

# AVANCES EN EL CONTROL BIOLÓGICO DE SIGATOKA NEGRA (*Mycosphaerella fijiensis*)

Roberto González·Elkin Bustamante·Phillip Shannon y Carlos Ruiz

CATIE, Unidad de Fitoprotección, 7170 Turrialba, Costa Rica

## 1. INTRODUCCION

La sigatoka negra, es una de las enfermedades más importantes que afectan al cultivo de banano y plátano. Es causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. Su diseminación se produce a nivel local, mediante ascosporas y conidios, su distribución a grandes distancias ocurre probablemente por el traslado de retoños infectados o de hojas enfermas.

En Costa Rica se invierten anualmente para su combate US\$ 46 millones, en 35 aplicaciones de fungicidas. Sin embargo, el número de aplicaciones va en aumento, debido a la resistencia del patógeno a los químicos aplicados (CORBANA 1993).

El futuro, del control de la sigatoka negra puede visualizarse desde dos puntos de vista: resistencia genética enfocada a largo plazo y control biológico integrado. Si este último tiene éxito y se le asocia con prácticas agrícolas adecuadas, puede resultar económico, estable y ecológicamente deseable.

Sin embargo, es muy poca la investigación realizada en el campo del control biológico de éste patógeno. En el año 1988, Jiménez *et al.*, utilizando bacterias epífitas, identificaron 12 bacterias que mostraron antagonismo *in vitro* pero también encontraron tres cepas del género *Pseudomonas* sp. que resultaron patogénicas a humanos.

Por tanto, por ser *Mycosphaerella fijiensis* un hongo de la Clase *Ascomycete*, generalmente de organización micelial y con paredes de quitina en su estructura (Alexopoulos y Mims 1979), y basados en resultados en otros cultivos de algunos investigadores entre otros, Mitchell y Alexander 1962, Kokalis-Burelle *et al.*, 1991 Ploper *et al.*, 1991, Okumoto y Bustamante 1992, es que nos propusimos investigar sobre las poblaciones de microorganismos quitinolíticos antagonistas al patógeno.

## 2. AISLAMIENTO Y SELECCION DE MICROORGANISMOS

Para realizar los aislamientos de microorganismos, se escogieron dos fincas bananeras. Una con alta incidencia de sigatoka negra, considerada como "sitio caliente", y la otra con menor incidencia de la enfermedad, considerada

como "sitio no caliente". Se seleccionaron plantas de la variedad Gran Enano, próximas a "parición". En estas se marcó la cuarta hoja (Brun 1963), en la que se aplicó una suspensión coloidal de quitina a una concentración de 0.2% w/v con un pH entre 7 y 8; este se obtuvo agregando una solución de 0.1M NaOH. Las hojas se recolectaron siete días después de la inoculación.

De la parte central de la hoja se sacaron al azar 5g de tejido, que se colocaron en un erlenmeyer de 250 ml, con 50 ml de agua destilada estéril y se agitó por 45 minutos. Luego se hicieron diluciones decimales hasta  $10^{-3}$ . Posteriormente se tomó una alícuota de 20 microlitros de esa dilución y se colocó en un plato con agar-quitina (AQ), que se incubó a 28°C hasta obtener las colonias de microorganismos. Las cepas de *Bacillus* se obtuvieron calentando las diluciones en "baño maría" a 80°C por 10 minutos; después se sembraron en platos con agar-nutriente-quitina (ANQ), y se incubaron a 28°C.

Las lecturas se realizaron entre las 24 y 96 horas después de la siembra de los microorganismos. Se registró como reacción positiva, aquellas colonias donde el borde de la misma fue transparente, lo que indica que la quitina fue metabolizada por las bacterias.

Después de extraer las cepas quitinolíticas, se evaluó el tiempo en que inició la producción de quitinasa, en los medios AN y ANQ. Se seleccionaron las cepas que produjeron quitinasa en menos de 48 horas. También se examinaron *Bacillus cereus*, cepa A30 (colección MIP-CATIE) y *Serratia entomophyla*, cepa A100 (colección NRI-CATIE); debido a que en evaluaciones anteriores presentaron excelentes características quitinolíticas (Okumoto 1992, Starr *et al.* 1981).

### 2.1 Resultados

De la filósfera de hojas de banano se aislaron 120 colonias de microorganismos con la habilidad de producir quitinasa; 13 de las cuales presentaron acción quitinolítica antes de las 48 horas, en los medios AQ y ANQ. Esto permite al microorganismo actuar contra el patógeno antes de que al tubo germinativo penetre en el estoma. Estos aislamientos mostraron características como colonias planas, pequeñas,

redondas y de color rojo cambiando a azul violeta, anaranjado o blanco. También, mostraron mayor crecimiento *in vitro*, característica de importancia para la multiplicación del microorganismo en forma masiva; debido a que es indispensable contar con una alta masa bacteriana para la colonización del filoplano. La pigmentación de las bacterias epífitas también es importante, porque actúa como protector contra los rayos ultravioleta (Starr *et al.* 1981).

La habilidad de producir quitinasa en los medios AQ y ANQ, es clave para asegurar la capacidad del microorganismo de sobrevivir en medios con mucha o poca cantidad de nutrientes; condiciones similares a las que se presentan en la naturaleza. Por el contrario Okumoto y Bustamante (1992, datos sin publicar), encontraron que los *Bacillus* perdían o mantenían su habilidad quitinolítica dependiendo del nivel nutritivo del medio donde se encontraban.

Otros microorganismos no residentes en hoja de banano y que presentaron buenas características quitinolíticas en ambos medios fueron: *Bacillus cereus*, cepa A30 extraído de hojas de tomate y *Serratia enthomophyla*, cepa A100 extraído del tracto digestivo de *Costelytra zealandica*.

De los sitios muestreados la mayor cantidad de microorganismos quitinolíticos (94 colonias), se aislaron del sitio "no caliente"; en contraste en el "sitio caliente"(26 colonias).

### 3. PRUEBA DE ANTAGONISMO EN LABORATORIO

Se recolectó la hoja 1 (Brun, 1963) de plantas de Gran Enano, de zonas donde no se habían aplicado fungicidas. De la parte intermedia de la hoja se sacaron discos, de 14 cm de diámetro. En la cámara de flujo laminar, se desinfectaron los discos, sumergiéndolos en alcohol al 70% por un minuto luego en agua destilada estéril por 3 minutos. Posteriormente se inocularon con la bacteria, a una concentración de  $10^9$  ufc/ml manteniendo los discos por un minuto en esta solución. Luego, se hicieron descargas de ascosporas (Dupont 1982) en el envés de los discos, por un período de 1,5 horas; se marcaron las zonas de descarga. Posteriormente, los discos de hoja inoculados, se incubaron a 28°C por 48 horas.

Después de 48 horas, los discos se sumergieron por 10 segundos en barniz comercial transparente y se secaron a temperatura ambiente por 15 minutos. Luego, se cortaron las zonas de tejido marcadas previamente, se retiró la capa de barniz, colocándola inmediatamente sobre un portaobjetos. Se agregó azul de metileno y se evaluó al microscopio el porcentaje de inhibición del tubo germinativo de 50 ascosporas por plato Petri, en tres

repeticiones. En cada repetición se utilizaron cuatro campos visuales, los cuales se compararon con un testigo absoluto. La inhibición del tubo germinativo se determinó midiendo su longitud con un microscopio, calibrado a 40X y usando un lente micrométrico dentro de un ocular calibrado previamente con un micrometro de platina.

### 3.1 Resultados

La evaluación de la longitud del tubo germinativo, mostró diferencias significativas al 5% entre los tratamientos con respecto al testigo absoluto, excepto en las cepas B18 y B7, las cuales no presentaron significancia. Las dos mejores cepas de microorganismos antagonistas, extraídas de la hoja de banano fueron: R1 y A23; las cuales produjeron un antagonismo del 74,2 y 71,4% respectivamente. La cepa A100 y la A30, presentaron un antagonismo mayor al 60% cada uno.

Basado en la inhibición del tubo germinativo, se seleccionaron las cepas R1 y A23 para realizar las pruebas de fungicidas y adherentes, debido a que éste efecto puede influir en la capacidad del patógeno para penetrar los estomas.

Para las cepas A30 y la A100 también se evaluó estas condiciones, debido a que presentaron buen antagonismo en laboratorio. Además son los únicos microorganismos evaluados no residentes en la hoja de banano. Aparentemente, el uso de microorganismos epífitos residentes constituye la práctica más recomendada para el combate de patógenos de órganos vegetales aéreos. Sin embargo existen trabajos (Blakeman y Fokkema 1982; Dubos 1984; Thompson, *et al.* 1976; Tronsmo y Dennis 1978; Vargas 1984), que demuestran que el uso de antagonistas aislados de ambientes foráneos, pueden ser una vía de combate igual o mejor, en cuanto a efectividad y residualidad, comparado con el uso de antagonistas aislados del filoplano.

### 4. COMPATIBILIDAD DE MICRO ORGANISMOS A FUNGICIDAS

Los microorganismos antagonistas seleccionados se sembraron en platos petri con medio AQ. Discos de papel bond estéril de 6 mm de diámetro, se impregnaron con suspensiones de benomil, mancozeb, propiconazole y tridemorf, en concentraciones de 0, 10, 100 y 1000 ppm. En el centro del disco se colocó una gota de 0,05 ml del fungicida a evaluar en la concentración requerida, para humedecer bien el disco, pero evitando el exceso de líquido. Los discos se colocaron en los platos en los cuales previamente se había puesto a crecer la bacteria y se incubaron por 48 horas a 28°C.

Se midió la zona de inhibición ocasionada por el plaguicida, la cual se manifiesta como un halo transparente entre el disco de papel impregnado con el producto, y el crecimiento bacterial, se evaluó la distancia desde el centro del disco, hasta el borde de dicha zona.

#### 4.1 Resultados

En condiciones de laboratorio, las cepas A23, A30, R1 y A100, fueron compatibles con los fungicidas mancozeb 80%, propiconazole 25.3%, tridemorf 75% y benomil 50%, evaluados a 0, 10, 100 y 1000 ppm ya que éstos fungicidas en ninguna de las concentraciones utilizadas formó halo.

Estos microorganismos se extrajeron de zonas comerciales, con altas aplicaciones de fungicidas, y según Blakeman y Fokkema (1982), se ha determinado que los hongos epífitos, pueden ser eliminados por fungicidas de amplio espectro, produciendo un aumento de bacterias epífitas con gran resistencia a esos fungicidas.

La utilidad del manejo integrado de plagas ha sido demostrada por algunos autores (Leben 1965; Vargas 1984), cuando se sospecha de la existencia de algún mecanismo de sinergismo entre el fungicida y el microorganismo. Sin embargo, la importancia radica en la capacidad del microorganismo de resistir las aplicaciones de fungicidas en el campo, sin disminuir su población; especialmente cuando las condiciones favorezcan la enfermedad e impidan la acción antagonica.

### 5. PRUEBA DE ADHERENCIA DE MICROORGANISMOS

En plantas de 2,5 meses de edad en invernadero, se aplicaron los tratamientos: Bacteria (cepa R1) + agua; R1 + agua + Silwet L77 al 0.2%; R1 + agua + NP7 al 0.3%; y agua como testigo. La concentración de bacterias fue de  $10^9$  ufc/ml. Las aplicaciones se hicieron con una bomba manual de aspersión. Posteriormente, las plantas se pasaron al campo, donde se colocaron al azar en recipientes de 2 kg. Diez días después se colectaron las hojas 3 y 4 de cada tratamiento, de cada una de estas se obtuvo una muestra de 5 g; y se procedió a reaislar la bacteria.

Se evaluó el número de colonias bacteriales por tratamiento, calculando la cantidad de colonias formadas en cada gramo de hoja fresca (ufc/g).

#### 5.1 Resultados

Existen diferencias altamente significativas entre el tratamiento Agua + *Serratia marcescens* (cepa R1) con los demás tratamientos. Con este tratamiento se

logró mantener el mayor número de colonias bacteriales en la superficie de la hoja, alcanzando en promedio 3672 colonias por plato petri, lo que significa  $1.8 \times 10^6$  ufc/g de hoja.

Estos resultados indican que la cepa R1 de *Serratia marcescens* tiene gran capacidad de adherencia, la cual se ve reducida cuando se aplica en conjunto con coadyuvantes químicos, tales como Silwet L75 y NP7.

En la finca "La Montaña", Turrialba, Costa Rica en el tratamiento donde se aplica solo agua, no aparecieron colonias de *S. marcescens*, lo que indica que ésta bacteria no es un habitante común de la filosfera de las plantas de la variedad Gran Enano en ese lugar.

### 6. PRUEBA EN CASA DE MALLAS

En esta prueba se utilizaron plantas de la variedad Gran Enano, obtenidas de meristemos de rizomas; con 2,5 meses de edad y una altura promedio de 1,10 m.

Los microorganismos utilizados fueron *Serratia marcescens* (cepas R1 y A23), *Bacillus cereus* (cepa A30) y *Serratia entomophyla* (cepa A100).

Se evaluaron 11 tratamientos; 8 corresponden a los 4 microorganismos mencionados en el párrafo anterior, aplicados en agua con quitina y en agua sin quitina; además un tratamiento de agua, uno de quitina en agua y otro de fungicida. El fungicida utilizado fué propiconazole al 25,3% de ingrediente activo, en la dosis comercial. La quitina coloidal al 0,2% w/v, se aplicó en dosis de 45 g/l.

El procedimiento utilizado fue el siguiente: los microorganismos se pusieron a crecer tres días antes de la aplicación, en agar-quitina (AQ), con un pH entre 7 y 8; posteriormente se recolectó luego la bacteria con agua destilada estéril, hasta obtener una concentración de  $10^9$  ufc/ml. Al mismo tiempo se preparó la quitina en agua, mezclando 45 g de quitina coloidal al 0,2% w/v en un litro de agua destilada y llevando el pH entre 7 y 8. Con cinta plástica se marcaron las hojas 2 y 3 (Brun 1963) de las plantas de banano.

La aplicación de los tratamientos se realizó en casa de mallas. En las plantas donde se aplicó el microorganismo con la quitina, se asperjó primero la quitina y después el microorganismo. La solución se aplicó a toda la planta, cubriendo el haz y el envés de las hojas. Dos días después, las plantas se llevaron al campo, donde se expusieron al inóculo natural de *Mycosphaerella fijiensis* por un período de 7 días, transcurrido este tiempo se trasladaron nuevamente al invernadero.

La evaluación se realizó 22 días después de llevar las plantas al campo. Se hicieron conteos de estrías en estado 3 (Mourichón 1990), en las hojas previamente seleccionadas y marcadas. Para ésto se usó un marco de 3

cm<sup>2</sup>, manteniendo la planta de frente el marco se colocó en el margen derecho de la hoja, en tres puntos diferentes: en la punta, cerca de la periferia de la hoja, en la parte media de la hoja, pero siempre en la periferia; y al inicio de la hoja.

## 6.1 Resultados

En casa de mallas, se encontró que el mejor tratamiento fue la quitina sola, la cual logró inhibir la enfermedad en un 90%; sin embargo, la diferencia con los demás tratamientos incluyendo el fungicida, no fue significativa.

En promedio, los tratamientos controlaron la enfermedad en un 84%, en comparación con el testigo (agua), el de fungicidas disminuyó la infección en un 78%.

Los microorganismos *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus*, *Serratia entomophyla* no presentaron diferencias cuando se aplicaron solos o mezclados con quitina, debido a que éstos organismos tienen la habilidad de producir quitinasas, la cual actúa en las paredes del hongo. Sin embargo, cuando el microorganismo se aplica junto con el sustrato quitina, la acción quitinolítica se ve disminuida, probablemente por el aumento de la población de otros microorganismos quitinolíticos en el filoplano, que en conjunto afectan al patógeno.

Algunos autores (Mitchell y Alexander 1961; Mitchell 1963; Ploper *et al.* 1991, Okumoto 1992), han demostrado en estudios que la quitina aplicada como suspensión coloidal, aumenta la supervivencia de microorganismos quitinolíticos, los cuales pueden controlar el hongo, por su capacidad de digerir las paredes que contienen quitina, o puede producir una barrera física contra los patógenos.

La quitina aplicada a la superficie de la hoja, sirve como sustrato alimenticio para las poblaciones de microorganismos quitinolíticos, los cuales pueden aumentar en número y degradar las paredes del hongo.

## 7. PRUEBA DE CAMPO

El ensayo se realizó entre los meses de junio y setiembre de 1994; en una área aislada de las plantaciones comerciales de banano.

Se midió la presión de ascosporas de *M. fijiensis*, colocando una trampa de la marca Burkard a 2 m de altura; se hicieron conteos semanales usando microscopio. Los registros de temperatura, humedad y precipitación, se observaron de una estación meteorológica, ubicada a 200 m del ensayo.

Las plantas utilizadas pertenecen a la variedad Gran Enano, y fueron obtenidas mediante cultivo de tejidos, con una edad de 2,5 meses.

En este ensayo se evaluaron los 11 tratamientos, utilizados en la etapa de invernadero. La aplicación de estos fue semanal, a excepción del fungicida, el cual se aplicó cada 15 días, alternando los el propiconazole 25%, tridemorf 75% y mancozeb M45 80%, en las dosis comerciales.

Dos días antes de sembrar las plantas en el campo, se marcó con cinta plástica la hoja candela y se realizó la primera aplicación de los tratamientos, por el haz y el envés de las hojas, utilizando bombas de dispersión manual.

Treinta días después de la aplicación, se inició la medición del índice de enfermedad (PPI), la cual se realizó en forma semanal, utilizando la metodología de Stover modificada por Gauhl (1989). Se midió desde la hoja candela hasta la hoja marcada.

## 7.1 Resultados

La época de aplicación y evaluación de los tratamientos se caracterizó por variaciones importantes en la precipitación, con lluvias promedio de 192 mm por semana. El rango de temperatura fluctuó entre los 22°C y los 28°C, condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad (Stover 1982).

La presión de ascosporas en el campo fue de 35235 ascosporas por m<sup>-3</sup> día<sup>-1</sup> como promedio, en la época de aplicación de los tratamientos y de 11476 ascosporas por m<sup>-3</sup> día<sup>-1</sup> durante las semanas de aplicación y evaluación.

Stover (1980) reportó para el cultivo de plátano un rango de 8000 - 32000 ascosporas por m<sup>-3</sup> de aire, durante 24 horas, en plantaciones sin aplicaciones de fungicidas.

El rango de temperatura y la precipitación son factores que favorecen el desarrollo de la enfermedad (González y Jaramillo 1979; Stover 1982) y se refleja en la presión de inóculo al que estuvo sometido el experimento (Stover 1980).

Todos los tratamientos fueron superiores al testigo. El mejor tratamiento fue el químico, controlando en un 60% la enfermedad. Los otros tratamientos no presentaron diferencias significativas entre si ni entre grupos de tratamientos; si embargo en promedio estos lograron controlar la enfermedad en un 40,1%.

Estos resultados, confirman los obtenidos en la etapa de invernadero. En esta los tratamientos se comportaron mejor que el testigo (agua). Sin embargo, en la prueba de campo el tratamiento con fungicida fue

mejor, que los otros tratamientos, lo cual, se puede explicar por las altas precipitaciones durante la etapa del ensayo y la aplicación de los microorganismos en agua. Es probable que gran parte de los microorganismos y la quitina aplicados a la superficie de la hoja fueron lavados por las lluvias, y ésto provocó un control menor del patógeno.

## 8. CONCLUSIONES

Del total de microorganismos quitinolíticos aislados, el 78% se obtuvieron del sitio no caliente y un 22 % del sitio caliente.

*Serratia marcescens* (cepa R1 y A23), *Bacillus cereus* (cepa A30) y *Serratia entomophyla* (cepa A100), producen quitinasa antes de las 48 horas.

El tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* disminuyó con respecto al testigo en un 74,2 y 71,4% cuando fueron tratadas con las cepas de microorganismos R1 y A23. Con las cepas A30 y A100, el tubo germinativo disminuyó en un 60% en cada una.

A nivel *in vitro*, las cepas de microorganismos R1 A23, A30 y A100, son compatibles con los fungicidas utilizados comúnmente en el control de la sigatoka negra, hasta en concentraciones de 1000 ppm del químico.

En pruebas de adherencia bajo las condiciones de campo, R1 tiene mejor adherencia cuando se aplica en agua, con respecto a su uso con los coadyuvantes NP7 y Silwet L 75.

En casa de mallas y campo, todos los tratamientos fueron significativamente superiores al testigo.

En casa de mallas no hubo diferencias significativas entre el tratamiento con fungicida y los tratamientos biológicos.

En pruebas de campo, el mejor tratamiento fue el químico, seguido por los tratamientos biológicos los cuales no presentaron diferencias significativas entre si.

## 9. LITERATURA CITADA

- ALEXOPOULUS, C.J.; MIMS, C.W. 1979. Introductory Micology. 3 ed. Wiley, New York. 632 p.
- BLAKEMAN, J.P.; FOKKEMA, N.J. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. Ann. Rev. Phytopathology 20:167-192.
- BRUN, J. 1963. La Cercosporiose du bananier. Tesis de Doctorado. Universidad de Paris. 198 p.
- CORPORACION BANANERA NACIONAL. 1993. El combate de la sigatoka negra. Boletín Técnico No.4. 21 p.
- DUBOS, B. 1984. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grapevines by an antagonistic strain of *Trichoderma harzianum*. In Currents perspectives in microbial ecology. Ed. by M. S. Klug; L. A. Riddy. Washington, American Society of Microbiology. p. 373.
- JIMENEZ, J.M.; GALINDO, J.J.; RAMIREZ, C. 1986. Estudio sobre combate biológico de *Micosphaerella fijiensis* var. *difformis* mediante bacterias epífitas. Turrialba, Costa Rica, CATIE-UCR. 30 p.
- KOKALIS-BURELLE, N.; BACKMAN, D.A.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; PLOPER, L.D. 1992. Chitin as foliar amendment to modify microbial ecology and control disease. In APS Annual Meeting. (1991, St. Louis, Missouri). APS.
- LEBEN, C. 1965. Epiphytic microorganisms in relation to plant disease. Annual Review of Phytopathology 3:209-230.
- MITCHELL, R.M.; ALEXANDER, M. 1962. Microbiological processes associated with the use of chitin for biological control. Proc. Soil. Sci. Soc. Amer. 26: 556-558.
- MITCHELL, R. 1963. Addition of fungal cell-wall compounds to soil for biological disease control. Phytopathology 53:1068-1071.
- MITCHELL, R.; ALEXANDER, M. 1961. The mycolytic phenomenon and biological control of *Fusarium* in soil. Nature 190:109-110.
- MOURICHON, X. 1990. Developpement de *M. musicola* (maladie de Sigatoka) et *M. fijiensis* (maladie de raies novies) sur les bananiers et plantains. Etude du cas particulier des productions d'altitude. Fruits 45(1):
- OKUMOTO, S. 1992. Efecto de enmiendas sobre bacterias antagonicas a *Alternaria solani* en tomate. Tesis MSc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 114 p.
- PLOPER, L.D.; BACKMAN, P.A.; CUNNINGHAM, S.D.; MARTIN, M.J. 1991. Effect of chitin amendments and added chitinolytic microorganisms on foliar disease of tomato. In APS Annual Meeting. (1991, St. Luis, Missouri). APS.
- STARR, M.P.; STOLP, H.G.; TRUPER, A.B.; SCHLEGEL, H.G. 1981. The Prokaryotes: A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria. New York, Springer-Verlag. v.2. 388p.
- STOVER, R.H. 1980. Sigatoka leaf spots of bananas and plantains. Plant Disease 64(8):750-756.
- THOMPSON, S.V.; SCHROTH, M.N.; MOLLER, W.J.; REIL, W.O. 1976. Efficacy of bactericides and saprophytic bacteria in reducing colonization and infection of pearflowers by *Erwinia amylovora*. Phytopathology 66:1457-1459.
- TRONSMO, A.; DENNIS, C. 1978. Effect of temperature on antagonistic properties of *Trichoderma* species. Transactions of the British Mycological Society 71:469-474.
- VARGAS, E. 1984. Interacción del tratamiento biológico y químico en el combate de ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en el café. Agronomía Costarricense 12-15 p.