

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
FACULTAD DE CIENCIA ANIMAL

TRABAJO DE DIPLOMA

**CONTROL BIOLÓGICO DE TIZÓN TEMPRANO (Alternaria solani)
EN TOMATE CON BACTERIAS EPIFITAS**

DIPLOMANTE:

GRICELDA L. VALDIVIA RODRIGUEZ

ASESOR : DR. ELKIN BUSTAMANTE

CONSULTOR : DR. ENRIQUE TORREZ

Managua, Mayo 28 de 1990

UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
ESCUELA DE PRODUCCION VEGETAL

TRABAJO DE DIPLOMA

CONTROL BIOLÓGICO DEL TIZÓN TEMPRANO (Alternaria solani) EN TOMATE
CON BACTERIAS EPIFITAS.

DIPLOMANTE : GRICELDA L. VALDIVIA RODRIGUEZ

ASESOR : Dr. ELKIN BUSTAMANTE

CONSULTOR : Dr. ENRIQUE TORREZ

MANAGUA, JUNIO 28 DE 1990

DEDICATORIA

A la memoria de mi esposo Walter; quien me motivó a la terminación de mi profesión.

A mis hijos: Christopher y Charmian, quienes me inspiraron en esta etapa.

A mi madre: Sra. Norma Rodríguez, mi amiga incondicional en todo momento.

INDICE DE CUADROS

CUADRO No.		PAG
1	Características bioquímicas de las bacterias aisladas del filoplano del tomate con Alternariosis .	11
2	Porcentaje de inhibición del crecimiento de Alternaria solani por diferentes cepas epífitas.	14
3	Diferencias entre el comportamiento de las cepas bacteriales.	17
4	Resumen de incidencia de la enfermedad Alternaria solani para las variables-cultivares por tratamiento.	21
5	Supervivencia y reproducción de las poblaciones bacteriales en los tratamientos, 10 días después de la inoculación artificial.	22
6	Tratamientos con mayor porcentaje poblacional de bacterias, 10 días después de la inoculación en el segundo muestreo.	24
7	Conteo de población de conidias de Alternaria solani por tratamiento.	26
8	Producción de conidias del Hongo Alternaria solani entre los tratamientos.	27
9	Reproducción de conidias de Alternaria solani por Variedad, conforme los tratamientos.	28

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió el control biológico del Tizón Temprano, causado por *Alternaria solani* en el cultivo de Tomate. Dicho estudio consistió en dos fases: Fase de in vitro, en la cual se determinaron las características bioquímicas y el comportamiento antagonista de las bacterias aisladas del filoplano de la hoja de tomate contra *Alternaria solani*. En la fase de invernadero in vivo, se estudió el comportamiento de las bacterias escogidas por su conducta antagonista in vitro y no antagonistas en el cultivo de tomate con dos variedades Dina y Hayslib, tomando dos momentos de aplicación: a) simultáneamente hongo y bacteria, b) aplicación de las bacterias 24 horas antes de la inoculación artificial del hongo.

Para el estudio in vitro se tomaron 50 cepas bacteriales, de las cuales cuatro se comportaron antagonistas y 46 no antagonistas; las cuatro cepas antagonistas inhibieron el crecimiento del patógeno. En relación a las 46 cepas se tomó una al azar para la prueba in vivo y las restantes se apartaron. De las 50 cepas, el 30% resultó con Pseudomonas fluorescentes (15 cepas bacteriales) y el 70% no fluorescentes (35 cepas bacteriales). Para la prueba in vivo en el cultivo de tomate, se utilizaron las cuatro cepas antagonistas y la cepa bacterial no antagonista escogida al azar.

En el cultivo de tomate disminuyó la incidencia de la enfermedad en las cuatro cepas bacteriales antagonistas y a la vez observamos disminución en la incidencia de la enfermedad en la cepa de características no antagonistas.

INTRODUCCION

Actualmente en Nicaragua existe una dependencia total de los pesticidas, en 1984, el país destinó más de 58 millones de dólares para la adquisición de pesticidas. Estos productos generalmente pierden su efectividad después de algunos años de aplicados y la consecuencia es que las plagas y enfermedades desarrollan contra ellos una resistencia que exige un mayor número de aplicaciones con concentraciones cada vez más altas (aumento de potencia tóxica) para el mismo nivel de control.

Los pesticidas de amplio espectro acaban con los enemigos naturales de plagas y enfermedades, además de ser mortales tanto para el hombre como para la fauna. Las aplicaciones desmedidas de los productos residuales en frutales, hortalizas y productos de consumo directo son un grave peligro para el hombre por el envenenamiento paulatino que le ocasiona; provocan en la fauna un desequilibrio en el medio ambiente, ya que son responsables de las disminuciones de las poblaciones de aves, peces y camarones.

La práctica del control biológico ocasionaría una disminución de la dependencia de los pesticidas, cuya utilización incide considerablemente en los montos de divisas que el país destina para la actividad agrícola.

Uno de estos métodos es el "control biológico" de enfermedades como *Alternaria solani*, causante del Tizón Temprano en el cultivo de tomate, susceptible de controlarse con bacterias epífitas que pueden producirse a nivel de laboratorio en el país.

Alternaria solani (Ellis y Martin), origina también el Tizón Temprano en papa y berenjena. El cultivo más perjudicado es el tomate, que puede ser atacado en cualquier fase de su desarrollo. Las plántulas son susceptibles al ahogamiento y a la pudrición del cuello. La base del tallo es circundado por una lesión café que provoca la muerte o el achaparramiento de las plántulas o la marchitez en las plantas jóvenes. Las hojas presentan manchas foliares alargadas, de color marrón y necrótico, con anillos concéntricos. Si varias se reúnen pueden formar áreas necróticas mayores. Las hojas afectadas se secan y caen precozmente causando la muerte prematura de las plantas (Marchionatto, 1984). Para su control se recomienda generalmente la siembra de cultivares resistentes a *Alternaria solani* y la aplicación de fungicidas. Cuando no hay variedades resistentes, el agricultor debe realizar un mayor número de aplicaciones de fungicidas, lo cual disminuye sus ganancias. Se recomienda además labores culturales con el fin de disminuir la cantidad de inóculos que pueda infectar a las nuevas plantas, en especial proceder a :

- No trasplantar plantas enfermas del almácigo al surco
- Rotación de cultivos
- Eliminación y quema de los restos de plantas infectadas
- Eliminar las malas hierbas
- No utilizar semillas procedentes de cosechas contaminadas, (Agrios, 1985).

Una de las alternativas para sustituir los pesticidas en los cultivos es la aplicación de métodos biológicos que mantengan su eficiencia en el control de las enfermedades y plagas, mediante la utilización

de productos biológicos obtenibles en cultivos pequeños a nivel de laboratorio. Además de la ventaja económica, son efectivos y tienen varios aspectos benéficos en términos ecológicos.

Métodos de Control Biológico:

El control o combate biológico de un patógeno es la introducción de un microorganismo antagonista en la superficie vegetal, capaz de multiplicarse y colonizar el filoplano. Se ha preferido utilizar microorganismos residentes en la superficie vegetal que presenten antagonismo al patógeno, por estar totalmente adaptados a sobrevivir y reproducirse en el filoplano. La estrategia de combate es aumentar su número en el ambiente, a tal punto que anule en forma eficaz la acción del patógeno.

Las bacterias han sido los microorganismos más usados en esta estrategia de combate debido a su fácil manejo, a su alta tasa de reproducción in vitro y a que es el primer colonizador del filoplano. La estrategia se ha usado en el combate de:

- *Heterobasidium annosum* mediante aplicación de *Peniophora gigantea* en cortes frescos de pino (Risbeth, 1963).
- *Mycena citricolor* mediante *Trichoderma harzianum* (Vargas, 1984).
- *Agrobacterium tumefaciens* mediante una raza virulenta de la misma bacteria (Cook, 1985).
- *Pseudomonas syringae* que promueve y conduce a daños por heladas mediante *Erwinia herbicola* (Lindow, 1985).
- *Moniliophthora roreri* en cacao, mediante bacterias epifitas en la Zona Atlántica de Costa Rica (Jiménez, 1986).
- *Fusarium culmorum* y *Puccinia recondita* F. sp. *triata*, en trigo con *Erwinia herbicola* (Kempf & Wolf, 1989).

OBJETIVOS

El objetivo general de este estudio es conocer y analizar el control biológico de *Alternaria solani* en el cultivo de tomate, utilizando bacterias epífitas para su combate.

Objetivos específicos:

- Evaluar la capacidad de las bacterias aisladas del filoplano en disminuir la incidencia de la enfermedad.
- Comparar dos momentos de aplicación:
 - a) Aplicación simultánea de bacteria y hongo
 - b) Aplicación de bacterias 24 horas antes de la inoculación artificial del hongo.
- Comparar el comportamiento in vivo de una bacteria no antagónica in vitro contra cuatro bacterias antagónicas.

MATERIALES Y METODOS

La investigación se llevó a cabo en Costa Rica, exactamente en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), que se encuentra ubicado en el Cantón de Turrialba, a 590 mts. s.n.m., con $9^{\circ}52'$ latitud norte, y $83^{\circ}38'$ longitud Oeste. La zona presenta una precipitación pluvial media anual de 2,632 mm. (promedio de 38 años).

Para iniciar el estudio se tomaron de la colección del laboratorio "Manejo Integrado de Plagas", cincuenta (50) cepas bacteriales que fueron aisladas del filoplano de un cultivo de tomate de la Variedad Dina, que sufrió un severo ataque del Tizón Temprano.

Las cepas bacteriales se obtuvieron de hojas situadas a diferentes estratos en la planta, aisladas mediante el proceso de dilución de esporas.

En este estado se tomaron las cepas bacteriales para su reactivación, con lo que se inicia propiamente esta investigación. La reactivación de dichas cepas se efectuó mediante el siguiente proceso: Se rayaron las cepas en YDC (ver anexo #1); y se sometieron a diferentes pruebas de tipo morfológicas y bioquímicas, tales como KOH, Catalaza, Oxidasa, Flourescente (ver anexo #2).

La posición taxonómica de las bacterias se logró determinar con el Manual de Bergey de Nomenclatura y Clasificación (Bucheman, R. Gibbons, 1974).

Una vez reactivadas las bacterias se procedió a evaluar el comportamiento antagónico de las bacterias in vitro.

3.1. Evaluación del antagonismo in vitro:

En un medio de 25 ml. V-8 agar (ver anexo #1), decansando en platos petri, se inocularon por estria al centro, 2 ml. de solución de bacterias a una concentración de 10^7 UCB/ml. (Unidades de Colonias Bacteriales por mililitro); para estudiar su posible comportamiento antagonista. Seguidamente se transfirieron dos discos del hongo *Alternaria solani* a una distancia de 25 mm. cada una del centro del plato. Los discos se obtuvieron con sacabocados de 5 mm. de diámetro, a partir de aislamientos recientes del hongo escogidos en la Finca "La Montaña", en donde se obtuvieron también las cepas bacteriales.

Para lograr el aislamiento del hongo, se lavaron hojas enfermas con agua corriente durante 5 minutos, se sumergieron por un lapso de 30 segundos en Hipoclorito de Sodio al 1%, trozos pequeños tomados de la zona límite del tejido sano y enfermo y se pasaron en agua destilada estéril por un minuto, repitiéndose este último paso por dos veces más. Con una pinza esterilizada a la llama, se tomaron los trozos de tejido y fueron colocados sobre medios de agar al 2% con estreptomycinina (ver anexo #1), para eliminar la contaminación de bacterias; posteriormente el hongo fue trasladado a medios de cultivo de jugo V-8 agar y se colocó en incubadora a 26°C por 15 días.

El efecto antagonista se evaluó por 12 días, midiendo la distancia de separación entre los puntos periféricos más cercanos de los discos del hongo sembrados 24 horas después de la bacteria.

Este crecimiento se comparó con el testigo absoluto cultivado en ausencia de la bacteria. Con base en este parámetro se obtuvo el porcentaje de inhibición para cada cepa bacteriana mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{d}{50} \times 100 =$$

d = distancia (mm) de separación de los discos de crecimiento.

50 = distancia total de separación entre los discos de *Alternaria solani*.

Se hicieron tres repeticiones por aislamiento bacteriano, considerando como bacteria antagonista aquella que inhibiera en un 80-90% del crecimiento micelial del hongo, realizando un análisis de varianza y prueba múltiple de Duncan.

3.2 Evaluación in vivo:

Tratamiento:

Los tratamientos que se evaluaron en las variedades Dina que es medianamente susceptible a *Alternaria solani* y Hayslib que es completamente susceptible al hongo fueron las siguientes:

T1 = Testigo sin aplicación

T2 = Testigo con Daconil

T3 = Inoculación de las bacterias 24 horas antes de la inoculación del hongo

T4 = Inoculación simultánea del hongo y de las bacterias.

Los tratamientos se aplicaron cuando las plantas tenían 45 días de edad, las suspensiones de bacterias utilizadas tuvieron una

concentración de 10^7 UCB/ml. Para las aplicaciones se usó una aspersora manual de presión normal, la aplicación fue dirigida hasta el punto de goteo. La suspensión de esporas del hongo *Alternaria solani* se obtuvo de los aislamientos del hongo desarrollados en medios de cultivo de jugo V-8 agar, durante 15 días. La esporulación fue inducida mediante el método Dhingra, Sinclreis, (1985) que consistió en raspar suavemente la superficie del hongo cultivado en V-8 agar con un portaobjeto estéril cuidando de no dañar la superficie y eliminando todo el micelio del hongo. Posteriormente se tapó el plato con una gasa asegurándola con una liga de hule, colocándolos bajo un chorro suave de agua durante 24 horas, con el objeto de que se lavara todo lo que estuviese adherido al medio de cultivo. Pasadas las 24 horas se eliminó por completo el agua de los platos y se colocaron en forma inclinada durante 48 horas expuestas al medio ambiente.

Después de ese período se cosecharon las esporas del hongo, lavando la superficie del medio con una pipeta con agua, para su colección. La concentración que nos resultó del conteo con un nematocímetro fue de 15,000 esporas por mililitro.

La inoculación del hongo se realizó colocando un disco de papel filtro de 5 mm. de diámetro empapado en la suspensión de esporas del hongo, con una cantidad de esporas de 15 a cada lado, aplicándolas en los dos folíolos terminales de la hoja basal, intermedia y superior. Posteriormente se dejaron todas las plantas bajo una cámara húmeda formada de varias de metal fijadas a la base de la mesa, las cuales sirvieron de soporte a varas de madera colocadas transversalmente a las de metal; sobre este sopor

te se colocó un plástico transparente, de tal forma que todas las macetas quedaron sobre la mesa cubiertas por él. El plástico fue retirado todas las mañanas para permitir aireación y colocado nuevamente por las tardes para seguir provocando humedad elevada, este proceso se repitió durante los cinco días siguientes a la inoculación.

Para analizar estadísticamente los resultados de la prueba de invernadero se empleó el diseño de bloques completos al azar con cuatro tratamientos y cuatro repeticiones; realizándose un análisis de varianza y prueba múltiple de Duncan.

3.3 Supervivencia de la bacteria:

Para el seguimiento de la supervivencia de la bacteria se realizó a los 10 días el lavado a tres hojas (una de cada estrato: alto, medio y bajo de la planta tomada al azar por tratamiento), utilizando una solución salina estéril (NaCl). Para la desinfección en el aislamiento se tomaron asépticamente las hojas y con un sacabocado de 5 mm. de diámetro se obtuvieron 30 discos que se agitaron por 3 minutos con 100 ml. de agua destilada estéril. Con el objeto de determinar la concentración bacteriana, se usó la técnica de dilución y se rayaron en YDC.

3.4 Supervivencia del Hongo:

Se realizó recolección de hojas sometidas a los tratamientos T3 y T4 que presentaron lesiones de *Alternaria solani*, las que se lavaron asépticamente con Hipoclorito de Sodio al 1% durante 3

minutos. Posteriormente se colocaron en cámaras húmedas por un lapso de 48 horas para inducir su esporulación; luego se lavaron con agua destilada estéril para realizar cuatro recuentos de esporas para medir su capacidad de esporulación y realizar un análisis de varianza y diferenciación de medias.

RESULTADOS

Conjuntamente con los especialistas del laboratorio Manejo Integrado de Plagas (MIP), se realizaron pruebas morfológicas y bioquímicas en muestras de cepas bacteriales que mostraron ser *Pseudomonas* fluorescentes en un 30% y un 70% de *Pseudomonas* no fluorescentes. El cuadro #1 muestra las principales características morfológicas.

Evaluación in vitro:

De las 50 cepas aisladas, 14 mostraron algún efecto antagonista a *Alternaria solani*, entre éstas solo 4 fueron consideradas verdaderas antagonistas, debido a que inhibieron el desarrollo del hongo a un nivel superior del 80% en relación al testigo (ver cuadro #2).

Entre las 30 cepas que no mostraron efecto antagónico, se encontraron 6 que presentaron un escaso desarrollo miceliar en la zona de acción de las bacterias. después del lavado del micelio, la concentración de esporas fue muy baja; en cambio en los otros platos el crecimiento fue de un color oscuro verdoso y en el lavado presentó un mayor porcentaje de esporulación, por lo cual encontramos que es altamente significativa la diferencia entre las 50 cepas bacteriales (ver cuadro #3).

Cuadro #1: Características bioquímicas de las bacterias aisladas del filoplano del tomate con Alternariosis.

CEPA	KOH	CATALASA	OXIDASA	FLUORESCENCIA
10	-	+	-	-
8 (9-1-2)	+	+	-	-
12	+	+	+	-
9'	+	+	-	-
22	+	+	-	-
6	+	+	-	-
33	+	+	-	-
1	-	+	-	-
5'	+	+	-	Flourescente
13 (7-1-2)	+	+	-	-
34	+	+	-	Flourescente
4	+	+	-	baja flourescencia
48	+	+	+	
20	+	+	-	-
3'	+	+	-	baja flourescencia
22	+	+	-	
11	+	+	-	-
51'	+	+	+	Alta flourescencia
3	+	+	-	Alta flourescencia
29	+	+	-	-
32	+	+	+	

Cuadro #1: Continuación: Características bioquímicas de las bacterias aisladas del filoplano del tomate con Alternariosis.

CEPA	KOH	CATALASA	OXIDASA	FLUORESCENCIA
5-1-2	+	+	+	-
23	+	+	+	Alta fluorescencia
12	+	+	+	-
19	+	+	+	-
16		-	+	-
2	+	+	+	-
10	+	-	+	-
39	+	+	+	-
46	+	+	+	baja fluorescencia
18	+	-	+	-
35	+	+	+	-
9	+	-	+	-
30	+	-	+	-
29	+	-	+	-
17	+	-	+	baja fluorescencia
3	+	+	+	-
21	+	+	+	baja fluorescencia
2'	+	+	+	-
8	+	-	-	baja fluorescencia
1	No creció en ATS			
5	+	-	+	-

Cuadro #1: Continuación: Características bioquímicas de las bacterias aisladas del filoplano del tomate con **Alternariosis**.

CEPA	KOH	CATALASA	OXIDASA	FLOURESCENCIA
15	+	+	+	-
50	+	+	+	baja flourescencia
25	+	+	+	-
6	+	-	+	-
36	+	-	+	-
14	No creció en ATS			
38	+	+	+	baja flourescencia
7	+	-	+	-
4'	+	-	+	-

Cuadro #2: Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Alternaria solani* por diferentes cepas epífitas.

CEPA	REPETICIONES			PROMEDIO
	1	2	3	
Testigo	0	0	0	0
10	20	16	18	18
8 (9-1-2)	2	2	4	2.66
12	2	0	0	0.66
9'	6	4	8	6
22	0	6	4	3.33
6	0	0	0	0
33	16	18	20	18
1	6	10	10	14.66
5'*	84	80	78	80.66
13 (7-1-2)	18	22	24	21.33
34	70	76	78	74.66
4	24	24	20	22.66
48	8	12	12	10.66
20	2	2	4	2.66
3'	50	56	60	55.33
51'*	80	78	84	80.66
3	60	56	52	38.84
29	56	52	64	36.21
32	64	68	66	44.22

Cuadro #2: Continuación: Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Alternaria solani* por diferentes cepas de bacterias epífitas.

CEPA	REPETICIONES			PROMEDIO
	1	2	3	
15	20	20	24	21.33
50	22	22	22	22
25	40	42	38	40
6	0	0	0	0
8	10	6	4	6.66
36	20	12	18	16.66
38	76	74	72	74
7	20	26	22	22.66
4	20	18	18	6
11**	4	6	8	6

* Son Antagonistas

** No Antagonistas

Cuadro #3: Diferencias entre el comportamiento de las cepas bacteriales

CEPAS	MEDIA	GRUPO DUNCAN
2	43.333	A
51'	40.333	B
5'	40.333	B
34	37.333	C
38	37.000	C
3	36.333	C
2'	36.000	C
32	33.000	D
5-1-2	31.333	D
8	31.000	D
29	28.667	E
3	28.000	F E
3'	27.667	F E
21	26.000	F
50'	20.000	G
17	14.000	H
31	11.667	I
46	11.883	I
7	11.333	J I
4	11.333	J I
10	11.000	J I
15	11.000	J I

Cuadro #3: Continuación: Diferencias entre el comportamiento de las cepas bacteriales.

CEPAS	MEDIA	GRUPO DUNCAN
5	10.667	J I K
13 (7-1-2)	10.667	J I K
11	9.333	J L I K
10	9.000	J L M K
33	9.000	J L M K
8	8.333	N L M K
16	7.667	N L M D
39	7.333	N L M O
12	7.000	N L M O
23	6.667	N P M O
29	6.667	N P M O
30	6.000	N P O
48	5.333	P Q O
1	4.333	R P Q
6	3.333	R Q S
36	3.000	R Q S
9'	3.000	R Q S
9	2.667	R T S
22	1.667	U T S
20	1.333	U T S

Cuadro #3: Continuación: Diferencias entre el comportamiento de las cepas bacteriales.

CEPA	MEDIA	GRUPO DUNCAN
8 (9-1-2)	1.333	U T S
12	0.333	U T
6	0.000	U
46	0.000	U
35	0.000	U
25	0.000	U
Testigo	0.000	U
18	0.000	U

(Cifras con las mismas letras no son significativamente diferentes según Prueba de Duncan al 0.05%).

Evaluación in vivo:

El análisis de varianza evidenció diferencias altamente significativas ($p = 0.0001$) entre los tratamientos en la incidencia del Tizón Temprano.

El tratamiento de mayor efecto fue la aplicación de las cepas 2, 5' y 11; 24 horas antes del inóculo artificial del hongo. Cuando se aplicaron simultáneamente bacteria y hongo, no hubo ninguna respuesta positiva. esto confirma los resultados de Andrews (1985), quien señala que los primeros signos de un efecto antagonista se observan cuando las poblaciones alcanzan de $a \times 10^4$ ó 1×10^5 unidades de colonias bacteriales/ml. en el momento que se va a dar la infección; esto normalmente se logra cuando el antagonista es aplicado algunos días antes que el patógeno. Se puede concluir que los tratamientos son altamente significantes entre las dos variedades. (ver cuadro #4).

Supervivencia de la bacteria:

La fluctuación de la población bacterial osciló entre $1,38 \times 10^9$ hasta 0 unidades de colonias bacteriales (ver cuadro #5).

De lo anterior podemos deducir que en comparación con el testigo, la población bacterial de Daconil es mayor y se aproxima a la cepa bacterial 51' coincidiendo con lo dicho por Hislop (1976), en que la aplicación de químicos en el filoplano puede reducir o fomentar las poblaciones de microorganismos epífitos. (ver cuadro #6).

Asimismo, Blakemann y Fokkema (1982) determinaron que los hongos epífitos son eliminados por fungicidas de amplio espectro tales como ditiocarbamatos, dándose un aumento de bacterias epífitas con gran resistencia hacia estos fungicidas.

Cuadro #4: Resumen de incidencia de la enfermedad *Alternaria solani* para las variables-cultivares por tratamiento.

CEPAS	T ₄		T ₄	
	VARIEDAD		VARIEDAD	
	DINA (+ Resistente)	HAYSLIB (Susceptible)	DINA	HAYSLIB
* 2	10-20-19	16-23-23	0 - 7 - 7	9-20-17
* 5'	12-21-20	13-19-19	0 - 6 - 6	5-22-21
** 11	16-20-19	24-24-24	0 - 11 - 11	2-18-18
* 38	19-24-20	19-22-22	0 - 17 - 17	8-22-21
* 51'	21-24-22	19-23-23	2 - 16 - 16	5-21-22

TESTIGO	VARIEDAD	
	DINA	HAYSLIB
Agua + Hongo	23 - 24 - 23	23 - 19 - 24
Daconil	0 - 0 - 0	0 - 0 - 0

* Cepas bacteriales antagonistas

** Cepas bacteriales no antagonistas

T₃ Inoculación de las cepas bacteriales 24 horas antes de la inoculación del hongo.

T₄ Inoculación simultánea de las cepa bacterial y el hongo.

Cuadro #5: Supervivencia y reproducción de las poblaciones bacteriales en los tratamientos
10 días después de la inoculación artificial.

	HAYSLIB					
	PRIMER MUESTREO			SEGUNDO MUESTREO		
	F/UCB/ml.	NF/UCB/ml.	TOTAL	F/UCB/ml.	NF/UCB/ml	TOTAL
Daconil	1.5×10^9	9.1×10^8	2.41×10^4	4.3×10^5	3×10^4	4×10^5
Testigo + Hongo	1×10^6	1.35×10^8	1.36×10^8	0	9.3×10^4	9.3×10^4
5' Simultáneo	2.87×10^9	2.4×10^7	2.894×10^9	2×10^5	5×10^5	7×10^5
5' un día antes	1.065×10^9	2×10^7	1.065×10^9	2×10^5	2.1×10^6	2.3×10^6
51' Simultáneo	2.9×10^7	2.9×10^7	5.8×10^7	9×10^3	5.1×10^4	6×10^4
51' un día antes	4.9×10^7	1.5×10^7	6.4×10^7	1.38×10^{11}	4.5×10^{10}	1.38×10^9
2 simultáneo	1.6×10^7	6.8×10^8	6.9×10^8	4.7×10^7	1.6×10^8	8.07×10^8
2 un día antes	2.3×10^7	8.9×10^8	9.13×10^8	2.2×10^7	8.6×10^7	1.08×10^8

F : Fluorescente

NF : No Fluorescente

UCB: Unidad Colonias Bacteriales

Cuadro #5: Continuación: Supervivencia y reproducción de las poblaciones bacteriales en los tratamientos 10 días después de la inoculación artificial.

	DINA					
	PRIMER MUESTREO			SEGUNDO MUESTREO		
	F/UCB/ml.	NF/UCB/ml.	TOTAL	F/UCB/ml.	NF/UCB/ml.	TOTAL
Daconil	6.4×10^7	5.6×10^7	1.2×10^8	3×10^5	3.9×10^5	6.9×10^5
Testigo + Hongo	3×10^5	9.6×10^5	1.26×10^6	0	2.63×10^5	2.63×10^5
5' simultáneo	4.7×10^9	2×10^8	4.9×10^9	1.4×10^6	9.5×10^6	1.09×10^7
5' un día antes	9.1×10^{10}	2×10^9	9.3×10^{10}	1.2×10^6	2.2×10^6	3.4×10^6
51' simultáneo	7.8×10^7	1.9×10^7	9.7×10^7	1.1×10^6	1.08×10^7	1.19×10^7
51' un día antes	2.1×10^7	9.1×10^7	1.12×10^8	8.7×10^5	8.2×10^5	1.69×10^6
2 simultáneo	4.3×10^7	7.8×10^8	8.23×10^8	0	1.9×10^6	1.9×10^6
2 un día antes	5.7×10^7	7.25×10^8	7.82×10^8	0	1.24×10^8	1.24×10^8

UCB = Unidades de Colonias Bacteriales/ml.

F = Flourescente

NF = No Flourescente

Cuadro #6: Tratamientos con mayor porcentaje poblacional de bacterias, 10 días después de la inoculación en el segundo muestreo.

CEPA	TRATAMIENTO	VARIEDAD	F/UCB/ml.	NF/UCB/ml.	TOTAL
51'	3	Hayslib	1.38×10^{11}	4.5×10^{10}	1.83×10^{11}
51'	3	Dina	1.2×10^6	2.2×10^6	3.4×10^6
5'	4	Dina	1.4×10^6	9.5×10^6	1.09×10^7
51'	3	Dina	8.8×10^5	8.2×10^5	1.69×10^6
2	3	Dina	0	1.9×10^6	1.9×10^6
2	3	Hayslib	0	1.24×10^8	1.24×10^8
51'	4	Dina	1.11×10^6	1.08×10^7	1.69×10^6
2	4	Hayslib	2.2×10^7	8.6×10^7	1.08×10^8
5'	3	Hayslib	2×10^5	2.1×10^6	2.3×10^6
2'	3	Hayslib	4.7×10^4	7.6×10^5	8.07×10^5

F = Flourescente

NF = No Flourescente

UCB = Unidades de Colonias Bacteriales

Supervivencia del hongo:

En esta metodología se realizó el conteo por cm^2 de la reproducción de las conidias de *Alternaria solani* encontradas en la variedad Dina inoculadas un día antes, obteniendo un porcentaje de esporulación menor en comparación con el testigo y con respecto a la variedad Hayslib (ver cuadro #7).

En el análisis estadístico deducimos que hay una alta significancia en la reproducción de las conidias con respecto a los tratamientos en las dos variedades utilizadas (ver cuadro #8 y #9).

Cuadro #7: Conteo de población de conidias de *Alternaria solani* por tratamiento.

TRATAMIENTOS			CONIDIAS			
CEPA	T	CULTIVAR	I	II	III	IV
2	4	Hayslib	32	44	32	34
5'	4	Hayslib	82	61	75	69
11	4	Hayslib	48	42	44	56
38	4	Hayslib	35	33	33	38
51'	4	Hayslib	29	24	25	30
2	3	Hayslib	26	28	24	27
5	3	Hayslib	27	29	34	34
11	3	Hayslib	14	10	14	12
38	3	Hayslib	35	28	26	25
51'	3	Hayslib	10	12	8	15
Testigo	3	Hayslib	69	46	46	61
2	4	Dina	19	28	21	20
5'	4	Dina	19	20	14	13
11	4	Dina	29	23	24	35
38	4	Dina	25	30	21	19
51'	4	Dina	16	24	25	33

Conidias/ml.

Cuadro #8: Producción de Conidias del Hongo *Alternaria solani* entre los tratamientos.

TRATAMIENTO	\bar{X} DE CONIDIAS/cm ²	GRUPO DUNCAN
Testigo	87.577	A
5' - Tratamiento 3	31.257	B
11 - Tratamiento 3	30.326	B
38 - Tratamiento 3	26.868	C
3 - Tratamiento 3	26.552	C
51' - Tratamiento 3	25.253	D C
2 - Tratamiento 4	24.555	D C E
38 - Tratamiento 4	24.398	D C E
5' - Tratamiento 4	23.468	D E
11 - Tratamiento 4	22.478	E
51' - Tratamiento 4	18.544	F

Cifras con las mismas letras, no son significativamente diferentes.

Cuadro #9: Reproducción de Conidias de *Alternaria solani* por Variedad conforme los tratamientos.

TRATAMIENTO POR CULTIVAR		MEDIAS	GRUPO DUNCAN
Testigo	Dina	138.052	A
5' - T3	Hayslib	42.291	B
Testigo	Hayslib	37.102	C
11 - T3	Hayslib	34.407	C
2 - T3	Hayslib	29.722	D
38 - T3	Hayslib	29.462	E D
5' 6 T4	Hayslib	27.804	E D F
11 - T4	Dina	27.319	E D F
38 - T4	Hayslib	26.383	E G D F
11 - T3	Dina	26.245	E G D F
51' - T3	Hayslib	25.952	E G H F
2 - T4	Hayslib	25.607	G H F
51' - T3	Dina	24.554	G H F
38 - T3	Dina	24.247	G H F
2 - T4	Dina	23.502	I G H
2 - T3	Dina	23.38	I G H
38 - T4	Dina	22.413	I H J
51 - T4	Dina	20.429	I K J
5' - T3	Dina	20.223	I K J
5' - T4	Dina	19.133	L K J
11 - T4	Hayslib	17.637	L K J
51 - T4	Hayslib	16.660	L

DISCUSION

Prueba in vitro:

Los criterios de selección de las cepas bacteriales promisorias, se basaron en el buen crecimiento y la presencia de pigmentos in vitro. Por lo general, las bacterias epífitas presentan pigmentos que actúan como protección contra la radiación, además las bacterias seleccionadas se caracterizan por una alta tasa de reproducción in vitro, lo que facilitaría la producción de la masa bacterial antagonista a usarse en el filoplano de la hoja.

La selección se fundamenta en el principio de Baker y Cook (1974), determinan los posibles antagonistas donde la enfermedad no ocurra o no pueda desarrollarse debido a que las esporas han sido incapaces de germinar por la presencia de algún agente en el filoplano. Esta alternativa se confirmó en cuatro de las 50 cepas bacteriales aisladas, en las que se observó un alto antagonismo in vitro y dos de ellas controlaron eficazmente la enfermedad a nivel de invernadero.

Resultados de diferentes investigaciones en el campo del combate biológico de patógenos del suelo Baker y Cook (1974) y de órganos aéreos, Andrewus (1985); Fokkema (1976), han mostrado que no hay relación significativa entre antagonismo in vitro y efectividad en el campo. Frecuentemente organismos con antagonismos en platos de agar, no controlan si son aplicados en las plantas y algunas veces se comportan como efectivos controladores en el campo y no presentan propiedades inhibitorias in vitro, Fokkema, Houter, Kosterman, Nelis (1979).

Con *Alternaria solani*, los resultados mostraron que especies bacteriales con alto antagonismo in vitro fueron menos efectivo en el invernadero.

dero y una cepa sin ningún comportamiento antagonista in vitro fue una de las mejores en el mismo invernadero. Dado este comportamiento y el hecho de que no se probó la eficiencia de las bacterias que no mostraron antagonismo in vitro, es necesario estudiarlas en las pruebas in vivo antes de descartarlas. Sin olvidar que las pruebas de antagonismos sobre superficies vegetales en condiciones controladas, son las "pruebas maestras" en la selección de agentes antagonistas, Andrews (1985; Fokkema (1976).

Evaluación in vivo:

La estrategia de usar bacterias epífitas podría ser exitosa como lo demuestra la efectividad de la cepa 2, 5' y 11 y concuerda con las conclusiones de Bravo y Victoria (1981) en cacao, que las bacterias son efectivas para el control de algunas enfermedades y la efectividad del combate biológico se puede explicar con base a dos factores: a) los rasgos del agente biológico y b) el microambiente de la hoja del cultivo. Las bacterias aisladas presentan gran capacidad de adaptación en los primeros estadios del desarrollo de la hoja; en donde posiblemente los microorganismos epífitos competidores fueron escasos y la aplicación bacterial permitió que la bacteria colonizara y ocupara en altas concentraciones el filoplano, durante la época crítica para el hongo del Tizón Temprano; lo cual se muestra en la reducción significativa de la incidencia del Tizón Temprano en los tratamientos biológicos efectuados.

Se confirma la mayor efectividad del tratamiento aplicado 24 horas antes de la inoculación del hongo, en comparación con las inoculaciones

simultánea. Posiblemente el período de avance de las bacterias en el filoplano de la hoja fue corto en la inoculación simultánea, lo que produjo que las bacterias no colonizaran en la cantidad necesaria para prevenir la germinación y penetración de las conidias de *Alternaria solani*. El tratamiento tres aplicado 24 horas antes de la inoculación del hongo, se comportó en forma similar al tratamiento químico.

Supervivencia de la bacteria:

Los tratamientos presentaron mayor porcentaje de población bacteriana en el segundo muestreo, a la vez observamos que el comportamiento fue muy variable en los dos cultivares, ya que Hayslib alcanzó el mayor crecimiento bacteriano con el tratamiento tres en la cepa 51'.

Según los resultados logrados en esta investigación, se puede considerar posible colonizar el filoplano de la hoja de tomate en el período crítico del ataque de *Alternaria solani*. Esta es la razón del porque la bacteria logró controlar la incidencia de la enfermedad.

Supervivencia del hongo:

La producción de conidias mostró que comparado con el testigo hubo inhibición en el tratamiento de inoculación simultánea del hongo con la bacteria. La población de conidias fue reducida con los tratamientos de bacterias aplicados 24 horas antes de la inoculación del hongo. Posteriormente se observó que hubo variabilidad en los dos cultivares, ya que Hayslib cuya característica es ser altamente susceptible, presentó al momento del conteo en la cepa 51' un menor número poblacional de conidias.

Se concluye que para implementar el combate biológico es necesario primero confirmar los resultados de este ensayo en los diferentes cultivares, ya que no se puede aplicar a todas las otras variedades por las diferencias de comportamiento que observamos.

CONCLUSIONES

1. En los primeros 45 días del desarrollo de la planta de tomate, el filoplano está colonizado principalmente por bacterias.
2. De cincuenta aislamientos obtenidos, solo dos cepas (2 y 5') presentaron un alto antagonismo a nivel de laboratorio e invernadero.
3. Las bacterias por su capacidad de adaptación, son microorganismos aptos para el combate biológico de *Alternaria solani*.
4. Las cepas (2, 5', 38, 51, 11) asperjadas 24 horas antes de la inoculación artificial del hongo, disminuyen la incidencia de *Alternaria solani*.
5. Para tener un control biológico sobre *Alternaria solani*, es necesario que el ataque biológico se establezca en el filoplano antes de los primeros síntomas de la enfermedad y con concentraciones de 10^7 UCB/ml.
6. La fluctuación poblacional de las conidias de *Alternaria solani* sobre la superficie de la hoja, se relaciona positivamente con la acción de las bacterias epífitas.

RECOMENDACIONES

1. Seguir seleccionando cepas bacteriales epífitas, antagonistas a *Alternaria solani*, tratando de seleccionar las que tengan propiedades antagonistas como las cepas 2, 5 y 11.
2. Buscar diferentes metodologías de selección de antagonistas.
3. Estudiar su comportamiento en las diferentes variedades.
4. Implementar este estudio de tratamientos biológicos en Nicaragua.

AGRADECIMIENTO

Deseo dejar constancia de mi agradecimiento a las siguientes personas:

- Al Dr. **Elkin Bustamante**, Profesor Consejero; por la orientación en el desarrollo y revisión del trabajo de tesis.
- Al Dr. **Enrique Torrez**, por su desinteresada ayuda y la revisión crítica del manuscrito.
- Al Msc. **José Martí Jiménez**, por su desinteresado apoyo para la realización de esta investigación.
- A la Dra. **Charmian Acevedo**, por sus observaciones y consejos para mejorar la calidad y presentación de esta Tesis.
- A los Señores **Arturo Gamboa** y **Walter Bermúdez**, por la invaluable ayuda que me brindaron en el desarrollo de esta actividad.
- A mi amiga Sra. **Rosa Palma**, por todo su apoyo y demostración de amistad.

BIBLIOGRAFIA

1. Agrios, J.D.; 1985. *Introducción a la Fitopatología* Ed. Limusa México, p.33-40
2. Andrews, J.H.; 1985. Strategies for selecting antagonistic microorganism from the Phylloplane. In biological control on the phylloplane. Ed. by C.E. Windels, S.E. Lindow. St. Paul, Mn., A.P.S. p. 31-44.
3. Baker, K.F.; Cook, R.J. 1974. *Biological Control of plant pathogens.* San Francisco, Calif. Freeman. 433p.
4. Blakeman, Fokkema, N.J. 1986. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annual Review of phytopathology.* (EE.UU.). 20: 167-192.
5. Bravo, N; Victoria, J. 1981. Posibilidades del Control biológico de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Evans) del cacao *Actas Agronómicas* (Col. 31 (1/4): 133-141.
6. Cook, R.J. 1985. Biological control of plant pathogens: Theory to application. *Phytopathology* (EE.UU.) 71 (1): 25-29
7. Dhingra, C.; Sinciar, B.; 1985. An impression method for examining epiphytic microorganism and its applications to phylloplane studies. *Transactions of the British Mycological Society* (G.B.). 63: 616-19.
8. Fokkema, N.J., 1976. Antagonism between fungal saprophytes and pathogens on aerial plant surfaces. In *Microbiology of aerial plant surfaces* New York. Academic Press. p. 487-506.
9. Fokkema, N.J.; Den Houter, J.G.; Kosterman, S.; Lelis, A.L. 1979. Manipulation of yeast on field grown wheat leaves and their antagonistic effect on *Cochliobolus sativas* and *Sepatria nodorum*. *Transaction of the British Mycological Society* (G.B.). 72: 19-29.
10. Hislop, E.C. 1976. Some effects of fungicides and other Agrochemicals on the microbiology of the aerial surfaces of plants. In *Microbiology of aerial plant surfaces.* Ed. by C.H., Dickinson, T.F.; Preece. New York, Academic Press. p.41.
11. Jiménez, J.M. 1986. Combate Biológico de la Moniliasis del Cacao (*Theobroma cacao*) causada por el hongo *Moniliophthora roreri* (Cif. & Par.) Evans. et. al., mediante bacterias epifitas en la Zona Atlántica de Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 103 p.

12. Lindow, S.E.; 1985. Integrated and role of antibiosis in biological control of fireblight and frost injuri. In biological control on the phylloplane. Ed. by. C.E. Windels; S.E. Lindow St. Paul, Mn. APS. p. 83-115.
13. Marchionatto, E.D. 1984. Biological control of plant phatogens San Francisco, Calif. Freeman, 433 p.
14. Risbeth, J. 1963. Stum Protection against fomes annosus. 3. Annals of applied biology (G.B.). 52: 63-67.
15. Vargas, E. 1984. Interacción del tratamiento biológico y químico en el combate de ojo de gallo (*Mycena citricolor*) en el Cafeto. Agronomía Costarricense. (C.R.).

ANEXO I

Medios Usados:

1. Agar nutriente al 2%

Agar 20 gr.

Streptomycin 50 mg.

Agua destilada 1000 ml.

2. Yeast Extract - (YDC)

Yeast Extract 10 gr.

CaCO_3 20 gr.

Agar 15 gr.

Agua destilada 1000 ml.

3. B. de King (para la fluorescencia)

Proteosa Peptona 20 gr.

Glicerina 10 ml.

K_2HPO_4 1.5 gr.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.5 gr.

Agar Agar 15 gr.

Agua destilada 1000 ml.

Ajustar el Ph 7.4 para un final de 7.2

4. V-8 agar

Jugo V-8 200 cc

CaCO_3 3 gr.

Agar 18 gr.

Agua destilada 1000 ml.

ANEXO 2

Pruebas Usadas:

1. Prueba de Oxidasa (BC)

Esta prueba nos fue útil para diferenciar las *Pseudomonas* de otros bacilos gram-negativo.

Reactivo: Solución de Clorhidrato de Tetrametil-p-fenilendiamina al 1% en agua.

Método: Se añadieron unas gotas del reactivo a un trozo de papel filtro, de un plato petri, con un asa de platino se toma una porción del cultivo bacteriano y se extiende sobre el papel filtro impregnado.

Resultado: En los cultivos oxidasa-positivo, apareció a los 5 - 10 segundos, una coloración púrpura; cuando la reacción positiva es retardada se manifiesta a los 10-60 segundos.

2. Prueba de la Catalasa (BC)

La mayoría de los organismos que crecen en placas incubadas aeróbicamente, poseen la enzima catalasa.

Reactivo: Agua oxigenada (concentrada de 10 volúmenes ó al 10 %).

Método: Se emulsiona un área con cultivo en un portaobjeto y se le agrega una gota de agua oxigenada.

Resultado: La efervescencia causada por la liberación de oxígeno libre en forma de burbujas de gas; indica la presencia de catalasa en el cultivo estudiado.