de \$1797,60. Estos resultados fueron inferiores a los obtenidos por Saraguay y Martillo (2021) en la aplicación de tratamientos Tutorado tradicional + calcio de magnesio y Tutorado holandés + calcio y magnesio, con un costo de \$2800.

Tabla 3. Costo fijo de producción de una hectárea de pimiento por trasplante sin considerar los tratamientos.

Descripción	Unidades	Cantidad	Costo unitario \$	Valor total \$
Preparación de suelo	Ha	1	120	120
Siembra manual	Jornal	6	20	120
Control fitosanitario	Jornales	3	20	60
Insumos agroquímicos	Litros	4	23	92
Aplicación	Jornales	2	20	40
				432
Control de malezas				
Manual	Jornales	3	20	60
Glifosato	Litros	2	8	16
Fertilización edáfica	Jornales	3	20	60
Análisis de suelo	Unidad	1	75	75
Abono completo 8-20-20 (50 kg)	Sacos	2	20	40
Urea (45 kg)	Sacos	3	22	66
Muriato	Sacos	3	25	75
Aplicación	Jornales	2	20	40
				432
Otros				
Pirola	Rollo	6	8	48
Tutorado	Jornales	10	20	200
Cañaveral	Estacas	5000	0,08	400
Cosecha	Jornales	10	20	200
				848
Sub total				1712
Administración (5%)				85,6
Total costos fijos				1797,6

Para el análisis de los costos de producción de una hectárea de pimiento con instalación de riego por goteo solar tal como lo presenta la Tabla 4, Gabriel *et al.* (2020) se incurrió en el desembolso de pago de mano de obra y semillas

de híbridos utilizados en el experimento, con un costo de producción mayor para el tratamiento 1, correspondiente al híbrido Nathalie, los cuales fueron inferiores a la productividad que generaron los tratamientos (Mendoza y García 2020).

Tabla 4. Costo de producción de una hectárea de pimiento por trasplante - riego solar.

Descripción	Unidades	Cantidad	Costo unitario \$	Subtotal \$	Instalación riego por goteo solar	Valor total \$
Semilla híbrido 1	Sobres	6	65,5	393	300	693
Semilla híbrido 2	Sobres	6	62	372	300	672
Semilla híbrido 3	Sobres	6	58	348	300	648
Instalación riego por goteo solar	Jornales	20	15	300		

Además, para el análisis de los costos de producción de una hectárea de pimiento con instalación de riego por goteo presurizado tal como lo presenta la Tabla 5, se incurre en el pago de los materiales e instalación del riego y semillas de híbridos utilizados en el experimento, considerándose una inversión significativa para 5 años de vida útil, la instalación más costosa corresponde al híbrido Nathalie con \$781 correspondiente al tratamiento 1. Ese riego generó una mayor relación beneficio / costo con el híbrido Zapata, similares a los que presentó Benavides

et al. (2017) en cultivos de lechuga y brócoli. En los resultados obtenidos se considera menor consumo de agua para la producción en el híbrido Zapata, pues al tener un consumo de 1,29 m³.ha⁻¹ se produce con reducción del consumo de agua, lo cual favorece la producción con base en criterios de sostenibilidad de recursos hídricos. Esto es consecuente con el uso sostenible del recurso hídrico establecido en el Foro Económico Mundial del 2015, el mismo que es primordial en sistemas de producción que contribuyan a subsanar la crisis de abastecimiento de agua (Soares 2021).

Tabla 5. Costos de producción de una hectárea de pimiento por trasplante- riego presurizado.

Descripción	Unidades	Cantidad	Costo Unitario \$	Subtotal \$	Materiales para riego por goteo presurizado*	Valor total \$
Semilla híbrido 1	Sobres	6	65,5	393	388	781
Semilla híbrido 2	Sobres	6	62	372	388	760
Semilla híbrido 3	Sobres	6	58	348	388	736
Riegos (alquiler de bomba)	Alquiler	8	10	80	388	
Aplicación	Jornales	20	15	300	388	
Materiales para riego por goteo presurizado	Materiales incluida instalación	1 ha	1560	1560	388	

*El total de este riego se amortizó para 5 años, según lo recomendado por Senninger irrigation.

De acuerdo con los rendimientos que se obtuvieron (Tabla 6) se observa que el costo total más elevado corresponde al tratamiento 4 (H1R2) con un valor de \$ 2578,6; y el costo total más bajo estimado es del tratamiento 3 (H3R1) de \$2445,6; El rendimiento promedio en kg, se

dedujo el 10% del peso se asume que los rendimientos experimentales son superiores a los rendimientos comerciales; el precio referencial según el mercado de la ciudad de Guayaquil fue de \$0,32 por kg.

Tabla 6. Análisis económico mediante la relación beneficio – costo del comportamiento agronómico de 3 híbridos de pimiento (*Capsicum annuum* L), sembrado bajo 2 tipos de riego.

Componentes	Tratamientos					
	T1(H1R1)	T2(H2R1)	T3(H3R1)	T4(H1R2)	T5(H2R2)	T6(H3R2)
Costos variables (costos de los tratamientos)	693	672	648	751	760	736
Costo de producción sin tratamientos	1797,6	1797,6	1797,6	1797,6	1797,6	1797,6
Costo total	2490,6	2469,6	2445,6	2548,6	2557,6	2533,6
Productividad total (kg.ha ⁻¹)	17980	18520	19120	25090	25510	26200
Productividad media ajustado (kg.ha ⁻¹)	16182	16668	17208	22581	22959	23580
Beneficio total	5178,24	5333,76	5506,56	7225,92	7346,88	7545,6
Beneficio neto	2687,64	2864,16	3060,96	4677,32	4789,28	5012
Relación Beneficio/Costo	0,08	0,16	0,25	0,84	0,87	0,98

El tratamiento 6 (H3R2) logra un mayor beneficio neto de \$5012 y por lo tanto una mayor relación beneficio costo de 0,98%, inferior al que indica León *et al.* (2019) de \$8333,90 con el uso de riego por goteo, con línea de riego en cada parcela demostrativa con goteos separados a 0,3 m.

CONCLUSIONES

El tratamiento óptimo en la producción de pimiento mediante el riego presurizado, fue el tratamiento 6 con la aplicación del híbrido Zapata, que presentó mejores resultados en costos de producción así como la relación de productividad kg.ha⁻¹ y el mayor rendimiento beneficio /costo. Asimismo, en la aplicación del riego por goteo solar el tratamiento 3 reportó el mejor beneficio con el uso del mismo híbrido.

Con el rendimiento obtenido, se recomienda el uso del riego por goteo presurizado que

permite alcanzar una mayor cantidad y diámetro en frutos de hortalizas; sin embargo, en el caso de pequeños y medianos productores agrícolas que no tienen la capacidad de inversión que se requiere en el sistema de goteo presurizado, podrían aplicar el riego por goteo solar, que genera una relación de beneficio superior al de los costos, aspecto que optimiza el uso del agua.

LITERATURA CITADA

- Alemán, R; Dominguez, J; Rodríguez, Y; Soria, S; Torres, R; Vargas, J; Medina, C; Alba, J. 2018. Indicadores morfofisiológicos y productivos del pimiento sembrado en invernadero y a campo abierto en las condiciones de la Amazonía ecuatoriana. *Revista Centro Agrícola* 45(1):14-23.
- Apaza, G; López, C. 2016. Evaluación de la uniformidad de un sistema presurizado de riego por goteo para cultivo de zonas alto – andinas de Bolivia. *Revista de Investigación e Innovación Agropecuaria y de Recursos Naturales* 3(1):7-17.

- Benavides, O; Barraza, F; Navia, J. 2017. Efecto del riego por goteo y exudación de hortalizas en clima frío. *Revista de Ciencias Agrícolas* 34(1):108-116.
- Bernaola, R; Pimienta, E; Gutiérrez, P; Ordaz, V; Alejo, G; Salcedo, E. 2015. Efecto del volumen del contenedor en la calidad y supervivencia de *Pinus hartwegii Lindl* en sistema doble-trasplante. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales* 6 (28):174-187.
- Burgos, S. 2020. Evaluación de lixiviado de *Hermetia illucens L* en el rendimiento de pimiento (*Capsicum annuum L*) con fertirriego en vivero. Tesis de Ingeniería en Agronomía. Guayaquil, Ecuador, Universidad Agraria del Ecuador. 102 p.
- Chuquitarco, V; Raura, J; Gavilánez, T; Luna, R. 2021. Experiencias productivas con pimiento (*Capsicum annuum L*) con abonos orgánicos en el subtrópico del Ecuador. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar* 5 (2):4311-4321.
- Cordero, M. 2021. Determinación de la eficiencia de la técnica de riego solar en la producción de lechuga (*Lactuca sativa*) en agricultura urbana. Tesis de Ingeniería en Agronomía. Ambato, Ecuador, Universidad Técnica de Ambato. 57 p.
- Díaz, I. 2019. Los pimientos vinieron de América y conquistaron el mundo. *Revista Cultura alimentaria* 88(3):87-89.
- Díaz, A; Alvarado, M; Ortiz, F; Grageda, O. 2013. Nutrición de la planta y calidad de fruto de pimiento asociado con micorriza arbuscular en invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4(2):315-321.
- Flores, M; Sánchez, E; Soto, J. 2018. Influencia del portainjerto “Terrano” sobre la acumulación de elementos orgánicos y calidad de pimiento morrón. *Agronomía Mesoamericana* 29(2):403-413.
- Frutas Hortalizas. s.f. Pimiento, *Capsicum annuum*, *Solanaceae* (en línea). Madrid, España. 2 p. Consultado 25 set. 2021. Disponible en <https://www.frutas-hortalizas.com/Hortalizas/Origen-produccion-Pimiento.html>
- Gabriel, J; Delvalle, J; Padilla, J; Pincay, N; Ayón, F; Narváez, W; González, A. 2020. Innovaciones en la matriz productiva hortícola para reducir el efecto del cambio climático en Puerto la Boca, Jipijapa, Ecuador. *Revista Journal of the Selva Andina Research Society* 11(1):2-17.
- Gómez, A; Rojas, H; Vallejo, F; Estrada, E. 2010. Determinación del requerimiento hídrico del pimentón en el municipio de Candelaria, departamento del Valle del Cauca. *Acta Agronómica* 59(4):442-448.
- Guato, M; Dorbronski, J. 2017. Evaluación del rendimiento de tres híbridos de pimiento (*Capsicum annuum L*) a las condiciones agroclimáticas de la comunidad la clementina, parroquia Pelileo, cantón Pelileo, provincia de Tungurahua. Tesis de Ingeniería en Agronomía. Ambato, Ecuador, Universidad Técnica. 87 p.
- Gutiérrez, J. 2019. Diseño de parcelas divididas. Zumpango, Toluca, México, Universidad Autónoma del Estado de México. 36 p.
- Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC). 2020. Encuesta de superficie y producción agropecuaria Continua (Espac) (en línea). Quito, Ecuador. 1 p. Consultado 09 set. 2021. Disponible en <https://www.ecuadorencifras.gob.ec/estadisticas-agropecuarias-2/>
- Jiménez, M; González, L; Suárez, M; Paz, I; Oliva, A; Falcón, A. 2018. Respuesta agronomía del pimiento California Wonder a la aplicación de Quitomax. *Revista Centro Agrícola* 45(2):40-46.
- León, A; Arzube, M; Orrala, N; Drouet, A. 2019. Efecto del riego deficitario controlado en el cultivo de pimiento (*Capsicum annuum L*) utilizando la tina de evaporación clase A, en Río Verde, Santa Elena, Ecuador. *Revista Journal of the Selva Andina Research* 5(1):114-124.
- Lindao, M; Ayerve, G. 2018. Elaboración de papel comestible a base de pimiento y nuevas propuestas gastronómicas. Tesis Lic. Guayaquil, Ecuador, Universidad de Guayaquil. 103 p.
- Macías, A. 2010. Competitividad de México en el mercado de frutas y hortalizas de Estados Unidos de América. *Revista Agroalimentaria* 16(31):31-48.
- Mantilla, R. 2018. Determinación de metales pesados y pérdidas poscosecha en dos hortalizas de consumo directo pimiento (*Capsicum annuum*) y cebolla (*Allium cepa*). Tesis de Ingeniería en Agronomía. Quito, Ecuador, Universidad Central del Ecuador. 104 p.
- Marcalla, F. 2020. Distribución de solanáceas cultivables en el Ecuador para mejorar la vigilancia fitosanitaria de plagas y enfermedades. Tesis de Ingeniería en Agronomía. Latacunga, Ecuador, Universidad Técnica de Cotopaxi. 58 p.
- Márquez, C; Castro, J. 2015. Uso del Valor Actual Neto, Tasa Interna de Retorno y Relación Beneficio-Costo en la Evaluación Financiera de un Programa de Vacunación de Fiebre Aftosa. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias* 56(1):52-57.
- Mendoza, M; García, R. 2020. Incidencia de la fertilización nitrogenada sobre el crecimiento y producción del pimiento (*Capsicum Annun*). Tesis de Ingeniería en Agronomía. Machala, Ecuador, Universidad Técnica de Machala. 74 p.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAGAP). s. f. Agricultores de Salcedo cosechan 90 quintales de pimiento, cultivados bajo invernadero (en línea). Quito, Ecuador. 1 p. Consultado 12 set. 2021. Disponible en <https://www.agricultura.gob.ec/agricultores-de-salcedo-cosechan-90-quintales-de-pimiento-cultivados-bajo-invernadero/>

- Monge, P. 2015. Efecto de la poda y la densidad de siembra sobre el rendimiento y calidad del pimiento cuadrado (*Capsicum annuum* L.) cultivado bajo invernadero en Costa Rica. Revista Tecnología en Marcha 29(2):125-136.
- Moreno, E; Mora, R; Sánchez, F; García, V. 2011. Fenología y rendimiento de híbridos de pimiento Morrón (*Capsicum annuum* L.) cultivados en hidroponía. Revista Chapingo Serie Horticultura 17(2):5-18.
- Olivo, J. 2017. Efectos de programas de fertilización balanceada con la aplicación complementaria de Calcio y Boro foliar, en el rendimiento de cultivo de pimiento". Tesis de Ingeniería en Agronomía. Babahoyo, Ecuador, Universidad Técnica de Babahoyo. 65 p.
- Orús, A. 2020. Producciones de pimientos frescos en el mundo 2012-2019 (en línea). España. 2 p. Consultado 10 oct. 2021. Disponible en <https://es.statista.com/estadisticas/529468/producciones-de-pimientos-frescos-en-el-mundo/>
- Quezada, D; Salazar, J; Vargas, A. 2019. Análisis del efecto de la condición de escritura utilizando el adverbio especialmente como partícula focalizadora en el tiempo promedio de segunda lectura. Serengueti, Revista de Estadística 1(32):9-18.
- Quiñonez, J; Tandazo, J; Arias, J. 2020. Producción de pimiento (*Capsicum annuum* L.) mediante la aplicación de abonos orgánicos. Revista Ciencia e Investigación 5(3):42-48.
- Reséndiz, R; Moreno, E; Sánchez, F; Rodríguez, J; Peña, A. 2010. Variedades de pimiento morrón manejadas con despunte temprano en dos densidades de población. Chapingo. Revista Serie horticultura 16(3):223-229.
- Reyes, J; Rivero, M; Solórzano, A; Carballo, F; Lucero, G; Ruiz, F. 2021. Aplicación de ácidos húmicos, quitosano y hongos micorrízicos como influyen en el crecimiento y desarrollo de pimiento. Terra Latinoamericana 39:1-13.
- Sánchez, F; Moreno, E; Reséndiz, R; Colinas, M; Rodríguez, J. 2017. Producción de pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) en ciclos cortos. Revista Agrociencia 51(4):437-446.
- Saraguayo, S; Martillo, J. 2021. Densidad de siembra y aplicación foliar en el cultivo de pimiento (*Capsicum annuum* L.) bajo dos sistemas de tutorio. Milagro, Ecuador, Universidad Agraria del Ecuador. 72 p.
- Soares, D. 2021. Ecología política y gestión del agua en territorios rurales. Berghahn Journals 11(3):80-101.
- Vaca, J; Basantes, T. 2021. Producción y comercialización del pimiento morrón (*Capsicum annuum* var. annum) en la provincia de Imbabura". Ibarra, Ecuador, Pontifica Universidad Técnica del Norte, Ingeniera en Agronegocios Avalúos y Catastros. 158 p.
- Velasco, G; Sánchez, I. 2015. Los costos como medio de proyección de hortalizas con producción orgánica de pimiento, nabo y acelga en la finca La María, año 2014. Quevedo, Ecuador, Universidad Técnica Estatal de Quevedo. 87 p.



Agronomía Costarricense. Universidad de Costa Rica. Se encuentra licenciada con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr

NORMAS DE PUBLICACIÓN

La Revista Agronomía Costarricense es una publicación semestral editada y financiada por la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica, funciona con el respaldo de profesionales de la Universidad de Costa Rica, el Colegio de Ingenieros Agrónomos y el Ministerio de Agricultura y Ganadería que conforman su Consejo Editorial.

OBJETIVO DE LA REVISTA

El objetivo de la Revista Agronomía Costarricense desde su creación en 1977 ha sido publicar, visibilizar y facilitar el acceso de la investigación agropecuaria y forestal con temas de interés y actualidad científica del sector.

TIPO DE PUBLICACIÓN

- Trabajos originales e inéditos de investigación, que tengan mérito científico o técnico a juicio del Consejo Editorial.
- Artículos.
- Notas técnicas, que son avances o resultados paralelos de investigaciones en marcha.
- Análisis y comentarios sobre temas relevantes, solicitados a especialistas.
- Revisiones de literatura exhaustivas sobre un tema específico.
- Reseñas de libros.

NORMAS PARA PUBLICACIÓN

Los trabajos publicados en la Revista Agronomía Costarricense son el resultado de una selección rigurosa, por parte del Consejo Editorial en primera instancia y el arbitraje realizado por especialistas nacionales e internacionales, mediante el sistema de revisión por pares doble ciego.

Una vez que el Consejo Editorial evalúa previamente el mérito científico o técnico de los trabajos, son remitidos con el instrumento de evaluación, a especialistas nacionales e internacionales. El dictamen puede emitir los siguientes criterios:

- El documento se acepta sin reservas.
- Se acepta sólo si se incluyen las observaciones.
- No se acepta del todo para publicación.

En caso de que se presente controversia entre las evaluaciones realizadas para un mismo documento, se somete a otra revisión por parte de nuevas personas especialistas cuya valoración determine el resultado definitivo para publicar o no.

Si el documento es aceptado clasifica en una de las siguientes categorías:

- Artículo.
- Nota técnica.
- Otros: Análisis y comentario, revisión de literatura, reseñas de libros.

La persona editora en conjunto con quienes conforman el Consejo Editorial de la Revista Agronomía Costarricense, determinan si se acepta o rechaza la documentación presentada para posible publicación.

Los trabajos pueden ser escritos en español o inglés. Deben ajustarse a las normas de redacción establecidas para la estructura del manuscrito. Es recomendable que los manuscritos en inglés sean revisados y corregidos previamente por una persona especialista del tema cuya lengua materna sea el inglés. (El aporte del material recibido no será devuelto a las personas autoras).

- Los trabajos de investigación no deben ser mayores de 20 páginas y las notas técnicas no deben exceder las 6 páginas.
- La Revista Agronomía Costarricense no cobra por recibir manuscritos o por publicar investigaciones.
- El trabajo debe estar escrito en una versión actualizada de Word para Windows, a doble espacio y con tipo de letra arial 12.
- Las personas autoras deben seguir las normas del Sistema Internacional de Unidades tanto en el texto como en las tablas que suministren.
- El manuscrito debe ser enviado al correo electrónico de la Revista Agronomía Costarricense.
- Las tablas deben ser presentadas en Word y en Excel las figuras y gráficos en diferentes tonos de grises, en orden ascendente por números y letras según corresponda. Tanto las tablas como las figuras se deben presentar en páginas independientes impresas en buena calidad. Otras figuras y fotografías se deben presentar en formato eps, jpg o tiff con un mínimo de 240-300 dpi.

Los trabajos deben ser enviados o entregados personalmente, en nuestra dirección:

REVISTA AGRONOMÍA COSTARRICENSE

Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica

San José, Costa Rica.

Teléfono 2511 2080, fax 2234 1627

Correo electrónico: rac.cia@ucr.ac.cr

ESTRUCTURA DEL MANUSCRITO

Título. Debe ser lo suficientemente claro de forma tal que oriente al lector sobre el contenido de la investigación y que no exceda de 15 palabras.

Autor (a). Escribir el nombre completo, con ambos apellidos separados por un guión como se muestra a continuación: Serrano-Velázquez. La instrucción aplica también para las personas coautoras. Deberán agregar al pie de página la afiliación institucional indicada con un número para cada una de las personas participantes en la investigación y sólo el correo electrónico institucional de la persona que el equipo investigador seleccione para correspondencia.

El documento presentado será evaluado dentro de la modalidad de artículo de investigación, nota técnica, revisiones de literatura sobre un tema específico, reseñas de libros y actualizaciones o análisis y comentarios sobre actividades agropecuarias específicas. La decisión final sobre la modalidad para publicación del manuscrito será con base en el criterio de las personas revisoras y recomendaciones de quienes integran el Consejo Editorial y Consejo Editorial Asesor Internacional.

Código ORCID. Sirve para identificar a la persona autora con un código único que le diferenciará de cualquier otra persona que publique. Dicho código es requerido para afiliar tanto a la persona que investiga como a las publicaciones que realice. Deberá registrar nombre completo, correo electrónico y una contraseña en el siguiente enlace: <http://orcid.org/>

El enlace señalado anteriormente generará automáticamente el código ORCID de la persona que publica. En el caso de que en una publicación participen varios (as) autores (as) deberá aparecer el ORCID de cada una de las personas participantes en la publicación y no sólo la de la persona señalada como contacto para correspondencia. Ese código aparecerá al pie de la página para cada una de las personas participantes en la publicación.

Resumen estructurado. Este es un párrafo donde se debe señalar, en un máximo de 300 palabras, la introducción, el objetivo del trabajo, los materiales y métodos, los principales resultados y las conclusiones. Tratar de incluir cifras. Los términos “Introducción, Objetivo, Materiales y métodos, Resultados y Conclusión” deben ser destacados en negrita para diferenciar esos contenidos dentro del resumen.

Abstract. Debe ser exacto al resumen en español y debe incluir el título en inglés.

Palabras clave. Incluir hasta 5 palabras clave que le permitan a un usuario localizar en una plataforma digital la publicación.

Introducción. Debe incluir la justificación del trabajo, los antecedentes más relevantes sobre el tema y el objetivo concreto del trabajo.

Materiales y métodos. Se refiere a todos los materiales y métodos requeridos para el desarrollo de la investigación, con una detallada descripción de los mismos que le permitiera alcanzar resultados específicos del tema tratado. Si la persona autora requiere algún programa especializado debe presentar una descripción y conveniencia de su utilización para alcanzar los resultados.

Resultados y discusión (pueden venir juntos o separados). Su contenido se fundamenta en los resultados obtenidos a partir del objetivo planteado en la investigación. Independientemente de su complejidad, requieren ser expuestos de forma clara y sencilla. Los resultados pueden ser números, categorías o agrupaciones de los objetos o sujetos de estudio. La exposición de los resultados debe caracterizarse por la precisión y legitimidad de los hechos y cifras registradas, por lo que no se admiten resultados que se apoyen únicamente en calificativos como por ejemplo: mucho, poco, más, menos, bastante, pues podría conducir a una interpretación inexacta que debilita la investigación.

Agradecimientos. En esta sección sólo se incluye aquellas personas que hicieron un aporte muy significativo al trabajo.

Literatura citada. Debe redactar las referencias de acuerdo con el Manual “**Redacción de referencias bibliográficas: normas técnicas para ciencias agroalimentarias del IICA-CATIE**”. Disponible en <http://www.iica.int/sites/default/files/publications/files/2016/b4013e.pdf>

Ejemplos:

Revista

Saborío, A; Sánchez, J. 2014. Evaluación de la condición corporal en un hato de vacas Jersey en pastoreo en la zona alta de Cartago. Variaciones durante el ciclo productivo. *Agronomía Costarricense* 38(1):55-65.

Libro

Garita, RA. 2014. La piña. Cartago, Costa Rica, Editorial Tecnológica de Costa Rica. 568 p.

Capítulo de un libro

Molina, E; Alvarado, A. 2012. Manejo de la acidez y encalado de suelo. *In* Alvarado, A; Raigosa, J (eds.). Nutrición y fertilización forestal en regiones tropicales. San José, Costa Rica, ACCS. p. 159-177.

Tesis

Reyes, D. 2012. Compuestos GRAS para el control de patógenos poscosecha in vitro en mango (*Mangifera indica* L.), piña (*Ananas comosus* L.) y papaya (*Carica papaya* L.), y pruebas de eficacia in vivo en piña. Tesis Lic. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 92 p.

Referencias en Internet

Autor, año. Título del trabajo (en línea). Ciudad, país. Fecha de consulta y vínculo. Se debe verificar el tipo de publicación según corresponda libro, revista, etc., para redactar la cita.

DERECHOS DE AUTOR

El autor, la autora o los autores deben autorizar por escrito a la Revista Agronomía Costarricense el derecho de su primera publicación y mención que quedará registrada con la licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica y conserva todos sus derechos y además, podrán incluir su publicación en un repositorio institucional que especifique su publicación en primera instancia, en la Revista Agronomía Costarricense.

Una vez publicado el volumen del periodo respectivo, se puede acceder a la versión digital, lo que permite gestionar un autoarchivo del documento o documentos de interés, en el sitio seleccionado por la persona autora.

El autor o la autora principal, debe dar fe por escrito, que la información presentada es original y no ha sido publicada en ningún otro medio. Además, desde el momento que entrega la documentación, debe contar con la autorización escrita de la institución donde se realizó la investigación.

POLÍTICA DE DETECCIÓN DE PLAGIO

Mediante herramientas de Google y DupliChecker, la Revista Agronomía Costarricense es vigilante de las fuentes que se utilizan en la dinámica de investigación para determinar el uso de ideas originales sin la citación de la fuente o bien por la utilización de palabras de otros sin citarlos en el documento y en la lista de referencias bibliográficas.

De igual manera se incurre en plagio cuando se falsifican las palabras de otros para asumirlas como propias o bien cuando indica ser el autor o autora de una investigación cuando su propietario es otra persona. De ser detectado un plagio, se indicará por escrito al autor principal como se procederá.

POLÍTICA DE ACCESO ABIERTO

Esta revista provee acceso libre inmediato a su contenido bajo el principio de hacer disponible gratuitamente la investigación al público, con el propósito de fomentar un mayor intercambio de conocimiento global.

ARCHIVO

La revista cuenta con la preservación de sus archivos digitales, primeramente, los archivos se encuentran integrados en la base de datos del Ministerio de Agricultura y Ganadería, la cual cuenta con un sistemas de respaldo, cuyas Políticas y Normas se pueden encontrar en el enlace: <http://www.mag.go.cr/sg%20mag/Nomas%20y%20Políticas%20Generales%20de%20TI-2016.pdf>

Asimismo, se cuenta con el respaldo digital del repositorio Kérwá de la Universidad de Costa Rica, y el sistema de administración y publicación de revistas OJS. Además, semestralmente la revista envía un CD, con el volumen respectivo, al Sistema Nacional de Bibliotecas (SINABI); por lo que ahí se encuentra un respaldo de los manuscritos.

La revista también utiliza el sistema CLOCKSS para crear un archivo distribuido entre las bibliotecas participantes, lo que permite a dichas bibliotecas, crear archivos permanentes de la revista con fines de preservación y restauración. Se puede encontrar más información en el siguiente enlace: <http://thekeepers.org/>

CÓDIGO DE ÉTICA

DEBERES DEL O LA EDITORA

El o la editora, debe vigilar por publicaciones originales con mérito científico o técnico, con apoyo del Consejo Editorial. De esta manera, puede aceptar o rechazar un trabajo bajo los criterios expuestos en las normas de publicación de la revista y su contenido intelectual sin distinción de género, orientación sexual, ideología política o religiosa, nacionalidad u origen étnico de las personas. Los textos recibidos serán remitidos a especialistas nacionales e internacionales para su revisión por pares doble ciego. En todo el proceso, el editor o editora debe garantizar la confidencialidad a las partes, así que no puede revelar información acerca del contenido del manuscrito, tampoco los nombres de las personas que solicitan publicar o los nombres de quienes realizan la revisión y evaluación del documento.

DEBERES DE LAS PERSONAS QUE CONFORMAN EL CONSEJO EDITORIAL

A quienes conforman el Consejo Editorial, les corresponde contribuir con la asignación de personas revisoras nacionales e internacionales según la temática del documento recibido; también deben auxiliar en la revisión preliminar de manuscritos sobre materias afines a su profesión y apoyar con la actualización, mejora y evaluación periódica de la revista.

DEBERES DE LAS PERSONAS AUTORAS

Deben seguir los criterios expuestos en las normas de publicación de la Revista Agronomía Costarricense. Asimismo, deben documentar por escrito, que la información presentada es original,

que no ha sido publicada o considerada para su publicación en otro medio; además, debe incluir dentro de la documentación que presente, la autorización escrita de la institución donde se generó el documento. Quienes publiquen deben saber que la utilización de datos, información de otras personas autoras sin citarlas en el documento y en la lista de referencias bibliográficas, así como la adopción de ideas para asumirlas como propias, se podría presumir como plagio y de comprobarse, su texto no se tomaría en cuenta para la publicación. De esta forma deben citar completa y adecuadamente las fuentes bibliográficas de los textos que aportan en el trabajo presentado. Para la autoría, es preciso que se nombren como personas co-autoras, quienes contribuyan significativamente en el desarrollo del estudio. Deben citar en el texto todas las fuentes financieras en las que se apoyaron, al igual que cualquier conflicto económico o de intereses que podría influenciar en los resultados finales del manuscrito.

En los documentos presentados no deben aparecer los nombres de productos o casas comerciales (®), pues compromete su publicación. Por último, si quien publica identificara algún error en su artículo, deberá informarlo 15 días posteriores a la entrega del último documento que presentó para su publicación al correo rac.cia@ucr.ac.cr

DEBERES DE LAS PERSONAS REVISORAS

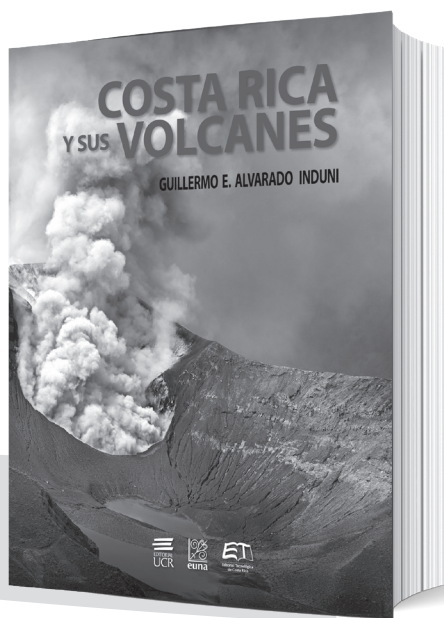
A toda persona especialista le compete notificar al editor o editora, cuando se le consulte, si le es posible revisar el documento que se le solicita evaluar. De aceptar deberá realizar su trabajo de manera objetiva, sus críticas han de tener argumentos sustentados en la ciencia y no ha de tener ningún conflicto de intereses con la información presentada o la autoría, aspectos que deberá indicar antes de aceptar y llevar a cabo la evaluación del documento.

Quienes contribuyen en la revisión de los documentos presentados para posible publicación han de comunicar al editor o editora, acerca de cualquier comportamiento no ético identificado en el manuscrito revisado, además de los aportes de información crítica y constructiva para el mejoramiento del texto, o bien, para el rechazo del mismo. De igual forma, conocen que el material que se les entrega para su evaluación debe ser tratado con absoluta confidencialidad, por lo cual no podrán revelar a terceras personas ningún dato o utilizar la información del documento para proyectos personales.

EDITORIAL UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

Costa Rica y sus volcanes

Guillermo Alvarado Induni



1.a ed. 2021
21,83 cm x 28,42 cm
976 pp.
ISBN 978-9968-46-776-6

Se presenta un cuadro sinóptico y actualizado sobre los volcanes de Costa Rica, su formación y actividad eruptiva, historia, influencia socioeconómica y cultural, hasta llegar a un grado de conocimiento y desarrollo vulcanológico, que posiciona a Costa Rica a nivel internacional.


EDITORIAL
UCR

LIBRERÍA — UCR
Tels.: 2511 5858 • 2511 5859

Portal DE LA Investigación

Ciencia universitaria a su alcance

Información

- Noticias de ciencia y tecnología
- Proyectos de investigación
- Agenda de investigación
- Nuevas publicaciones

Opinión

- Vox populi
- Opinión
- Foro

Plataforma de medios

- Programa En la Academia
- Serie televisiva Girasol
- Revista Girasol digital
- Cápsula Girasol



www.vinv.ucr.ac.cr



Estimados suscriptores:

Las revistas académicas de la Universidad de Costa Rica difunden los más recientes avances en artes, filosofía, ciencias y tecnología. Nuestras revistas se caracterizan por su alta calidad y precios accesibles. Mejorar continuamente es nuestra tarea. Para nosotros es muy importante el apoyo de nuestros lectores.

Le invitamos a renovar su suscripción.

El pago para suscriptores nacionales se puede realizar mediante depósito bancario o transferencia electrónica de fondos en la Cuenta Maestra 100-01-080-000980-6 de la Universidad de Costa Rica (UCR) con el Banco Nacional y enviarnos copia del comprobante por fax al N° (506) 2511-5417 o al correo electrónico distribucionyventas.siedin@ucr.ac.cr. También puede cancelar en la Sección de Comercialización, ubicada frente a la Facultad de Artes.

Para el pago de suscripciones internacionales, por favor contacte su agencia suscriptora o escríbanos al correo electrónico distribucionyventas.siedin@ucr.ac.cr

Horario de atención de 7:00 a. m. a 11:45 a. m. y de 1:00 p. m. a 3:45 p. m.

SUSCRIPCIÓN DE REVISTAS • JOURNAL SUBSCRIPTION FORM

Nombre / Name: _____

Dirección / Address: _____

Apartado / P.O. Box: _____ Teléfono / Telephone: _____ E-mail: _____

Suscripción anual / Annual subscription		Suscripción anual / Annual subscription		Suscripción anual / Annual subscription	
☐ AGRONOMÍA COSTARRICENSE	¢ 8160,00	☐ CIENCIAS SOCIALES	¢ 12 240,00	☐ LENGUAS MODERNAS	¢ 8 160,00
☐ ANUARIO DE ESTUDIOS CENTROAMERICANOS	¢ 4 080,00	☐ DIÁLOGOS	¢ 8 160,00	☐ MATEMÁTICA: TEORÍA Y APLICACIONES	¢ 8 160,00
☐ BIOLOGÍA TROPICAL	¢ 12 240,00	☐ FILOLOGÍA Y LINGÜÍSTICA	¢ 8 160,00		
☐ CIENCIAS ECONÓMICAS	¢ 8 160,00	☐ FILOSOFÍA	¢ 12 240,00		

Los precios incluyen el 2% de Impuesto al Valor Agregado

Precios internacionales / International prices

América Latina, Asia y África US\$ 20,40

Resto del mundo US\$ 71,40

Excepto Biología Tropical y Ciencias Sociales US\$ 102,00

Filosofía US\$ 91,80

Los precios incluyen el 2% de Impuesto al Valor Agregado

FAVOR HACER SU PAGO A NOMBRE DE: • PLEASE MAKE CHECK PAYABLE:
UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

www.editorial.ucr.ac.cr

Esta revista se terminó de imprimir en la
Sección de Impresión del SIEDIN, en diciembre 2022.

Universidad de Costa Rica
Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

AGRONOMÍA COSTARRICENSE

REVISTA EN LÍNEA

Si desea visitar la Revista Agronomía Costarricense puede hacerlo a través de:

Ministerio de Agricultura y Ganadería http://www.mag.go.cr/rev_agr/index.html

Portal de Revistas Académicas de la Universidad de Costa Rica <http://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agrocost>

Centro de Investigaciones Agronómicas www.cia.ucr.ac.cr

CORRESPONDENCIA Y SUSCRIPCIONES

Editorial Universidad de Costa Rica
administracion.siedin@ucr.ac.cr
www.editorial.ucr.ac.cr
Apartado Postal 11501
2060 Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
Costa Rica

Número suelto:

Costa Rica

¢ 3060.00 incluye el 2% de IVA

Suscripción anual:

Costa Rica

¢ 8160.00

América Latina,

Asia y África

Resto del mundo

US\$ 20.40

US\$ 71.40

CANJES

Universidad de Costa Rica
Sistema de Bibliotecas, Documentación e Información
Unidad de Selección y Adquisiciones
-CANJE
Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
Costa Rica

DIRECCIÓN

REVISTA AGRONOMÍA COSTARRICENSE

Centro de Investigaciones Agronómicas
Universidad de Costa Rica
San José, Costa Rica
Teléfono 2511-2080
Fax 2234-1627
Correo electrónico: rac.cia@ucr.ac.cr

Contents

Scientific papers

- Pathogenicity of fungi associated with strawberry plants (*Fragaria ananassa*) and ultrastructural description of the pathosystem.
Milagro Granados-Montero, Mariam Zúñiga-Castañeda, Priscila Chaverri-Echandi, Efraín Escudero-Leyva and Melissa Mardones-Hidalgo 9-28
- Evaluation of methodologies to determine the physical characteristics of a coconut fiber substrate.
Freddy Soto-Bravo and Alejandro Betancourt-Flores 29-45
- Effect of inoculation with *Trichoderma* on vegetative growth of tomato (*Solanum lycopersicum*).
Daniela Rodríguez-García and Jorge Vargas-Rojas 47-60
- Identification of banana soft rot associated microorganisms, and in vitro evaluation of microbiological and chemical control alternatives.
Jose Pablo Vargas-Fernández, Amy Wang-Wong and Miguel Muñoz-Fonseca 61-76
- Bioproduct application frequencies effect on tree development and disease control in coffee.
Yusdel Ferrás-Negrín, Marianny Portal-Rodríguez, Carlos Alberto Bustamante-González and Ciro Sánchez-Esmori 77-84
- Crotalaria spectabilis* Roth as a cover crop in coffee (*Coffea arabica*) and weed control.
Robin Gómez-Gómez, Eric Chaves-Sánchez and María Isabel González-Lutz 85-100
- Tolerance of various legume cover crops to pre- and post-emergence herbicides.
Robin Gómez-Gómez and María Isabel González-Lutz 101-116
- Phenotypic and Genotypic Characterization and pollination tests of 18 Annatto (*Bixa Orellana* L.) accessions in Costa Rica.
Enio Remberto Duque-Y Duque, Milena Belén Aguirre-Saltos and Ana Cristina Tamayo-Domínguez 117-134

Technical notes

- Birds' community and the damage they generate in agricultural production in Alajuela, Costa Rica.
Carol Sánchez-Núñez and Javier Monge-Meza 135-146
- Behavior analysis of three pepper hybrids under 2 different irrigation systems.
Bertha Holguín-Burgos, Allan Alvarado-Aguayo, Danilo Delgado-Delgado and Mónica Munzón-Quintana 147-158