

Aislamiento de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en un sistema rotación (arroz- caña de azúcar) con capacidad biocontroladora de *Fusarium* spp., en el cultivo de caña de azúcar, en Cañas, Guanacaste.

Wendy Patricia Gómez Mata

Tesis para optar al grado profesional de Ingeniera Agrónoma con el grado de Licenciada en Agronomía

Universidad de Costa Rica

Sede Guanacaste

Carrera de Agronomía

2018

Hoja de aprobación

Este trabajo final de graduación fue aceptado por el Tribunal Examinador de la Escuela de Agronomía de la Universidad de Costa Rica, como requisito para optar por al grado profesional de Ingeniera Agrónoma con el grado de Licenciada en Agronomía.

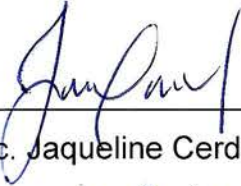
Aislamiento de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en un sistema rotación (arroz-caña de azúcar) con capacidad biocontroladora de *Fusarium* spp., en el cultivo de caña de azúcar, en Cañas, Guanacaste.

Wendy Patricia Gómez Mata.



M.Sc. Oscar Acuña Navarro.

DIRECTOR DE TESIS



M. Sc. Jacqueline Cerdas Solano.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



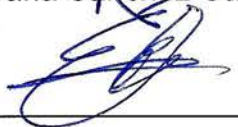
M. Sc. Jose Molina Palacios.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Licda. Ileana Sánchez Cabalceta.

MIEMBRO DEL TRIBUNAL



Lic. Edgar Vidal Vega Villalobos.

COORDINADOR DE CARRERA



Ing. Wendy Patricia Gómez Mata.

SUSTENTANTE

Dedicatoria

A Dios, por toda la fuerza y la capacidad que me dio el día que empecé a existir en este mundo.

A mi madre, Yorley, que siempre la observe logrando sus éxitos académicos que me forjaron a ser quien soy.

A mi Padre, Edwin, que siempre me demostró que el trabajo y las ganas de superación siempre deben de ser el motor de la vida.

A mis hermanas, Katia y Andrea, que me han apoyado en las más increíbles travesuras...

A Carlitos, por su amor, soporte, ayuda y comprensión.

Agradecimientos

Doy gracias a Dios por la salud, la voluntad, la fuerza y la dedicación que pude proyectar en esta investigación.

Al M. Sc José Molina Palacios, por creer en mí desde el primer momento, además de su consejo y enseñanza que me ha dado.

Al M. Sc Gabriel Hernández por el valioso apoyo que me ha brindado.

Al profe Osquitar, que me enseñó todo lo que sé...

A Yorya, Irma, y mis cuñados que me han adoptado en esta otra familia que tengo.

A los colaboradores del área agrícola de Ingenio Taboga, que de alguna u otra manera han contribuido con su valioso esfuerzo en pruebas de campo y otras actividades.

A todos les agradezco, esto, el resultado de muchos años de estudio, pero más que eso, es el sueño de mi vida, la ciencia, la investigación y el biocontrol de plagas y enfermedades agrícolas.

Índice general

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO II: OBJETIVOS	3
1.1 Objetivo General	3
1.2 Objetivos específicos	3
CAPÍTULO III: ANTECEDENTES	3
1.1 Características del sistema rotacional arroz-caña de azúcar	3
1.2 Generalidades del cultivo de caña de azúcar.....	4
1.2.1 Origen.....	4
1.2.2 Taxonomía de la caña de azúcar.....	4
1.2.3 Morfología de la caña de azúcar.....	5
1.3 Caña de azúcar en el mundo	10
1.4 Caña de azúcar en Costa Rica	11
1.5 Patógenos	11
1.6 <i>Fusarium</i> spp.	12
1.6.1 Ecología.....	13
1.6.2 Morfología de <i>Fusarium</i> spp.	14
1.6.3 Síntomas de <i>Fusarium</i> spp. en caña de azúcar	15
1.7 <i>Trichoderma</i> spp.	16
1.7.1 Características de <i>Trichoderma</i> spp.	17
1.7.2 Taxonomía de <i>Trichoderma</i> spp.	17
1.7.3 Morfología de <i>Trichoderma</i> spp.	18
1.7.4 Modo de acción de <i>Trichoderma</i> spp.....	18
1.7.5 Capacidad antagonista y colonizador de raíces	19

1.7.6	Competencia.....	19
1.7.7	Microparasitismo.....	19
1.7.8	Antibiosis	20
CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS		21
1.1	Etapa experimental I: Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp., en medio de cultivo.....	21
1.1.1	Ubicación.....	21
1.1.2	Muestreo de suelo	21
1.1.3	Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp.	23
1.1.4	Identificación.....	25
1.2	Etapa experimental II: Recuperación de <i>Fusarium</i> spp., en medio de cultivo.....	25
1.2.1	Ubicación.....	25
1.2.2	Muestreo de material vegetal.....	25
1.2.3	Aislamiento de <i>Fusarium</i> spp.....	26
1.2.4	Identificación.....	27
1.3	Etapa experimental III: Prueba de patogenicidad.....	27
1.3.1	Ubicación.....	27
1.3.2	Siembra de plantas.....	27
1.3.3	Infección de plantas.....	28
1.3.4	Observación de síntomas	28
1.3.5	Recuperación del patógeno.....	28
1.3.6	Identificación del agente causal.....	29
1.4	Etapa experimental IV: Prueba de antagonismo <i>in vitro</i>	29

1.4.1	Ubicación	29
1.4.2	Inoculación	29
1.4.3	Crecimiento	29
1.4.4	Evaluación	30
1.5	Etapa experimental V: Prueba de campo.....	30
1.5.1	Ubicación.....	30
1.5.2	Manejo agronómico	31
1.5.3	Diseño experimental.....	31
1.5.4	Reproducción de <i>Trichoderma</i>	31
1.5.5	Evaluación	33
CAPÍTULO V: RESULTADOS.....		34
1.1	Etapa experimental I: Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp., en medio de cultivo.....	34
1.2	Etapa experimental II: Recuperación de <i>Fusarium</i> spp., en medio de cultivo.....	38
1.3	Etapa experimental III: Prueba de Patogenicidad	39
1.4	Etapa experimental IV: Prueba de antagonismo <i>in vitro</i>	43
1.5	Etapa experimental V: Prueba de campo.....	46
CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN		48
1.1	Etapa experimental I: Aislamiento de <i>Trichoderma</i> spp., en medio de cultivo.....	48
1.2	Etapa experimental II: Recuperación de <i>Fusarium</i> spp., en medio de cultivo.....	49
1.3	Etapa experimental III: Prueba de patogenicidad.....	50
1.4	Etapa experimental IV: Prueba de antagonismo <i>in vitro</i>	52

1.5 Etapa experimental V: Prueba de campo.....	53
CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES	56
CAPÍTULO VIII: RECOMENDACIONES	57
LITERATURA CITADA.....	58
ANEXOS	65
ANEXO I.....	66
ANEXO II.....	67
ANEXO III.....	68

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la caña de azúcar (Díaz y Portocarrero 2002).....	5
Cuadro 2. Clasificación taxonómica del hongo <i>Trichoderma</i> spp., (Infante <i>et al.</i> 2009).....	17
Cuadro 3. Sitios de muestreo para la selección de <i>Trichoderma</i> spp., nativo en un sistema rotacional de arroz-caña de azúcar, Ingenio Taboga.....	22
Cuadro 4. Características de suelo de lotes muestreados en Ingenio Taboga.....	22
Cuadro 5. Escala para la evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antagonista del hongo <i>Trichoderma</i> spp., (Guigón y González 2004).....	30
Cuadro 6. Descripción de la escala de evaluación para el Pokkah Boeng de la caña de azúcar (Chavarría 2006).....	34
Cuadro 7. Resultados de muestreo de suelo para la obtención de <i>Trichoderma</i> spp.	35
Cuadro 8. Resultados de la identificación molecular mediante análisis de PCR de cepas aisladas de <i>Trichoderma</i> spp., provenientes de plantaciones comerciales bajo un sistema de rotación arroz-caña de azúcar de Ingenio Taboga.....	36
Cuadro 9. Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad antagonista de <i>Trichoderma</i> spp., según la escala de (Guigón y González 2004).....	46

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Sistema radical de la caña de azúcar (López 2015).....	6
Figura 2. Tallos de caña de azúcar y su diferenciación (López 2015).....	7
Figura 3. Nudo y entrenudo de la caña de azúcar (López 2015).....	8
Figura 4. Hoja de caña de azúcar (López 2015).....	9
Figura 5. Flor de la caña de azúcar (López 2015).....	10
Figura 6. Morfología de <i>Fusarium</i> spp.1A: Macroconidios de <i>Fusarium</i> spp., en aumento inmersión (100x). 1B: Cultivo de <i>Fusarium proliferatum</i> en agar PDA. 1C: Cultivo de <i>Fusarium proliferatum</i> en agar Sabouraud (Tapia y Amaro 2014).	15
Figura 7. Síntomas característicos de la enfermedad de Pokkah Boeng observados plantas de caña de azúcar enfermas. (A) Rayas rojas y clorosis. (B) Podredumbre del tallo. (C) Cuchillo cortado y parte superior deformada (Hilton <i>et al.</i> 2017).	16
Figura 8. Conidios y conidióforos de <i>Trichoderma</i> spp., vista en objetivo (400 X) (Infante <i>et al.</i> 2009).	18
Figura 9. Preparación de muestras de suelo para la inoculación, CIA (Elaboración propia).	24
Figura 10. Cepas de <i>Trichoderma</i> spp., aisladas de plantaciones comerciales bajo un sistema de rotación arroz-caña de azúcar en Ingenio Taboga. A. Cepa ITL211, B. Cepa ITE1434, C. Cepa ITM2324, D. Cepa ITE1435, E. Cepa ITM2325 (Elaboración propia).	37
Figura 11. Plantas caña de azúcar muestreadas con síntomas de Pokkah Boeng (Elaboración propia).	38
Figura 12. Cepa aislada de <i>Fusarium sacchari</i> en PDA, proveniente de plantas de caña de azúcar con síntomas de Pokkah Boeng en Ingenio Taboga. (Elaboración propia).	39

Figura 13. (A, B, C): Plantas de caña de azúcar (BC001220) antes de la inoculación de <i>Fusarium sacchari</i> en Ingenio Taboga (Elaboración propia).	40
Figura 14. (A, B, C): Plantas de caña de azúcar (BC001220) después de la inoculación de <i>Fusarium sacchari</i> en Ingenio Taboga (Elaboración propia).	41
Figura 15. Signos presentados en plantas de caña de azúcar después de la inoculación con <i>Fusarium sacchari</i> . (A): Coloraciones rojizas y café oscuro situadas en los entrenudos. (B, C): Presencia de crecimiento de tejido micelial en la base del tallo (Elaboración propia).	42
Figura 16. Reaislamientos de <i>Fusarium sacchari</i> provenientes de tejidos de caña de azúcar con síntomas de Pokkah Boeng. (A): Reaislamiento de raíces de caña de azúcar. (B): Reaislamiento de tallos de caña de azúcar, Ingenio Taboga (Elaboración propia).	43
Figura 17. Prueba de antagonismo <i>in vitro</i> de correspondiente a cada cepa de <i>Trichoderma spp.</i> , versus <i>Fusarium sacchari</i> , en comparación con el testigo y el biocontrolador, CIA (Elaboración propia).	44
Figura 18. Porcentaje de inhibición de <i>Trichoderma spp.</i> , versus <i>Fusarium sacchari</i> bajo condiciones <i>in vitro</i> en modalidad de prueba dual, CIA (Elaboración propia).	45
Figura 19. Incidencia promedio de síntomas de Pokkah Boeng en plantas de caña de azúcar en Ingenio Taboga (Elaboración propia).....	47
Figura 20. Grado de severidad para los síntomas de Pokkah Boeng en plantas de caña de azúcar en Ingenio Taboga (Elaboración propia).	47

RESUMEN

Se realizaron aislamientos nativos de *Trichoderma* spp., donde se recuperaron cinco cepas de dos especies diferentes, *Trichoderma virens* y *Trichoderma asperellum*. Posteriormente, se realizaron aislamientos para la obtención del agente causal de la enfermedad Pokkah Boeng, donde se obtuvo una cepa de *Fusarium sacchari*. Se realizó una prueba de patogenicidad, donde se comprobó *Fusarium sacchari* es el agente causal de la enfermedad Pokkah Boeng.

Se estudió la capacidad de biocontrol de las cepas nativas de *Trichoderma* spp., versus *Fusarium sacchari*, para ello se realizaron pruebas de antagonismo *in vitro*, en donde se determinó que todas las cepas de *Trichoderma* spp., demostraron entre un 65 a un 80 % de inhibición contra el patógeno *Fusarium sacchari*.

Se evaluó la capacidad de antagonismo en campo, para ello se realizó un ensayo con 6 tratamientos incluyendo un testigo absoluto, en donde se reportó diferencias significativas entre los tratamientos estudiados versus el testigo absoluto, concluyendo así que la aplicación de *Trichoderma* spp., nativos representa una eficiente oportunidad de control biológico contra la enfermedad de Pokkah Boeng, disminuyendo la incidencia y la severidad de los síntomas.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN

La producción de caña de azúcar en Costa Rica se remonta desde la época colonial mediante la elaboración de dulce, azúcar y alcohol, sin embargo, hasta el siglo XIX que esta actividad se industrializó con la construcción de ingenios, utilización de maquinaria y desarrollo de tecnologías (León y Arrollo 2010).

La siembra y desarrollo de la caña de azúcar como cultivo en la Región Chorotega representa una de las principales actividades económicas, debido a que hay aproximadamente 3.600 productores de caña de azúcar, con un área de 30.527 ha sembradas, en las cuales se reportan rendimientos de 80 T.ha⁻¹ (Ministerio de Agricultura y Ganadería 2007) ^a. La importancia económica que representa esta actividad económica en Guanacaste ha impulsado la investigación en diferentes temas. Un estudio realizado por Angulo *et al.* (1999), evidenció que los altos costos de producción e insumos limita las posibilidades de manejo agronómico y operacional, aunado a esto se le suma problemas de fertilidad de suelos, vida comercial de plantaciones muy corta y la presencia de enfermedades problemáticas, siendo esta última una amenaza significativa para las plantaciones de caña de azúcar, dada la homogeneidad del cultivo, ciclo de vida, arquitectura de la planta entre otros factores.

Una de las enfermedades de mayor impacto económico en la producción de la caña de azúcar es *Fusarium* spp., debido a que es uno de los principales patógenos fúngicos que ataca diferentes cultivos. En la actualidad se registran 31 especies del género en cultivos como el café, caña de azúcar, tabaco y papa (López *et al.* 2004). Un estudio realizado en México reporta la presencia de dos grupos de hongos de los géneros *Pythium* y *Fusarium* en plantas de caña de azúcar, que tienen a producir una disminución en el crecimiento de las plantas y poco desarrollo en las raíces de caña de azúcar (Martínez *et al.* 2015).

Una de las herramientas que se han implementado para solventar las limitantes de producción de la caña de azúcar es la biofertilización ya que se ha demostrado que aumenta la fertilidad del suelo, mediante el uso de

microorganismos benéficos. Estos tienen la capacidad de transformar elementos nutricionales a su forma disponible, mejorar la absorción de nitrógeno, la síntesis de fitohormonas, la solubilización de minerales y de quelatos de hierro. Mejoran la microbiota del suelo y crean antagonismo, competencia, generación de enzimas y metabolitos secundarios contra patógenos del suelo (Serna-Cock *et al.*2011).

El hongo *Trichoderma* spp., es el microorganismo más utilizado en la biofertilización de cultivos. Este promueve el crecimiento vegetal de las plantas, mediante la descomposición de materia orgánica se liberan nutrientes en forma disponible para la planta y se solubilizan fosfatos (Cubillos *et al.*2009).

Diferentes especies de *Trichoderma* spp., incrementan el crecimiento radical y el desarrollo de las plantas mediante la competencia por nutrientes o espacio, por ende, se desarrolla tolerancia al estrés (Guigón y González 2004). El *Trichoderma* spp., promueve el crecimiento y el desarrollo produciendo metabolitos que estimulan los procesos de desarrollo vegetal (Cubillos *et al.*2009).

Asimismo, *Trichoderma* spp., es un agente biocontrolador debido a la elevada tasa de crecimiento, y la producción de metabolitos secundarios. Una de las interacciones que ejerce es el microparasitismo, competencia, y antagonismo con algunos hongos fitopatógenos de los géneros *Fusarium*, *Botrytis*, *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Alternaria*, entre otros (Perniola *et al.*2014, Infante *et al.*2009). Este último, actúa mediante la actividad lítica que se da sobre las paredes celulares del patógeno, ejerciendo la actividad enzimática de 1,3- β -glucanasa y quitinasa, causando la supresión del hongo (Perniola *et al.*2014).

Sin embargo, la utilización de productos comerciales de *Trichoderma* spp., ha presentado dificultades con la persistencia en el suelo debido a la genética del microorganismo, factores abióticos y otros propios de las especies fitopatógenas adaptadas a lugar (Guigón y González 2004). Posteriormente, la aplicación en el campo puede ser inefectiva por las condiciones *in situ* (textura, humedad, pH y salinidad del suelo, macro y microbiota presente, entre otros) y la interacción con los factores externos como la metodología de aplicación o el manejo en bodega. Por lo tanto, este estudio pretende seleccionar organismos nativos mejor

adaptados a las condiciones climáticas y edáficas, en un agroecosistema de rotación arroz-caña de azúcar y evaluar su efecto biocontrolador de *Fusarium* spp., y de promotor de crecimiento en plantas de caña-soca en la localidad de Bebedero, Cañas, Guanacaste.

CAPÍTULO II: OBJETIVOS

1.1 Objetivo General

- Evaluar el efecto biocontrolador de *Trichoderma* spp., sobre el patógeno *Fusarium* sp., mediante el aislamiento de cepas nativas en un sistema de rotación arroz-caña de azúcar, en la localidad de Cañas, Guanacaste.

1.2 Objetivos específicos

- Aislar cepas nativas de *Trichoderma* spp., y *Fusarium* spp., en un sistema de rotación arroz-caña de azúcar.
- Comprobar la patogenicidad de *Fusarium* spp., en plantas de caña de azúcar como agente causal de la enfermedad de Pokkah Boeng.
- Determinar la capacidad antagónica de las cepas nativas de *Trichoderma* spp., contra el patógeno *Fusarium* spp., nativo en condiciones de laboratorio.
- Evaluar el efecto biocontrolador de *Trichoderma* spp., nativo contra el patógeno *Fusarium* spp., sobre la incidencia y severidad de síntomas de Pokkah Boeng en plantas de caña de azúcar en condiciones de campo.

CAPÍTULO III: ANTECEDENTES

1.1 Características del sistema rotacional arroz-caña de azúcar

Un estudio realizado por Barrantes y Molina (2007) en Ingenio Taboga, determinó los cambios físicos, químicos y microbiológicos causados por la rotación arroz-caña de azúcar en un suelo Typic haplustert. El sistema de rotacional que se emplea en la Región Chorotega consiste en el establecimiento de una plantación

de arroz inundado durante cuatro ciclos consecutivos (2 años), posteriormente se rota con caña de azúcar durante cinco ciclos consecutivos (5 años). Lo que aumenta el potencial productivo de la caña de azúcar, sin embargo, después del segundo año, los rendimientos tienden a decaer y es hasta el quinto año que se establece de nuevo la rotación con arroz. Este estudio concluyó que, durante el establecimiento del cultivo de arroz, algunos patógenos como *Fusarium* spp., aparecen únicamente en el primer ciclo de producción y posteriormente desaparece, mientras que microorganismos del género *Penicillium* se mantienen durante todos los ciclos de producción. Asimismo, la presencia de *Fusarium* spp., en el cultivo de caña de azúcar aparece en el tercer ciclo, aproximadamente. Por su parte, *Penicillium*, tiende a desaparecer durante el primer ciclo del cultivo. Sin embargo, en los primeros ciclos de caña de azúcar se evidenció la presencia de *Trichoderma* y *Gliocladium*, lo cual coincide con los mayores rendimientos y raíces sanas. También, se reportó que el mayor deterioro del sistema radical se dio en los estados medios y altos de los ciclos de producción.

1.2 Generalidades del cultivo de caña de azúcar

1.2.1 Origen

Se registra que la caña de azúcar es proveniente de las regiones subtropicales y tropicales del sudeste asiático. Esta fue distribuida por Alejandro Magno a lo largo de la India hasta Persia, mientras que los árabes la introdujeron a Siria, Palestina, Arabia y Egipto, donde se terminó de extender por África y Europa. En el siglo XV Cristóbal Colón la llevó a toda América Tropical y Subtropical (Díaz y Portocarrero 2002).

1.2.2 Taxonomía de la caña de azúcar

En el Cuadro 1, se observa la clasificación taxonómica de la caña de azúcar descrita por Díaz y Portocarrero (2002).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de la caña de azúcar (Díaz y Portocarrero 2002).

Reino	Vegetal
División	Magnoliophyta
Clase	Angiospermae
Subclase	Monocotyledoneae
Súper Orden	Commelinidae
Orden	Commelinales
Familia	Poaceae
Género	<i>Saccharum</i>
Especie	<i>officinarum</i> L.

1.2.3 Morfología de la caña de azúcar

El cultivo de caña de azúcar se caracteriza por ser un pasto gigante. En su tallo acumula una sustancia rica en sacarosa, el cual se extrae y mediante un proceso químico se forma el azúcar de mesa. Durante la fotosíntesis se sintetiza la sacarosa en los tallos, de esta se obtienen varios subproductos como energía eléctrica, alcohol y abonos orgánicos (Díaz y Portocarrero 2002).

A continuación, se describe algunas de las principales características morfológicas de los órganos de una planta de caña de azúcar según lo reportado por López (2015):

Sistema radical: Se compone básicamente por raíces primordiales y permanentes. La primera corresponde a las raíces que emergen de la primera estaca sembrada o inicial, estas pueden ser ramificadas y su tiempo de vida es corto. Las raíces

permanentes son las que surgen de los nudos, son gruesas y crecen rápidamente (Figura 1).

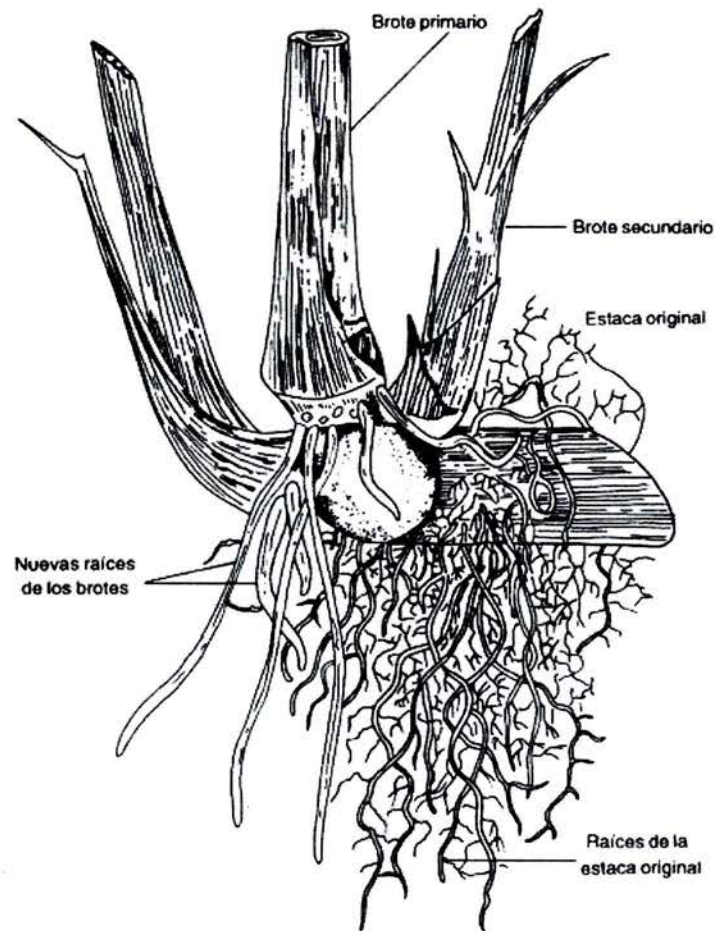


Figura 1. Sistema radical de la caña de azúcar (López 2015).

Tallo: Este es el órgano de mayor importancia de la planta de caña de azúcar debido a que en esta parte se acumulan los azúcares (sacarosa, glucosa, fructuosa). El grosor, cantidad color dependen de las características varietales. El crecimiento y desarrollo de los tallos son fuertemente afectados por las condiciones ambientales y el manejo agronómico. Las plantas de caña de azúcar desarrollan tallos primarios, secundarios y terciarios, el tallo se compone por nudos y entrenudos que se desarrollan longitudinalmente, en la parte basal del nudo se encuentra una yema lateral y la cicatriz foliar (Figura 2).

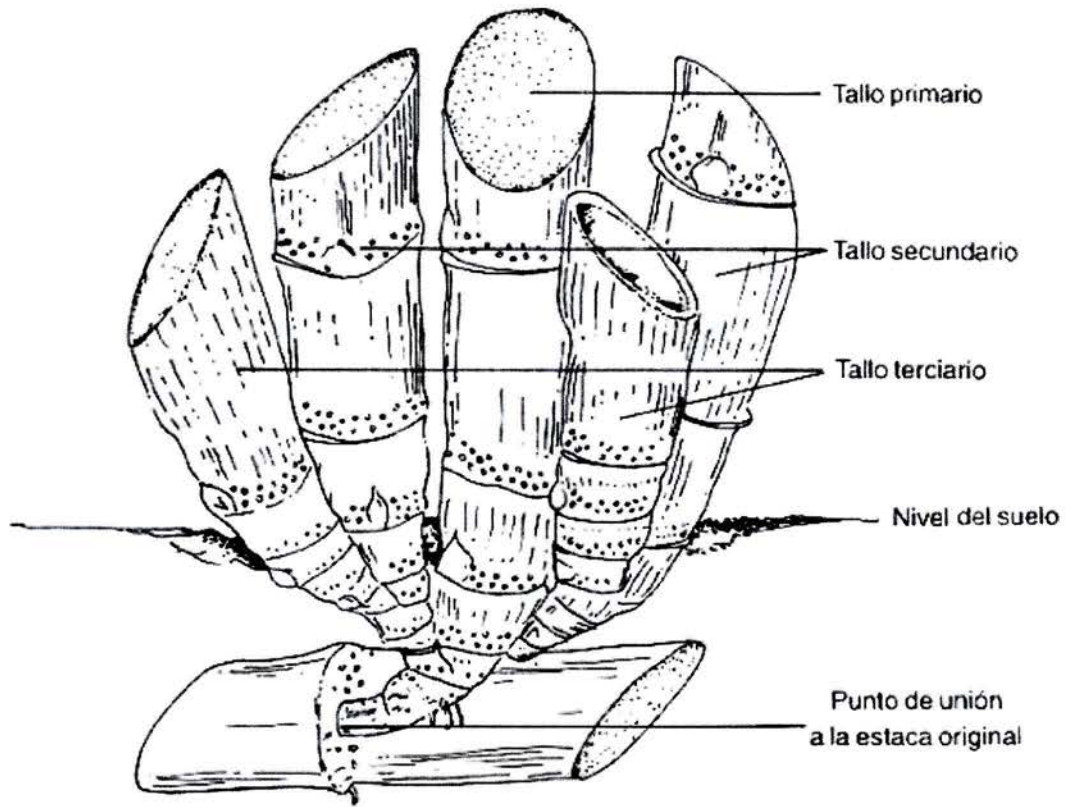


Figura 2. Tallos de caña de azúcar y su diferenciación (López 2015).

Nudo y entrenudo: El nudo es la parte más fibrosa, está conformado por la banda de crecimiento y separa dos entrenudos. Asimismo, el entrenudo es la parte del tallo que se encuentra entre dos nudos, puede tener una forma cilíndrica, abarrilada, coneiforme y curvada (Figura 3).

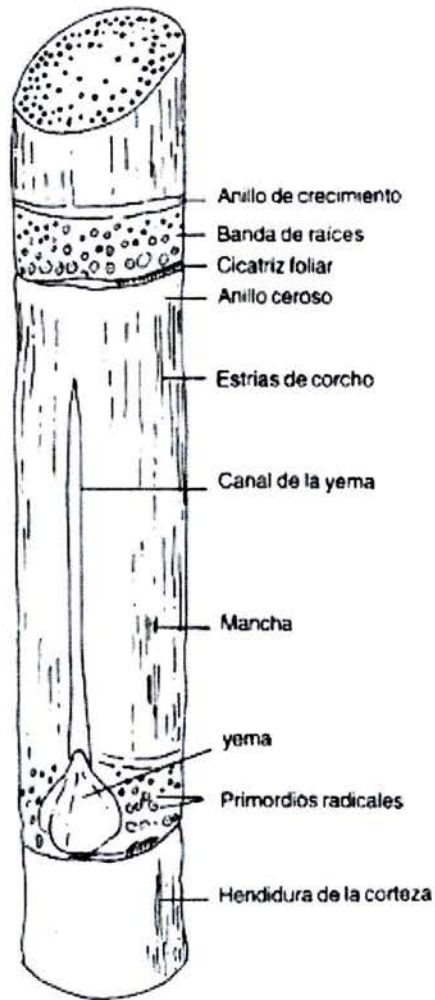


Figura 3. Nudo y entrenudo de la caña de azúcar (López 2015).

Hoja: Se conforma a lo largo del tallo de forma alterna, se compone de la lámina foliar y la vaina, cuando la lámina foliar se une con la vaina se le conoce como lígula y en la parte exterior se desarrolla la aurícula. La lámina foliar posee a lo largo la nervadura central con algunas protuberancias en forma aserrada (Figura 4).

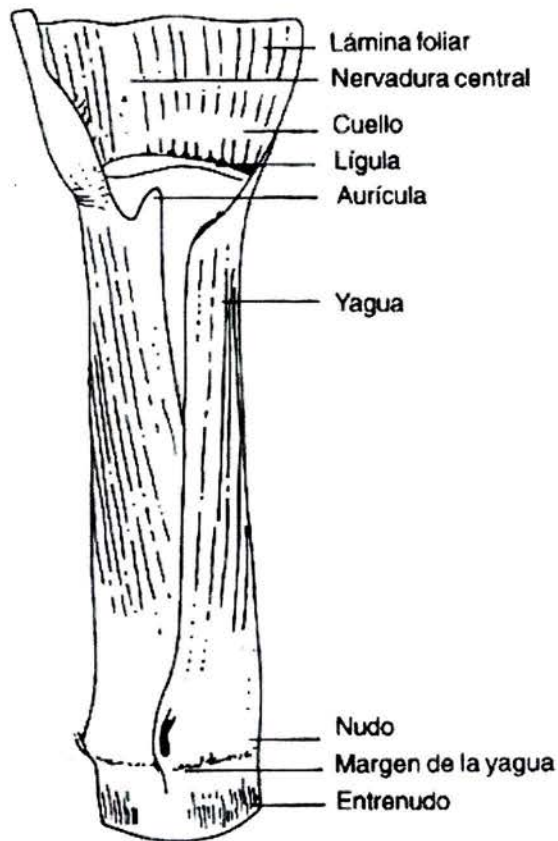


Figura 4. Hoja de caña de azúcar (López 2015).

Vaina: Es la parte de la planta que envuelve al tallo de forma tubular, en la base de la planta es más ancha.

Inflorescencia: La flor es una panícula lisa alargada en forma de espiga expuestas sobre un raquis a lo largo presenta una flor hermafrodita compuesta por anteras, un ovario y un par de estigmas (Figura 5).

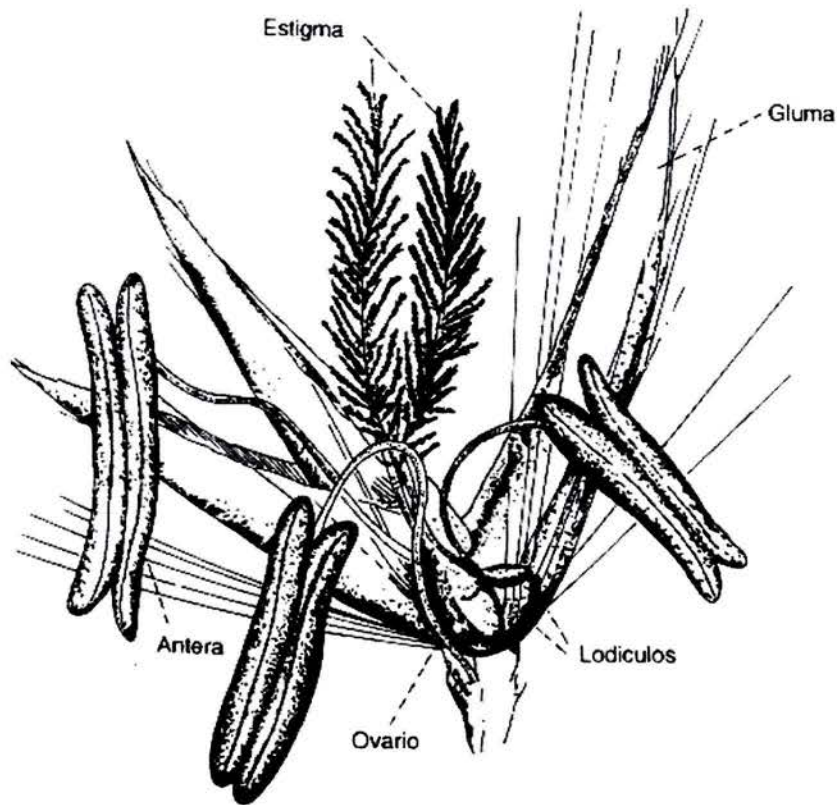


Figura 5. Flor de la caña de azúcar (López 2015).

1.3 Caña de azúcar en el mundo

La utilización de la caña de azúcar como endulzante data desde el siglo XVI, al inicio la molienda se realizaba mediante una maquina llamada trapiche. Estaba compuesta por tres rodillos que prensaban la caña hasta desmenuzarla y extraer sus jugos, posteriormente se concentraba y cocinaba hasta obtener cristales de azúcar (Colón 2018).

Posteriormente, se desarrollaron ingenios, antiguas haciendas coloniales, con instalaciones para procesar la caña de azúcar con el objetivo de procesar alcohol, ron y azúcar. Para el siglo XX, los ingenios fueron sustituidos por grandes centrales azucareras modernas, a pesar que la caña de azúcar no es un cultivo autóctono del continente americano, se adaptó a las condiciones ambientales del

trópico al punto que lo mayores productores de caña de azúcar se encuentran en Brasil, Cuba, México y Colombia principalmente (Hernández *et al.* 2013).

La producción de dulce en panela a nivel mundial mediante la concentración y la cristalización del jugo de caña se elabora en unos 21 países del mundo. El principal país productor de dulce es la India, con 4.000.000 toneladas al año, mientras que Colombia es el segundo productor con 800.000 toneladas al año. En el continente americano los países productores son: Panamá, México, Nicaragua, Guatemala, El Salvador, Costa Rica, Venezuela y Brasil (Ministerio de Agricultura y Ganadería 2007) ^b.

1.4 Caña de azúcar en Costa Rica

La producción de caña de azúcar para la producción dulce, azúcar y alcohol, tiene antecedentes desde la época colonial de Costa Rica, pero fue hasta la segunda mitad del Siglo XIX que dio inicio a un proceso industrial-artesanal con las primeras fábricas o ingenios de azúcar blanco (León y Arroyo 2012).

En Costa Rica, el sector azucarero representa el 0,33% del Producto Interno Bruto (PIB) y el 3,83% en el Producto Interno Bruto Agropecuario (PIBA). En el aspecto laboral, se estima la generación de 25.000 empleos directos y más de 100.000 indirectos, siendo un 9,3% de empleo en el sector agropecuario y un 1,3% del empleo nacional. Se reporta entre \$200 y \$250 millones en ventas de azúcar, melaza y productos con valor agregado (Chaves y Bermúdez 2015).

1.5 Patógenos

En la actividad agrícola, existen muchos organismos que causan síntomas y signos que provocan afectaciones directas sobre los rendimientos de los cultivos, afectando la economía y la seguridad alimentaria, esto se conoce como agentes fitopatógenos, se dividen en dos tipos. Los factores bióticos que incluyen microorganismos y parásitos y los factores abióticos como las condiciones ambientales, por lo general, la fitopatología se correlaciona con otras ciencias

como la entomología, micología, virología, bacteriología, y ciencias de las malezas (Waleed y Alghuthaymi 2016).

Cuando un agente patógeno coloniza, infecta o parasita a un hospedero desarrolla una habilidad para vencer las barreras defensivas que tiene la planta para prevenir la infección, estas barreras mecánicas y el desarrollo coevolutivo han resultado en la utilización de estrategias de ataque por parte del patógeno altamente específicas y extremadamente sofisticadas. También las plantas han desarrollado una serie de respuestas de defensa elaboradas por el huésped (Camarena 2001).

El impacto de las plagas y enfermedades sobre las plantas provoca disminuciones severas en la productividad de los cultivos arriesgando la seguridad alimentaria. En los últimos años se ha determinado que la respuesta a la pérdida global debida a plagas es de un 26-29% aproximadamente para cultivos como trigo y algodón y un 31, 37 y 40% para el maíz, arroz, papas, respectivamente. A pesar de que se ha dado un aumento en el uso de pesticidas, no se ha disminuido de una forma significativa las pérdidas por efectos de las plagas y enfermedades en la producción de cultivos (Oerke2006).

Los efectos de las enfermedades sobre el cultivo de la caña de azúcar han ocasionado grandes pérdidas los rendimientos, ejerciendo así, gran importancia económica sobre la productividad. Además, la poca o nula relevancia que se ha recibido la investigación y combate de enfermedades sobre el cultivo ha ocasionado que se registren pocas medidas de control (biológico, químico, etc.), manejo integrado de plagas, desarrollo varietal, entre otros (FAO 2018).

1.6 *Fusarium* spp.

Los hongos fitopatógenos con origen en el suelo causan daños en todos los agroecosistemas del mundo. Se encuentran ampliamente distribuidos debido a su capacidad de adaptación. La importancia de los hongos fitopatógenos que atacan las raíces de las plantas no se limita al daño que ocasiona, sino, en el papel que

desempeñan en las cadenas tróficas y las relaciones que se establecen en la microbiota del suelo, la dinámica entre poblaciones (Rodríguez 2001).

La enfermedad de Pokkah Boeng se describió por primera vez en Java, Indonesia en 1896 (Ploetz 2005). Esta enfermedad se reportó en la India durante los años 30^s en el cultivo de caña de azúcar. En los años posteriores se ha notado un avance de la enfermedad en diferentes variedades y agroecosistemas (Singh *et al.* 2006). Una encuesta realizada en la India reportó un aumento de un 90% en la tasa de infección de Pokkah Boeng entre los años 2012 al 2013 (Zhenyue Lin *et al.* 2014).

Muchos autores han descrito a *Fusarium moniliforme* como agente causal. Vishwakarma *et al.* (2013), indican que la enfermedad Pokkah Boeng es causado por *Fusarium moniliforme* y en la etapa perfecta se le atribuye a *Gibberella fujikuroi*, sin embargo, otros experimentos de inoculación de plantas en maceta realizados en Sudáfrica reportan que Pokkah Boeng es causada por un complejo de especies de *F. sacchari*, *F. proliferatum*, y *F. andiyazi* (Zhenyue Lin *et al.* 2014).

Dada la versatilidad del patógeno existe cierto debate en la especie involucrada como agente causal del Pokkah Boeng (Govender *et al.* 2010), otros autores indican que el agente causal de Pokkah Boeng es ambiguo y disputado entre otras especies de *Fusarium* spp. (Hilton *et al.* 2017).

1.6.1 Ecología

Fusarium spp., es un hongo filamentoso que habita en áreas tropicales, subtropicales y templados. Es un patógeno de las plantas y puede causar infecciones en el ser humano (Benadof 2010). Este hongo puede crecer en PDA (potato dextrose agar, en español: agar de papa y dextrosa) a 25 ° C, produciendo un micelio algodonoso incoloro que con el tiempo se torna a un color crema, amarillo, rojo o púrpura. Asimismo, presenta tres diferentes tipos de esporas asexuales y tres tipos de conidios (Rodríguez 2013).

Las esporas del patógeno se desarrollan en los esquejes de caña de azúcar, a partir de ahí se propagan por el viento, lluvia o por medio de pupas e insectos perforadores de tallo de caña de azúcar (Ploetz 2005). El desplazamiento de las esporas es por medio de agua y viento es dependiente de la situación ambiental del lugar, en días calurosos las esporas se secan causando que se dispersen fácilmente por medio del viento. En época lluviosa, los conidios se lavan hasta las partes susceptibles al margen de las hojas, donde el micelio se propaga hacia los haces vasculares del tallo, bloqueando los vasos (Siti Nordahliawate 2007).

1.6.2 Morfología de *Fusarium* spp.

Las fiálides de este género son finas con forma de botella, pueden ser simples o ramificadas, cortas o largas. Los macroconidios tienen forma de media luna hialinos y septados. Para la correcta clasificación es importante el largo y ancho, los septos y las agrupaciones mucoides o esporodoquios. En algunas especies los microconidios están ausentes, sin embargo, tienen diferentes formas, los mesoconidios son similares, pero más pequeños que los macroconidios, pueden observarse también clamidiosporas con pared lisa, rugosa o doble. En la Figura 6, se puede observar la morfología de este microorganismo (Tapia y Amaro 2014).

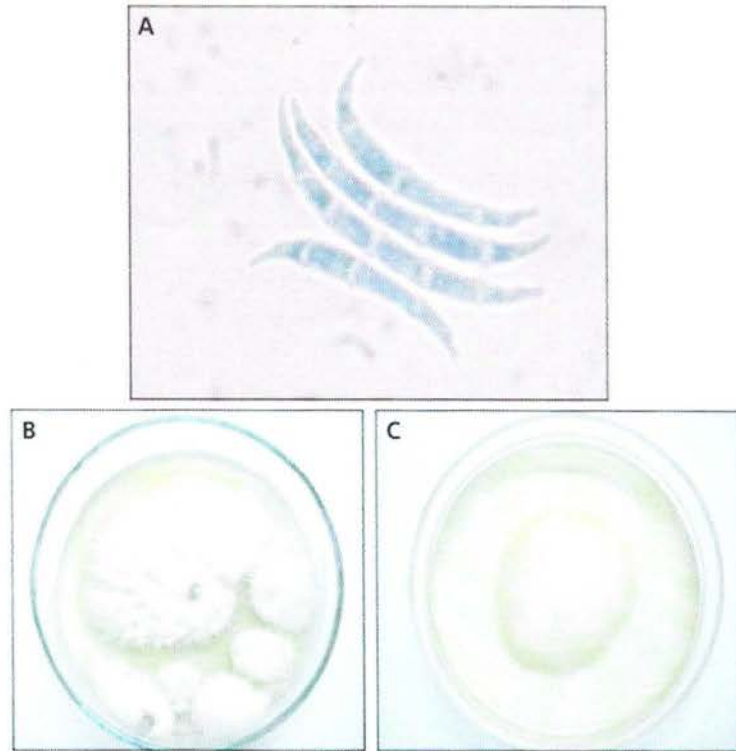


Figura 6. Morfología de *Fusarium* spp. 1A: Macroconidios de *Fusarium* spp., en aumento inmersión (100x). 1B: Cultivo de *Fusarium proliferatum* en agar PDA. 1C: Cultivo de *Fusarium proliferatum* en agar Sabouraud (Tapia y Amaro 2014).

1.6.3 Síntomas de *Fusarium* spp. en caña de azúcar

Pokkah Boeng es una enfermedad devastadora que produce una malformación en la parte superior de la planta de caña de azúcar (Vishwakarma *et al.* 2013), se puede desarrollar rayas rojas y clorosis en las hojas, podredumbre del tallo (Hilton *et al.* 2017), dependiendo de la severidad de la enfermedad puede aparecer un rayado rojizo dentro de las partes cloróticas (Victoria *et al.* 2017), necrosis apical, arrugas, acortamiento de hojas, lesiones en el nervio central de hojas (Ploetz 2005). También ocasiona la pudrición de semilla (Rodríguez 2013). Otro síntoma que se desarrolla es la deficiencia de oligoelementos que afecta directamente el porcentaje de sacarosa y pol en el jugo (Singh *et al.* 2008). En la

Figura 7, se observan los síntomas de Pokkah Boeng descritos por Hilton *et al.* (2017).



Figura 7. Síntomas característicos de la enfermedad de Pokkah Boeng observados plantas de caña de azúcar enfermas. (A) Rayas rojas y clorosis. (B) Podredumbre del tallo. (C) Cuchillo cortado y parte superior deformada (Hilton *et al.* 2017).

1.7 *Trichoderma* spp.

La primera descripción de *Trichoderma* data de 1794. Sin embargo, las diferentes especies asignadas al género *Trichoderma*/Hypocrea fueron difíciles de distinguir morfológicamente. Se propuso reducir la taxonomía a sólo una sola especie, *Trichoderma viride*, pero fue hasta 1969 que se inició el concepto de identificación. A partir de entonces, se han realizado muchos aislamientos e identificaciones morfológicas y moleculares de las especies (Schuster y Schmoll 2010).

1.7.1 Características de *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp., es un hongo colonizador de materia compuesta por celulosa, se encuentra naturalmente en materia vegetal en descomposición, las especies de este hongo se caracterizan por ser saprófitos. Las colonias de *Trichoderma* spp., son de color blanco, posteriormente se tornan a un color verde oscuro o amarillento, el micelio es fino (Infante *et al.* 2009), el color de los conidios es verde brillante y tiene una estructura conidiófora ramificada repetidamente (Schuster y Schmoll 2010). *Trichoderma* es un hongo aeróbico, con capacidad para resistir un amplio intervalo de temperaturas (Martínez *et al.* 2013). El género *Trichoderma* spp., tiene la capacidad de secretar metabolitos secundarios y enzimas, y puede desarrollarse en cualquier tipo de hábitat (Schuster y Schmoll 2010).

1.7.2 Taxonomía de *Trichoderma* spp.

En el cuadro 2, se observa la clasificación taxonómica del hongo *Trichoderma* spp.

Cuadro 2. Clasificación taxonómica del hongo *Trichoderma* spp., (Infante *et al.* 2009).

Reino	Fungi
División	Mycota
Subdivisión	Eumycota
Clase	Hyphomycetes
Orden	Moniliales
Familia	Moniliaceae
Género	<i>Trichoderma</i>

1.7.3 Morfología de *Trichoderma* spp.

Las especies de este hongo forman hifas vegetativas septada, presenta conidióforos altamente ramificados, tienen ramas laterales que se extienden de las ramas principales, a veces están emparejados o forman una estructura piramidal. Los conidióforos terminan con fiálides que surgen desde el eje hasta la punta como se aprecia en la Figura 8, (Tan 2013). Las fiálides son en forma de botella únicas o en grupos, son hinchadas en la región central pero delgadas hacia el ápice, las conidias son unicelulares subglobosas u oblongas, lisas o equinuladas, hialinas o verdes ocurren en masas en los ápices de las fiálides (Chaves 2006).

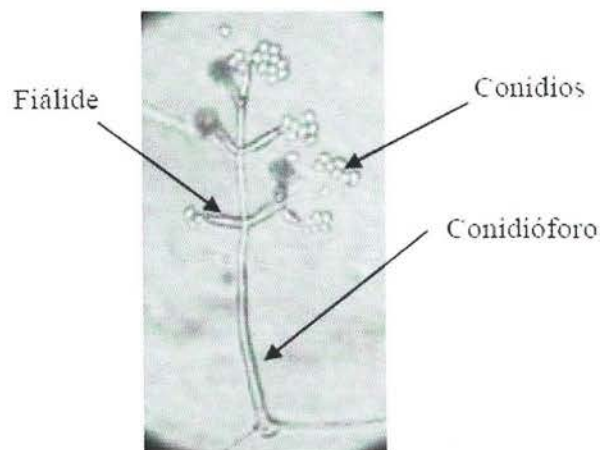


Figura 8. Conidios y conidióforos de *Trichoderma* spp., vista en objetivo (400 X) (Infante *et al.* 2009).

1.7.4 Modo de acción de *Trichoderma* spp.

La amplia variedad de especies fúngicas se ha estudiado y evaluado como agentes biocontroladores, no obstante, *Trichoderma* spp., se destaca por el amplio rango de patógenos que puede controlar (Perniola *et al.* 2014). Debido a su uso en la agricultura se han estudiado los mecanismos de acción biocontroladora, la cual se explicará en los próximos párrafos.

1.7.5 Capacidad antagonista y colonizador de raíces

Diversos estudios han demostrado que *Trichoderma* acelera el desarrollo del sistema radicular, posibilitando la tolerancia al estrés en la planta. La presencia de este hongo causa la solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos, también es capaz de inducir resistencia al ataque de enfermedades. Estas acciones son impulsadas por los mecanismos de defensa fisiológicos y bioquímicos de la planta y actúan directamente sobre los patógenos (Martínez *et al.* 2013).

1.7.6 Competencia

La competencia se define como un comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo recurso, y este a su vez limite la disponibilidad del recurso al otro organismo. *Trichoderma* spp., debido a sus características genéticas tiene excelentes habilidades como competidor por espacio y nutrientes. Cabe señalar que estas características dependen de la especie. Sin embargo, este hongo está biológicamente adaptado para colonizar sustratos en condiciones adversas mediante el crecimiento de clamidosporas (Infante *et al.* 2009). La formación de clamidosporas es una respuesta a condiciones de crecimiento desfavorables, como la deficiencia de nutrientes, exceso de temperatura o falta de humedad (Silva *et al.* 2015).

1.7.7 Microparasitismo

Es la simbiosis antagónica entre microorganismos mediante las enzimas y la estructura de las paredes celulares de los hongos parasitados. *Trichoderma* spp., durante el proceso de microparasitismo crece hacia el hospedante por reacciones quimiotrópicas, las hifas de *Trichoderma* se adhieren al hospedante y en ocasiones lo penetran (Infante *et al.* 2009).

Según Martínez y colaboradores (2013), el proceso completo está compuesto por cuatro fases:

- A. Crecimiento quimiotrófico: se detecta a distancia los posibles hospedantes.
- B. Reconocimiento: existe una lectura de las cualidades de parte del antagonista para el hospedante.
- C. Adhesión y enrollamiento: se da cuando hay una respuesta positiva de reconocimiento, las hifas del hongo se adhieren a las del hospedante mediante la formación de apresorios, este proceso es causado por la asociación de un azúcar de la pared del antagonista una lectina presente en la pared del patógeno.
- D. Actividad lítica: se producen enzimas líticas extracelulares como quitinasas glucanasas y proteasas que degradan las paredes celulares del patógeno y posibilitan la penetración de las hifas de *Trichoderma* spp.

El proceso concluye con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula del hospedante, dando paso a la disgregación. Una vez que la hifa penetra en el hospedante se desarrollan diferentes interacciones como: enrollamiento, penetración, vacuolización, granulación, coagulación, desintegración y lisis (Martínez *et al.* 2013).

1.7.8 Antibiosis

Se refiere a la acción que ejerce los metabolitos tóxicos producidos por un microorganismo a otro que es sensible a estos. *Trichoderma*, por otra parte, produce metabolitos secundarios volátiles y no volátiles que inhiben el desarrollo de otros microorganismos (Infante *et al.* 2009). Algunos de los antibióticos que se producen son: alquilpironas (6- α -pentil-pirona), isonitrilos (isonitrina), poliquétidos (harzianolida), peptabioles (trichodermina atroviridina, alameticina, suzucacilina y trichoizianina), dicetopiperacinas (gliovirina y gliotoxina), sesquiterpenos (ácido heptelídico) y esteroides (viridina) (Martínez *et al.* 2013).

CAPÍTULO IV: MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto investigativo se realizó en dos ubicaciones, el Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA), en la ciudad de la investigación de la Universidad de Costa Rica, donde se realizaron los aislamientos y las pruebas de laboratorio. Y en Ingenio Taboga donde se llevaron a cabo la toma de muestras y la ejecución de las pruebas de campo.

La etapa experimental se divide en cinco partes que se detallan a continuación:

1.1 Etapa experimental I: Aislamiento de *Trichoderma* spp., en medio de cultivo

1.1.1 Ubicación

La selección de las cepas nativas se ubicó en dos localidades, el muestreo de suelo se realizó en las plantaciones comerciales de Finca Norte, en Ingenio Taboga, localizado en Bebedero, Cañas, Guanacaste. Mientras que el aislamiento del hongo se realizó en el Laboratorio de Bioquímica de los Procesos Orgánicos del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica, San José.

1.1.2 Muestreo de suelo

Se procedió a realizar un muestreo de suelo completamente al azar con cinco puntos de muestreo para cada uno de los lotes bajo la modalidad de rotación arroz-caña de azúcar, sembrados con una variedad de importancia económica y en diferentes ciclos del cultivo (Cuadro 3).

Para ello se utilizó un barreno para extraer las muestras en los primeros 15 centímetros de suelo, localizados cerca de las raíces de la planta. Posteriormente se realizó un cuarteo con el fin de homogenizar las muestras y que fueran lo más representativas. Finalmente se etiquetaron y se empacaron para transportarlas al Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) para realizar los aislamientos.

Cuadro 3. Sitios de muestreo para la selección de *Trichoderma* spp., nativo en un sistema rotacional de arroz-caña de azúcar, Ingenio Taboga.

Número de muestra	Lote	Cultivo anterior	Edad del cultivo anterior (Años)	Cultivo presente	Edad del cultivo (Años)	Variedad
1	L-2	Arroz	2	Caña de azúcar	0,5	BC001220
2	M-2	Arroz	2	Caña de azúcar	0,5	BC001220
3	K-1	Arroz	1	Caña de azúcar	1,5	B82333
4	I-5	Arroz	2	Caña de azúcar	2,5	BC001220
5	E-14	Caña de azúcar	5	Arroz	1	Palmar 18

En el Cuadro 4, se describen las características de suelo de cada uno de los sitios de recolección.

Cuadro 4. Características de suelo de lotes muestreados en Ingenio Taboga.

Lote	Área (ha)	Textura	Orden Suelo	Espacio entresurco (m)
L-2	8,71	Arcilloso	Vertisol	1,7
M-2	11,03	Arcilloso	Vertisol	1,7
K-1	18,36	Arcilloso	Vertisol	1,7
I-5	7,64	Arcilloso	Vertisol	1,7
E-14	9,04	Arcilloso	Vertisol	N/A*

*N/A: No aplica.

1.1.3 Aislamiento de *Trichoderma* spp.

1.1.3.1 Preparación de la muestra

Para la preparación de la muestra se procedió a limpiar cada una de las muestras de suelo de contaminantes u otras partículas no deseadas y se mezcló la muestra hasta homogenizarla.

1.1.3.2 Preparación del medio de cultivo

Se midieron 1000 ml de agua destilada en un erlenmeyer limpio, seguidamente se pesaron 39 g de agar papa dextrosa (PDA) comercial. Se colocó el Erlenmeyer con agua destilada en un agitador calentador hasta que llegara a punto de ebullición, se agregó lentamente el PDA previamente pesado hasta obtener una disolución homogénea. Finalmente se colocó un tapón en el erlenmeyer y se sometió a un proceso de esterilización durante 15 minutos a 120 °C y 15 PSI en una autoclave. Una vez terminado este proceso, se agregó 7 ml de ácido tartárico al 1%, con el fin de acidificar el medio de cultivo. Por último, se depositó con cuidado una porción del medio de cultivo preparado los platos Petri ya esterilizados hasta formar una capa de unos 2 a 4 mm de grosor, se dejó enfriar y posteriormente se almacenaron en un refrigerador a 6 °C.

1.1.3.3 Inoculación

Se preparó cinco botellas contenidas con 90 ml de agua destilada y esterilizada. Se tomó una submuestra de 10 g de suelo de cada una de las muestras de suelo. Posteriormente, se agregó cada submuestra en cada una de las botellas debidamente rotuladas. Se agitó hasta obtener una disolución homogénea (Figura 9).

Seguidamente, se utilizó una cámara de flujo laminar con el fin de crear un ambiente aséptico para inocular una alícuota de las disoluciones pertenecientes a cada submuestra de suelo. Para ello, se usó una micropipeta graduable de 100-1000 µl, y se tomó una alícuota de 1000 µl de la disolución de suelo previamente preparada, se depositó la alícuota en el plato Petri contenido con el medio de

cultivo PDA, debidamente identificado. Se dispersó en toda el área del plato con una espátula triangular de vidrio. Finalmente, se tapó el plato Petri y se selló la orilla de este con una banda de 14 mm de papel parafilm, se realizaron cuatro repeticiones para cada una de las submuestras.



Figura 9. Preparación de muestras de suelo para la inoculación, CIA (Elaboración propia).

1.1.3.4 Crecimiento

Se tomaron los platos Petri inoculados y se colocaron en una incubadora a un rango de temperatura entre los 24 y 27 °C durante 14 días.

1.1.3.5 Purificación

El proceso de purificación se realizó mediante la transferencia de algún tejido del hongo (micelio y/o esporas) hasta obtener un cultivo puro. Este proceso se realiza en condiciones asépticas usando una cámara de flujo laminar, para ello, con un asa micológica se corta un cuadro de unos 4 o 5 mm de largo y ancho. Ese mismo fragmento se coloca en una placa Petri contenida con medio de cultivo PDA totalmente nueva. Seguidamente, se coloca el plato Petri inoculado en una incubadora programada a 25° C, durante 5 a 7 días, este proceso es repetitivo hasta cuando se logre obtener una placa Petri sin la presencia de contaminantes.

Para la recuperación del de *Trichoderma* spp., extraído de las muestras de suelo, se procedió a realizar cuatro transferencias del hongo hasta obtener un cultivo puro.

1.1.4 Identificación

Se procedió a realizar una transferencia del cultivo puro para obtener una réplica del material, posteriormente se empacó y se envió la muestra al Laboratorio de Técnicas Moleculares adjunto al Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos (CIPROC), de la Universidad de Costa Rica, para realizar un análisis de identificación molecular a partir de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés).

1.2 Etapa experimental II: Recuperación de *Fusarium* spp., en medio de cultivo

1.2.1 Ubicación

La obtención del patógeno en medio de cultivo se ubicó en la sección de Congos, en el lote B-7, perteneciente a Finca Norte, Ingenio Taboga, la variedad presente en el momento del muestreo fue BC001220, la recuperación del patógeno en medio de cultivo se realizó en el CIA.

1.2.2 Muestreo de material vegetal

Para el muestreo vegetal se identificó visualmente plantas con síntomas de Pokkah Boeng. Posteriormente, se tomaron muestras foliares de raíces y tallos de las plantas afectadas, también se tomó una muestra de suelo. Históricamente, este lote ha presentado alta incidencia de esta enfermedad desde el año 2000. En el Anexo I, se observa algunos resultados de análisis fitopatológicos como evidencia.

1.2.3 Aislamiento de *Fusarium* spp.

1.2.3.1 Preparación de la muestra

Se lavó con agua destilada cada una de las muestras del material vegetal. Posteriormente, se colocó un papel húmedo a cada una de las muestras para el traslado al CIA donde se procedió a realizar el aislamiento. Para la muestra de suelo se procedió a mezclar el suelo, se limpió la muestra de partículas y contaminantes.

1.2.3.2 Preparación del medio de cultivo

Se utilizó el mismo procedimiento que se describe en el apartado 1.1.3.2 del Capítulo IV.

1.2.3.3 Inoculación

Para las muestras vegetales, se procedió a cortar un fragmento del tejido con síntomas de la enfermedad y se colocó en un plato Petri con medio de cultivo PDA, para la muestra de suelo se tomó una submuestra de 10 g de suelo y se colocó en una botella de vidrio contenida por 90 ml de agua esterilizada. Se mezcló hasta obtener una disolución homogénea. Con una micropipeta graduable se tomó 1000 µl de la disolución de suelo y se colocó la alícuota en un plato Petri con PDA debidamente rotulado, se extendió la muestra con una espátula triangular. Finalmente, se tapó y selló cada uno de los platos con papel parafilm. Para cada una de las muestras se realizaron tres repeticiones.

1.2.3.4 Crecimiento

Se colocaron los platos Petri inoculados en una incubadora durante 12 días a 25° C de temperatura.

1.2.3.5 Purificación

Para este proceso, se utilizó el mismo procedimiento detallado en el apartado 1.1.3.5 del Capítulo IV.

1.2.4 Identificación

Se realizó una transferencia del tejido micelial para obtener una réplica del material. Lo anterior, se realizó en un ambiente aséptico, para ello se empleó una cámara de flujo laminar con un asa micológica se procedió a cortar un trozo pequeño del tejido micelial del hongo y se trasladó a otra placa Petri debidamente rotulada y limpia, se selló con papel parafilm. Posteriormente se envió la muestra al Laboratorio de Técnicas Moleculares adjunto al CIPROC, de la Universidad de Costa Rica, donde se ejecutó un análisis de identificación molecular (PCR) para identificar el patógeno mediante la amplificación de fragmentos de ADN.

1.3 Etapa experimental III: Prueba de patogenicidad

1.3.1 Ubicación

Se realizó la prueba de patogenicidad en el invernadero de Ingenio Taboga, localizado en Bebedero, Cañas, Guanacaste.

1.3.2 Siembra de plantas

Se seleccionaron 15 esquejes de caña de azúcar de la variedad BC001220 con la presencia de 1 o 2 yemas, seguidamente, se aplicó una cura compuesta por Folpet a 20 ml en un volumen de 50 L y se sumergió por 2 minutos. Posteriormente, se sembró la yema en una bandeja de almácigo de 20 celdas y se le adicionó fertilizante de siembra, se utilizó una mezcla de suelo con arena y granza de arroz como sustrato a una relación 1:1. Se mantuvo en invernadero durante 30 días a riego por aspersión hasta llegar a capacidad de campo.

Al día 31 después de siembra (DDS), se trasplantaron las plántulas a macetas usando suelo como sustrato. Se colocaron en unas mesas de aclimatación. Se aplicó una dosis de 8 gramos de urea por planta, se mantuvieron con riego hasta cuando alcanzó los 90 DDS aproximadamente.

1.3.3 Infección de plantas

Se seleccionaron 10 plantas de caña de azúcar aparentemente sanas con una edad de 99 DDS. Con un bisturí estéril, se procedió a realizar una incisión en la parte basal del tallo de cada una de las plantas y se colocó sobre esta área un disco de 5 mm de micelio del patógeno aislado en la Etapa experimental II. Posteriormente, se colocó un papel toalla humedecido. También se colocó un disco del micelio en el suelo de cada macetero, cerca de las raíces de la caña. Las plantas infectadas recibieron dos riegos diarios hasta capacidad de campo, y una poda.

1.3.4 Observación de síntomas

A partir de la infección de las plantas se procedió a realizar monitoreos diarios para observar los síntomas.

1.3.5 Recuperación del patógeno

Cuando se observó la presencia de síntomas, se procedió a realizar la recuperación del patógeno en medio de cultivo por medio de un aislamiento. Para ello, se tomó una muestra del tejido vegetativo con síntomas de la enfermedad, se limpió con agua destilada y se colocó en un plato Petri contenido con PDA. Lo anterior, se realizó en condiciones asépticas utilizando una cámara de flujo laminar. Seguidamente, se colocó en la incubadora a 25° C, durante 7 días y se observó meticulosamente hasta identificar morfológicamente tejidos miceliales del patógeno inoculado. Posteriormente, una vez identificado, se procedió a purificar el tejido mediante la transferencia de un pequeño trozo del tejido micelial a otro plato Petri totalmente limpio, este proceso se realizó en dos ocasiones, hasta obtener la cepa pura del agente en cuestión. En este procedimiento se realizó por duplicado para los tejidos vegetativos muestreados, (tallos y raíz).

1.3.6 Identificación del agente causal

A partir del material aislado descrito en el apartado anterior, se envió una réplica purificada en plato Petri para identificar el agente causal mediante un análisis de PCR.

1.4 Etapa experimental IV: Prueba de antagonismo *in vitro*

1.4.1 Ubicación

La prueba de antagonismo *in vitro* se realizó en el Laboratorio de Bioquímica de los Procesos Orgánicos, localizado en la Ciudad de la Investigación de la Universidad de Costa Rica, San José.

1.4.2 Inoculación

La prueba de enfrentamiento se realizó utilizando cultivos duales en platos Petri con medio de cultivo PDA, acidificado con ácido tartárico. Para ello se cortó con un anillo de 5 mm de diámetro tejido activo del micelio del patógeno (*Fusarium* spp.) y el agente biocontrolador (*Trichoderma* spp.). Posteriormente, se colocó cada uno de los discos cortados en el mismo plato Petri, uno en frente del otro, a unos 50 mm de distancia entre ellos para que sufriera una confrontación directa. A su vez, se sembró en solitario un disco del tejido del patógeno (*Fusarium* spp.) como tratamiento testigo. En otra caja Petri se colocó un disco de micelio del agente biocontrolador (*Trichoderma* spp.) como tratamiento de control. Este procedimiento se realizó por duplicado para cada una de las cepas de *Trichoderma* spp., aisladas, más los tratamientos testigo y de control.

1.4.3 Crecimiento

Los platos inoculados se mantuvieron en condiciones controladas en una incubadora programada a 25°C de temperatura y a una humedad relativa de 70-80%, estas condiciones se proporcionaron durante 3 días.

1.4.4 Evaluación

Se procedió a medir el crecimiento radial de cada uno de los tratamientos cada 24 horas durante 3 días, utilizando un vernier digital. A partir de las mediciones se calculó el porcentaje de inhibición mediante la fórmula $((C-T)/T) \times 100$, donde C es el crecimiento radial del patógeno en el control y T es igual al crecimiento radial del patógeno sometido en el cultivo dual. Se clasificó la actividad antagonista, para ello se utilizaron los parámetros descritos en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Escala para la evaluación *in vitro* de la actividad antagonista del hongo *Trichoderma* spp., (Guigón y González 2004).

Valor	Descripción
1	El patógeno crece en toda la caja deteniendo al <i>Trichoderma</i> spp.
2	El patógeno crece más del 75% entremezclándose con <i>Trichoderma</i> spp. he inhibiéndolo.
3	Patógeno y <i>Trichoderma</i> spp. crecen 50% deteniendo ambos su crecimiento.
4	<i>Trichoderma</i> spp. sobrecrece al patógeno inhibiéndolo y ocupando un 75% de la caja.
5	<i>Trichoderma</i> spp. sobrecrece al patógeno ocupando el 100% de la caja.

1.5 Etapa experimental V: Prueba de campo

1.5.1 Ubicación

La prueba de campo se realizó en una plantación comercial en el lote B-7, de la sección de Congos, Finca Norte de Ingenio Taboga, localizado en Bebedero,

Cañas, Guanacaste. El lote se caracteriza por poseer un marcado historial de baja productividad a causa del efecto de enfermedades como Pokkah Boeng. Presenta un tipo de suelo franco arcilloso, el lote cuenta con 10.85 hectáreas totales.

1.5.2 Manejo agronómico

Se sembró esquejes de caña como semilla vegetativa de unos 30 cm de largo, de la variedad BC001220, proveniente de un semillero comercial, se sembró a una distancia entresurco de 1,7 m en un suelo franco arcilloso. Se realizó dos fertilizaciones mecánicas, uno a la siembra y la segunda a los 60 DDS, en fondo del surco, cerca de las raíces de la planta.

Para el control de malezas se realizaron controles químicos, manual y mecánico. En la preemergencia se utilizó Imazapic más Imazapir a la dosis recomendada mediante la aplicación mecanizada terrestre. A los 70 DDS, se realizó un control mecánico mediante el pase de un escardillo. Posteriormente se realizó una aplicación de posemergente de Diuron, Hexacinona y 2,4-D a la dosis recomendada, a los 100 DDS mediante la aplicación terrestre mecanizada

1.5.3 Diseño experimental

Se realizó un diseño irrestricto, distribuido totalmente al azar con 6 tratamientos y 5 repeticiones (puntos de muestreo). Cada parcela experimental contaba con un área de 42,5 m² (8,5 m x 5 m). Entre parcelas se proporcionó un surco de separación, y un borde de 1 m².

1.5.4 Reproducción de *Trichoderma*

Para la aplicación de *Trichoderma*, se procedió a realizar la reproducción masiva de cada una de las cepas en sustrato sólido (arroz), para ello se detalla los procesos realizados.

1.5.4.1 Esterilización

Se tomaron las bolsas de polipropileno de 7x10" contenidas con 300 gramos de arroz calidad 80/20, y se colocaron en ollas de presión industriales durante 20 minutos, a un rango de temperatura y presión de 117.5° C, y a 15 PSI, respectivamente. Posteriormente se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

1.5.4.2 Preparación del inóculo

Se pesaron 300 gr de arroz y se colocó en una bolsa de polipropileno, se agregó 90 ml de agua. Seguidamente, se esterilizó la bolsa con arroz en una olla de presión a 117.5° C y 15 PSI durante 20 min. Posteriormente, se enfrió a temperatura ambiente.

Para la inoculación de la matriz, se procedió a cortar 4 cuadros de 1 cm², aproximadamente, que se colocaron en la bolsa de arroz previamente esterilizado. Se sometió al proceso de crecimiento durante 7 días a una temperatura de 25-28° C a una humedad relativa entre 80 y 55%.

1.5.4.3 Inoculación

Una vez listo el material esterilizado y el inóculo preparado. Se procedió a diluir la matriz en 1080 ml de agua esterilizada. Se agitó constantemente hasta obtener una mezcla homogénea, garantizando así que las esporas entren en suspensión. Seguidamente, se tomó una alícuota de 15 ml de la mezcla preparada y se inyectaron en las bolsas contenidas con el arroz previamente esterilizado.

1.5.4.4 Crecimiento

Se procedió a colocar las bolsas inoculadas en estantes a temperatura y humedad controlada (25-28° C y 80-55%, respectivamente). El proceso de crecimiento se tardó 7 días. Al tercer día se realizó una abertura a la bolsa inoculada para la entrada de oxígeno.

1.5.4.5 Empaque y almacenamiento

Una vez finalizado el proceso de crecimiento, se procedió a empacar el *Trichoderma* spp. Para ello, se colocó el producto final en bolsas de polietileno de 9x15 cm, se almacenó en un refrigerador estándar entre 6 a 8° C.

1.5.4.6 Aplicación por parcela experimental

Se aplicaron 20 gramos del producto final de *Trichoderma* spp., por parcela, correspondiente a cada tratamiento evaluado (seis en total). Se procedió a lavar el *Trichoderma* spp., se utilizó un recipiente limpio y desinfectado donde se colocaron los 20 gramos del producto final de *Trichoderma* spp., y se lavó con 1 litro de agua hasta que se desprendieran las esporas. Posteriormente, se llevó a una pulverizadora manual, donde se aforó hasta llegar a 3 L de agua como volumen de aplicación.

1.5.5 Evaluación

Se realizaron muestreos quincenales a partir de los primeros 15 días posteriores a la aplicación del *Trichoderma* spp. Se contó el número de tallos totales y el número de tallos enfermos para determinar el porcentaje de incidencia, para ello se empleó la fórmula $(TA/TT) \times 100$, donde TA es el número de tallos afectados y TT el número de tallos totales. Posteriormente se clasificó la severidad según lo descrito en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Descripción de la escala de evaluación para el Pokkah Boeng de la caña de azúcar (Chavarría 2006).

Grado	Descripción
1	No se observan síntomas.
2	Áreas cloróticas en la base de las láminas foliares.
3	Clorosis generalizada y/o arrugamiento del follaje.
4	Arrugamiento y/o necrosis del follaje.
5	Acortamiento y deformación de las hojas, muerte del punto de crecimiento, deformación de tallos, aparición de heridas transversales en los entrenudos conocidos como “el síntoma de corte de machete”

CAPÍTULO V: RESULTADOS

1.1 Etapa experimental I: Aislamiento de *Trichoderma* spp., en medio de cultivo

Se reportó la presencia de *Trichoderma* spp., en tres muestras de suelo, mientras que las otras dos restantes no se reportó la presencia del hongo. En el Cuadro 7 se detalla.

Cuadro 7. Resultados de muestreo de suelo para la obtención de *Trichoderma* spp.

Número de muestra	Lote	Presencia de <i>Trichoderma</i>
1	L-2	SI
2	M-2	SI
3	K-1	N/P
4	I-5	N/P
5	E-14	SI

N/P: No se encontró la presencia de *Trichoderma* spp.

A partir de las muestras positivas de *Trichoderma* spp., se seleccionaron cinco cepas promisorias del hongo, para realizar la identificación molecular. En el Cuadro 8, se observa la especie de *Trichoderma* spp., aislada. En el anexo II se encuentra el resultado de la identificación molecular girado por el Laboratorio de Técnicas Moleculares del CIPROC, UCR. Asimismo, en la Figura 10, se presentan las cepas de *Trichoderma* spp., aisladas, de las muestras de suelo provenientes de plantaciones comerciales bajo un sistema de rotación de arroz-caña de azúcar de Ingenio Taboga.

Cuadro 8. Resultados de la identificación molecular mediante análisis de PCR de cepas aisladas de *Trichoderma* spp., provenientes de plantaciones comerciales bajo un sistema de rotación arroz-caña de azúcar de Ingenio Taboga.

Identificación de cepa	Procedencia	Especie
ITL211	L-2	<i>Trichoderma asperellum</i>
ITM2324	M-2	<i>Trichoderma asperellum</i>
ITM2325	M-2	<i>Trichoderma asperellum</i>
ITE1434	E-14	<i>Trichoderma virens</i>
ITE1435	E-14	<i>Trichoderma virens</i>

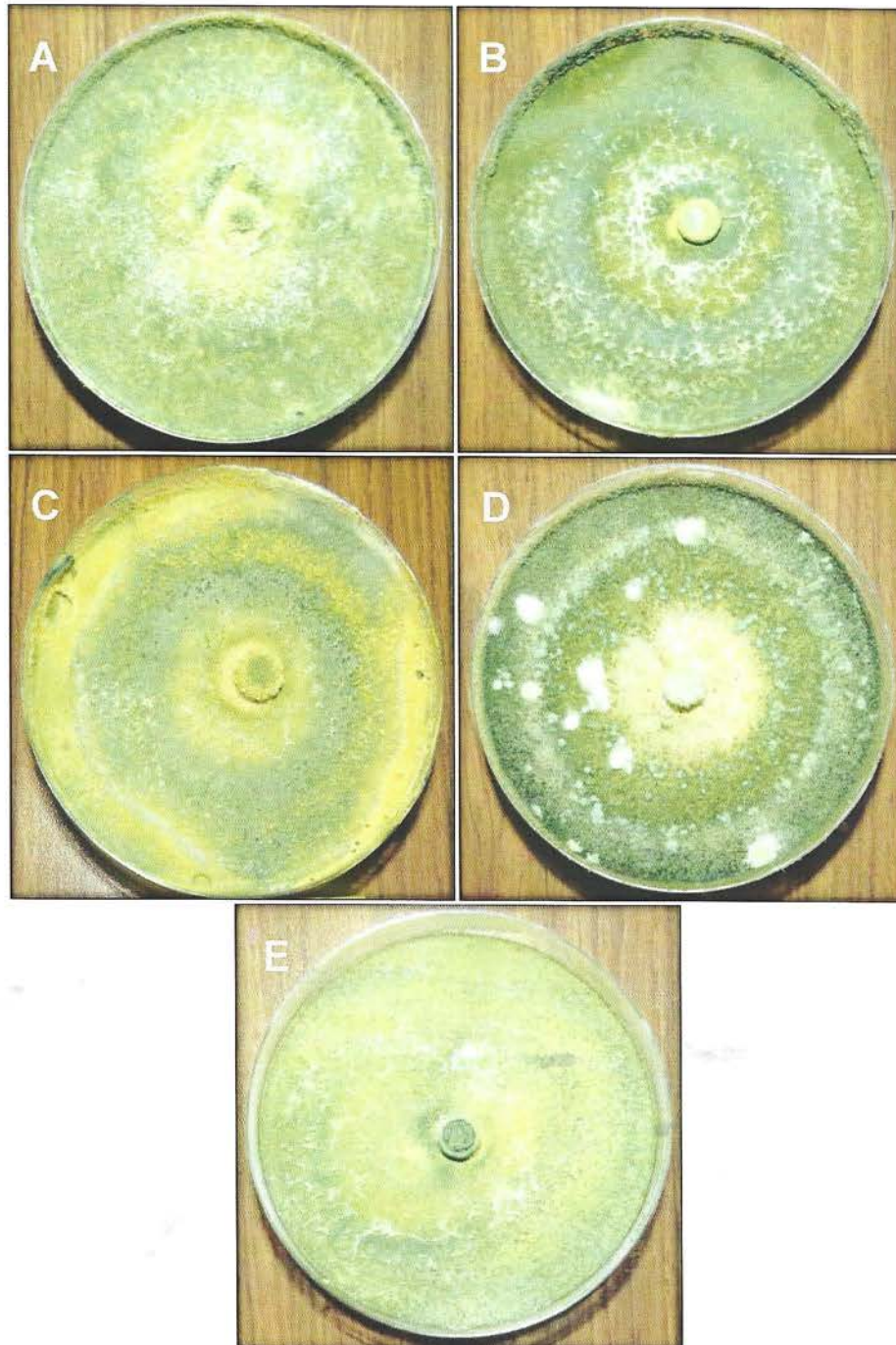


Figura 10. Cepas de *Trichoderma* spp., aisladas de plantaciones comerciales bajo un sistema de rotación arroz-caña de azúcar en Ingenio Taboga. A. Cera ITL211, B. Cera ITE1434, C. Cera ITM2324, D. Cera ITE1435, E. Cera ITM2325 (Elaboración propia).

1.2 Etapa experimental II: Recuperación de *Fusarium* spp., en medio de cultivo

Se reportó la presencia de plantas con síntomas de Pokkah Boeng, localizadas en el lote B-7 de la sección de Congos (Figura 11).



Figura 11. Plantas caña de azúcar muestreadas con síntomas de Pokkah Boeng (Elaboración propia).

Una vez realizado el muestreo y la recuperación del patógeno descritos en el apartado 1.2 del Capítulo IV. Se realizó un análisis de PCR, en el cual se identificó *Fusarium sacchari* como posible agente causal. En el anexo II, se adjunta los resultados de los análisis moleculares. En la Figura 12, se presenta la cepa de *Fusarium sacchari* aislada en plato Petri, que se recuperó en plantas con síntomas de Pokkah Boeng.



Figura 12. Cepa aislada de *Fusarium sacchari* en PDA, proveniente de plantas de caña de azúcar con síntomas de Pokkah Boeng en Ingenio Taboga. (Elaboración propia).

1.3 Etapa experimental III: Prueba de Patogenicidad

Una vez realizada la infección del patógeno en plantas aparentemente sanas, se observó la presencia de síntomas de amarillamiento foliar, pérdida de vigor, ligero corrugamiento en hojas. En la Figura 13, se observa el estado de las plantas antes de la infección del patógeno.

En la Figura 14, se nota los síntomas presentados después de la infección del patógeno en las plantas de caña de azúcar. La presencia de un amarillamiento severo desde las puntas de las hojas hacia el tallo es uno de los síntomas más evidentes en hojas viejas, en las hojas nuevas se observó una clorosis y un ligero corrugamiento en el borde de las hojas, en algunos casos llegó a observarse un enrollamiento.

Se encontró la presencia de un tejido color rojizo en el tallo, cerca donde se realizó la incisión, en el interior se observó una coloración café oscura situada en los entrenudos (Figura 15 A). También se observó el crecimiento de un tejido micelial color blanco en la base del tallo, acompañado de una coloración rojiza en el tallo (Figura 15 B, C).



Figura 13. (A, B, C): Plantas de caña de azúcar (BC001220) antes de la inoculación de *Fusarium sacchari* en Ingenio Taboga (Elaboración propia).



Figura 14.(A, B, C): Plantas de caña de azúcar (BC001220) después de la inoculación de *Fusarium sacchari* en Ingenio Taboga (Elaboración propia).

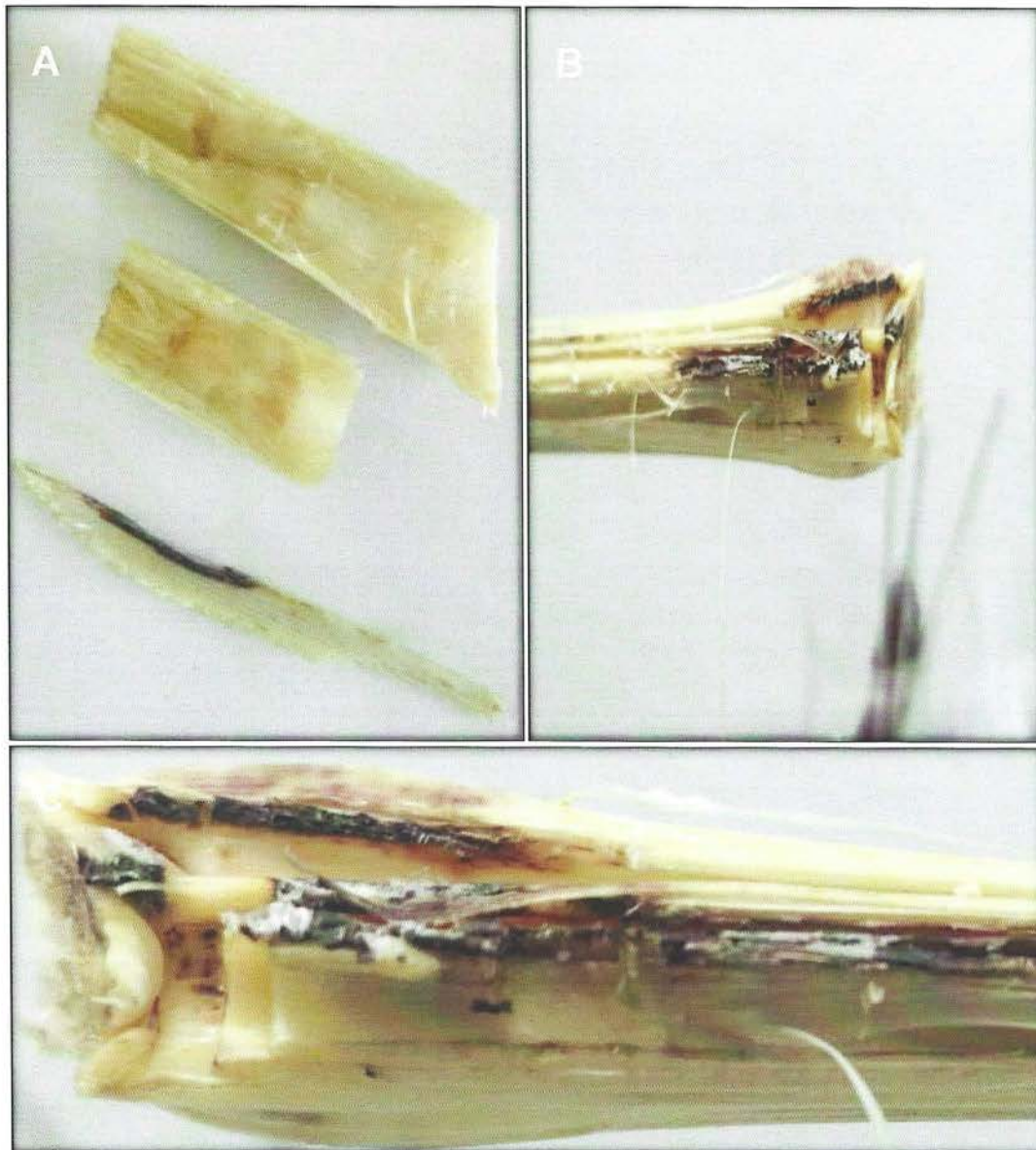


Figura 15. Signos presentados en plantas de caña de azúcar después de la inoculación con *Fusarium sacchari*. (A): Coloraciones rojizas y café oscuro situadas en los entrenudos. (B, C): Presencia de crecimiento de tejido micelial en la base del tallo (Elaboración propia).

A partir de los signos recuperados se realizó el reaislamiento en medio de cultivo PDA, en donde se observó características morfológicas similares a *Fusarium sacchari* muestras provenientes de raíces y tallos (Figura 16). Posteriormente, los resultados moleculares (Anexo III) realizados identificaron a

Fusarium sacchari en los reisolamientos realizados a las plantas inoculadas con el patógeno.

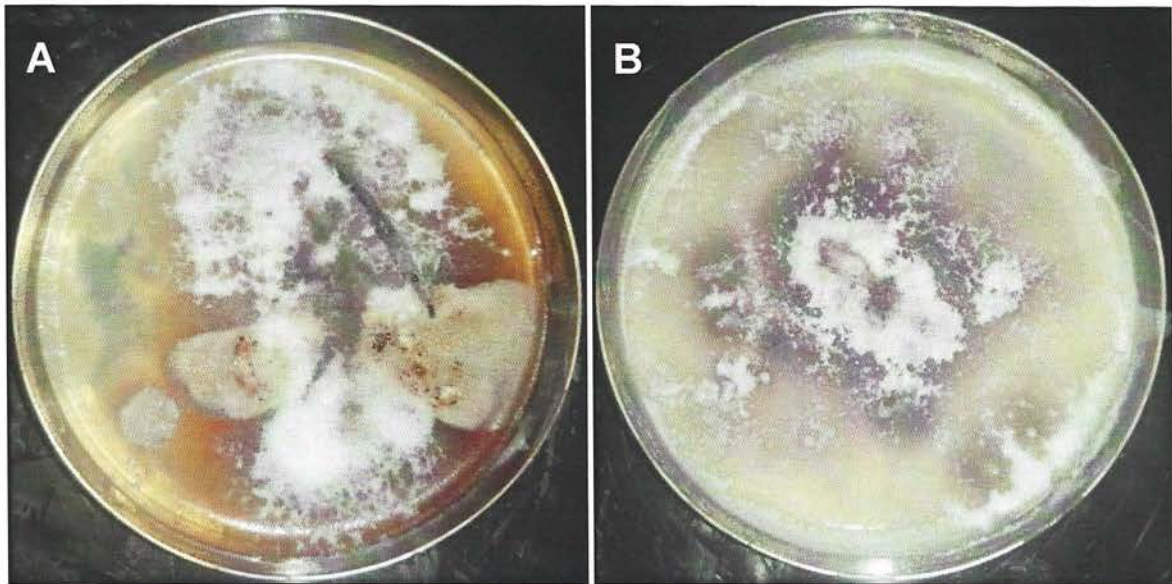


Figura 16. Reisolamientos de *Fusarium sacchari* provenientes de tejidos de caña de azúcar con síntomas de Pokkah Boeng. (A): Reisolamiento de raíces de caña de azúcar. (B): Reisolamiento de tallos de caña de azúcar, Ingenio Taboga (Elaboración propia).

1.4 Etapa experimental IV: Prueba de antagonismo *in vitro*

En la Figura 17, se puede observar de izquierda a derecha, el tratamiento control que corresponden a *Trichoderma* spp. En el centro se ubica el cultivo dual, mientras que al lado derecho se encuentra el tratamiento testigo correspondiente a *Fusarium sacchari*.

En el extremo izquierdo se indica la cepa de *Trichoderma* spp., que se evaluó. Por su parte, en el cultivo dual, el de lado izquierdo es *Trichoderma* spp., mientras que el del lado derecho es el patógeno.

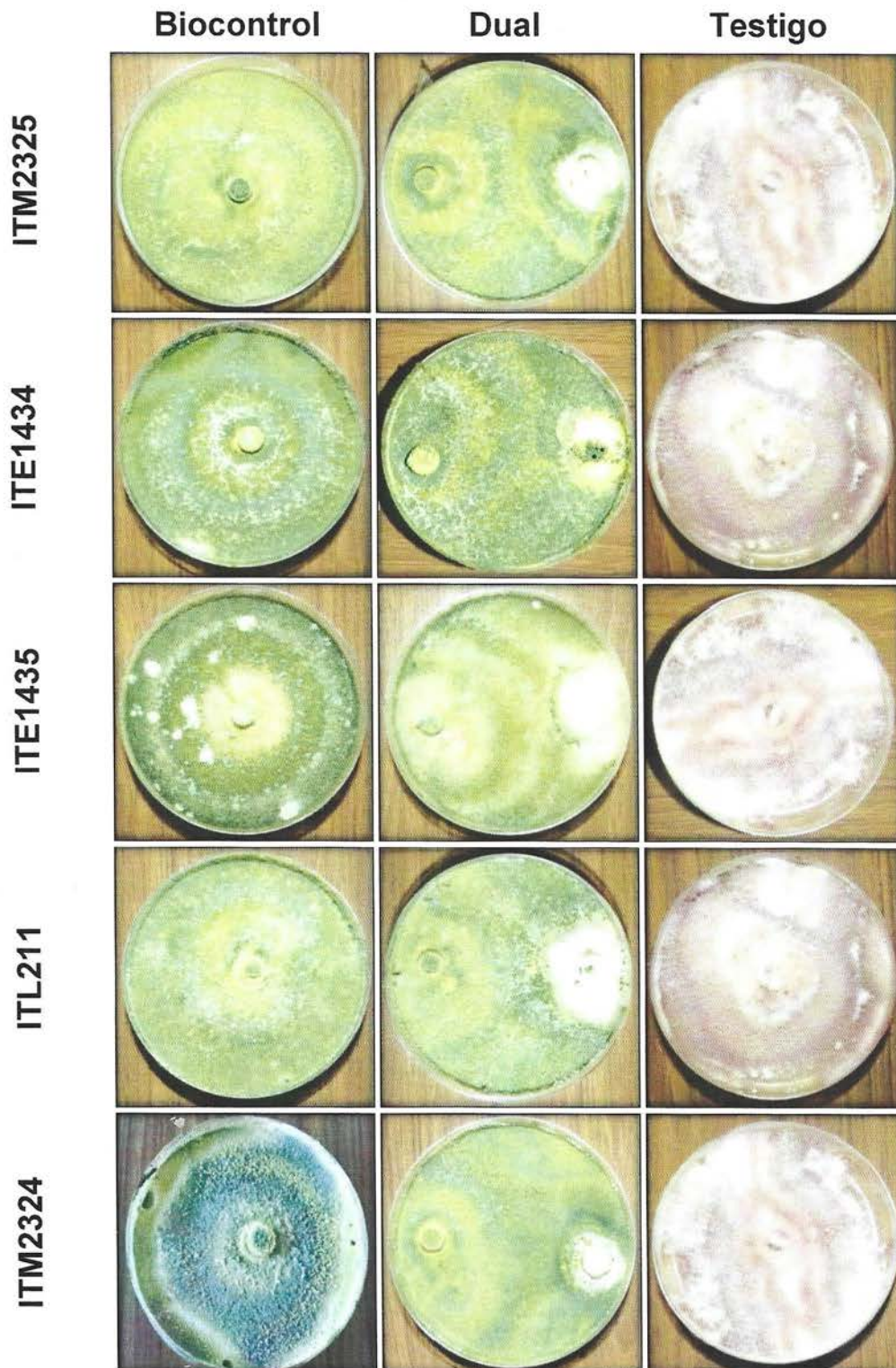


Figura 17. Prueba de antagonismo *in vitro* de correspondiente a cada cepa de *Trichoderma spp.*, versus *Fusarium sacchari*, en comparación con el testigo y el biocontrolador, CIA (Elaboración propia).

Se determinó el porcentaje de inhibición, descrito en el apartado 1.4.4 del Capítulo IV. En la Figura 18, se presentan los porcentajes de inhibición obtenidos de cada una de las cepas evaluadas de *Trichoderma* spp., versus al patógeno *Fusarium sacchari*. Posteriormente se procedió a realizar un análisis estadístico no paramétrico por medio de la prueba de Kruscall Wallis, en donde no se encontró diferencias significativas entre las cepas de *Trichoderma* spp., con respecto a la inhibición del crecimiento del hongo *Fusarium sacchari*, ($H=0,2854$, $p>0,05$).

En el Cuadro 9, se describe la escala de la evaluación *in vitro* de la actividad antagonista del hongo *Trichoderma* spp., las cepas ITE1435 y ITL211 presentaron un crecimiento ligeramente menor con respecto a las cepas ITM2324, ITM2325 y ITE1434. Sin embargo, todas las cepas presentaron un crecimiento adecuado por arriba del 75% en cuestión de espacio.

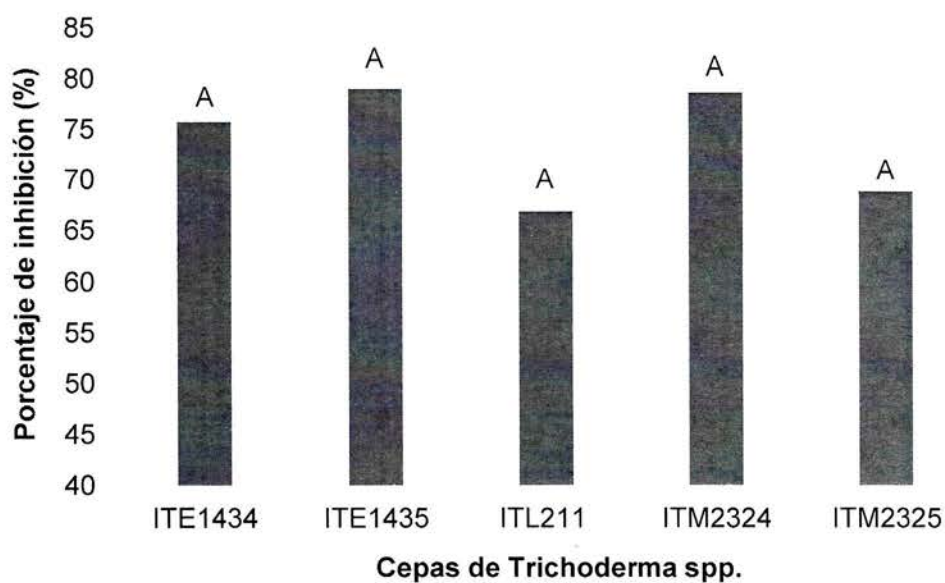


Figura 18. Porcentaje de inhibición de *Trichoderma* spp., versus *Fusarium sacchari* bajo condiciones *in vitro* en modalidad de prueba dual, CIA (Elaboración propia).

Cuadro 9. Evaluación *in vitro* de la capacidad antagonista de *Trichoderma* spp., según la escala de (Guigón y González 2004).

Cepa de <i>Trichoderma</i> spp.	Escala	Descripción
ITE1434	5	<i>Trichoderma</i> spp. sobrecrece al patógeno ocupando el 100% de la caja.
ITL211	4	<i>Trichoderma</i> spp. sobrecrece al patógeno inhibiéndolo y ocupando un 75% de la caja
ITM2324	5	<i>Trichoderma</i> spp. sobrecrece al patógeno ocupando el 100% de la caja.
ITM2325	5	<i>Trichoderma</i> spp. sobrecrece al patógeno ocupando el 100% de la caja.
ITE1435	4	<i>Trichoderma</i> spp. sobrecrece al patógeno inhibiéndolo y ocupando un 75% de la caja

1.5 Etapa experimental V: Prueba de campo

Se evaluó el efecto biocontrolador de *Trichoderma* spp., sobre la incidencia y severidad de la enfermedad Pokkah Boeng a nivel de campo, de cada una de las cepas de *Trichoderma* spp., aisladas. Este procedimiento se realizó según lo descrito en el apartado 1.5 del Capítulo IV. Las evaluaciones se realizaron durante 120 días con intervalos de muestreo de 15 días. Posteriormente, se realizó el análisis estadístico no paramétrico mediante la prueba de Kruscall Wallis, en la cual se determinó para la variable de incidencia el valor de $H=0,0239$ siendo $p<0,05$ por lo tanto, los tratamientos evaluados son diferentes (Figura 19).

La misma condición se presentó en la variable de severidad, ya que el valor de fue $H=0,0053$ siendo $p<0,05$. Se tomaron los datos y se procedió a realizar una

prueba de diferencia mínima significativa para cada una de las variables (Figura 20).

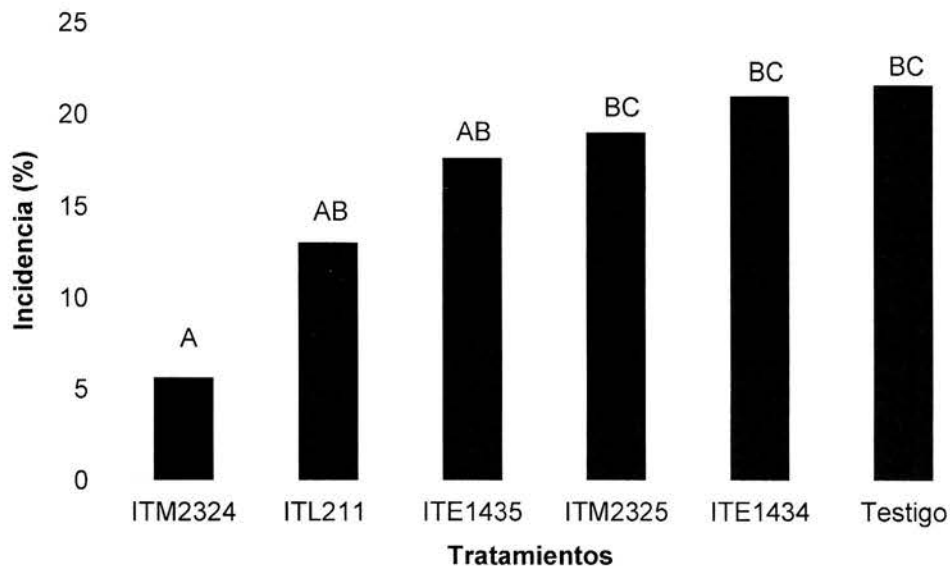


Figura 19. Incidencia promedio de síntomas de Pokkah Boeng en plantas de caña de azúcar en Ingenio Taboga (Elaboración propia).

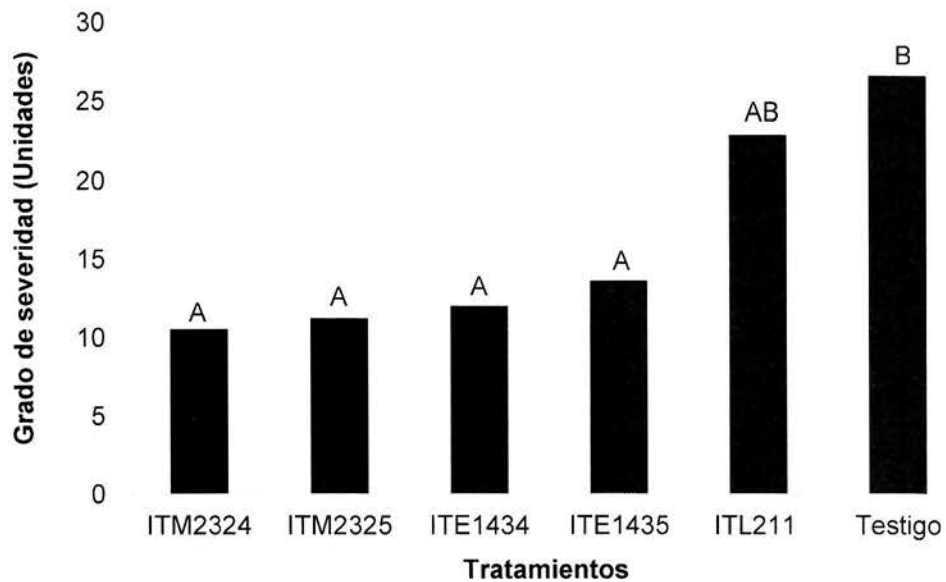


Figura 20. Grado de severidad para los síntomas de Pokkah Boeng en plantas de caña de azúcar en Ingenio Taboga (Elaboración propia).

CAPÍTULO VI: DISCUSIÓN

1.1 Etapa experimental I: Aislamiento de *Trichoderma* spp., en medio de cultivo

La presencia de *Trichoderma* spp., en las muestras de suelo tomadas en los lotes M-2, L-2, E-14, indica la diversidad y versatilidad que tiene este hongo en el suelo ya que se recuperó de agroecosistemas con distinto manejo agronómico, propiedades físicas, químicas y microbiológicas. Yuan Jiang y colaboradores (2016), indican que las especies de *Trichoderma* spp., están ampliamente distribuidas en diversos ecosistemas. Asimismo, Seokyoon Jang *et al.* (2017) reporta que *Trichoderma* spp., se puede aislar fácilmente en el suelo, madera, aire, e incluso otros hongos como micoparásito.

Otros estudios indican que las poblaciones de *Trichoderma* spp., se encuentran favorecidas en hábitats que contengan altos contenidos de materia orgánica, desechos vegetales en descomposición, y alta influencia de raíces (Chaves 2006). Sin embargo, las muestras que se tomaron en los lotes I-5 y K-1 no reportaron la presencia de *Trichoderma* spp. Este resultado no se puede atribuir a una causa directa ya que son múltiples los factores que pueden intervenir en el aislamiento. Pavone y Blas (2014), informaron que la generalización de la diversidad de especies de *Trichoderma* spp., se ha tornado complicada ya que es dependiente de componentes microclimáticos, disponibilidad de sustratos, asociaciones rizosféricas, química del suelo e interacciones ecológicas, también la introducción de especies invasivas, agentes de control biológico y perturbaciones agrícolas pueden producir cambios en los patrones de distribución. Por lo tanto, se puede concluir que la baja o nula diversidad presentada en las muestras I-5 y K-1 puede estar relacionada con los factores y perturbaciones anteriormente mencionadas.

La distribución de especies de *Trichoderma*, es tan influyente que se encuentra alrededor de todo el mundo y cuenta con unas 200 especies identificadas (Seokyoon Jang *et al.* 2017). Ante ello, la clasificación de las

especies se establecía sobre caracteres morfológicos causando problemas en la identificación, en la actualidad con el uso de técnicas moleculares el proceso de identificación y clasificación es eficiente, ya que se emplea el análisis de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para su comparación con las secuencias depositadas en las bases de datos (GenBank, TrichoBlast), lo que facilita la identificación de las especies aisladas de *Trichoderma* spp., (Martínez *et al.* 2013).

El resultado de los análisis moleculares identificó a *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma virens*, como las especies aisladas (Cuadro 6 y Anexo II). *Trichoderma asperellum*, se describió como una nueva especie en 1999 por Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg (Mycobank 2018) ^b. A su vez, *Trichoderma virens*, se describió por primera vez en 1987 por J.H. Miller, Giddens & A.A. Foster, (Mycobank 2018) ^c.

Ambas especies han sido estudiadas por diferentes investigadores que reportan que poseen características antagónicas contra enfermedades ya que poseen propiedades micoparasíticas y antibióticas (Argumedo-Delira *et al.* 2009), específicamente, *Trichoderma asperellum* ejerce antibiosis y micoparasitismo a *Fusarium solani* y *Fusarium dlamini* en el cultivo de frijol, en un estudio realizado en Cuba (Duarte-Leal *et al.* 2018). Por su parte, *Trichoderma virens* se ha reportado con características endofíticas en la raíz de caña de azúcar, se le asocia su eficacia como controlador biológico a la generación de enzimas quitinasas, demostrando un gran potencial para combatir enfermedades (Romão-Dumaresq *et al.* 2012).

1.2 Etapa experimental II: Recuperación de *Fusarium* spp., en medio de cultivo

Se recuperó una cepa de *Fusarium sacchari*, proveniente de plantas de caña de azúcar con síntomas de Pokkah Boeng. *Fusarium sacchari* fue descrito por E. J. Butler en 1971 (Mycobank 2018) ^a. Se reporta este género como parásito facultativo de numerosos hospederos en los que se incluyen plantas, humanos y animales (Camacho y Gil 2008). Este patógeno, se distribuye principalmente en

las zonas productoras de caña de azúcar en el mundo. Sin embargo, diversos estudios realizados en Japón, Australia y Estados Unidos han reportado la incidencia de *Fusarium sacchari* en diversos cultivos (orquídeas, maíz, sorgo, respectivamente) (Martínez *et al.* 2015).

Otros estudios realizados en Malasia Peninsular recalcan que las consecuencias de Pokkah Boeng en el cultivo de caña de azúcar representa una reducción en la producción de azúcar de un 40,8 a 64,5%, por lo cual, se entiende que la versatilidad del patógeno como agente causal puede representar consecuencias económicas importantes (Siti Nordahliawate *et al.* 2008).

1.3 Etapa experimental III: Prueba de patogenicidad

Los signos observados después de la inoculación de *Fusarium sacchari* en plantas aparentemente sanas también son descritos por Zhenyue Lin *et al.* (2014), Vishwakarma *et al.* (2013) y Goswami *et al.* (2012), en donde enfatizan signos predominantes como arrugamiento, retorcimiento y acortamiento de hojas, tejidos cloróticos con rayas o manchas rojizas, y en casos graves, necrosis localizada en el cogollo y posterior muerte del meristemo apical.

Diversos autores han debatido sobre la identificación del agente causal del Pokkah Boeng. Estudios antiguos atribuyen a *Fusarium moniliforme* como agente causal, sin embargo, estudios recientes sugieren a *Fusarium sacchari*, *Fusarium fujikuroi*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium andiyazi*, y *Fusarium proliferatum* como agentes causales (Hilton *et al.* 2017), en China determinaron que los patógenos causales de esta enfermedad son dos especies, *Fusarium verticillioides* y *Fusarium proliferatum* (Zhenyue Lin *et al.* 2014), en India, reportan a *Fusarium moniliforme* como agente causal (Vishwakarma *et al.* 2013). Siti Nordahliawate *et al.* (2008), estudió la distribución y la caracterización morfológica y patogénica de *Fusarium sacchari* en Malasia Peninsular, donde concluyeron que el patógeno tiene una amplia distribución ya que se encontró en 7 provincias y se confirmó mediante pruebas de patogenicidad que *Fusarium sacchari* es el agente causal de Pokkah Boeng.

Por su parte, Ploetz (2005), estudio las enfermedades tropicales inducidas por *Fusarium* spp. en cultivos perennes, en el cual reportó a *Fusarium sacchari* como agente causal de Pokkah Boeng en caña de azúcar, enfatiza que, *Fusarium sachhari* se puede confundir con *Fusarium subglutinans* y que no se identifica de manera confiable, sino se emplean análisis con marcadores moleculares.

Se puede decir que la identificación del agente causal de Pokkah Boeng es disperso y ambiguo, ya que diferentes estudios realizados en otras regiones del mundo reportan especies distintas de *Fusarium* como agente causal. Sin embargo, la utilización de análisis moleculares mediante PCR o pruebas de patogenicidad pueden validar de manera más confiable la identificación del agente causal, dado el caso, en esta investigación se identificó a *Fusarium sacchari* como agente causal de Pokahh Boeng según los signos observados (Figura 14, 15), la recuperación del patógeno en medio de cultivo PDA y la identificación molecular después de la infección.

La expresión de los signos observados se puede atribuir a la amplia distribución del patógeno, la capacidad de crecimiento en diversos sustratos y el eficaz mecanismo de dispersión mediante la adherencia, le confiere la habilidad de colonizar rápidamente los tejidos vegetales y la producción de toxinas (Camacho y Gil 2008).

La presencia de deformaciones o enrollamientos formados en las hojas o tallos son causados por los complejos enzimáticos producidos por las diferentes especies de *Fusarium* spp., que poseen la capacidad de producir el complejo de enzimas polisacaridasas (pectinliasas, celulasas, arabinasas, poligaracturonidasas) que pueden alterar o degradar los polisacáridos presentes en las paredes celulares (Camacho y Gil 2008).

Durante la prueba de patogenicidad se observó en muy baja frecuencia síntomas de marchitez. Este mismo, ha sido poco estudiado y asociado a la enfermedad de Pokkah Boeng. Sin embargo, un estudio reciente realizado en la India aisló los patógenos causales en plantas con síntomas de marchitamiento y Pokkah Boeng, la mayoría de los resultados moleculares reportaron a *Fusarium sacchari* y solo en algunos de ellos reportó a *Fusarium proliferatum*. Por lo tanto, concluyeron que todos los aislamientos realizados están asociados a *Fusarium sacchari* y que la misma planta de caña de azúcar puede desarrollar los dos síntomas juntos (marchitez, Pokkah Boeng) infligidos por el mismo patógeno (Viswanathan *et al.* 2017).

1.4 Etapa experimental IV: Prueba de antagonismo *in vitro*

Todas las cepas de *Trichoderma* spp., presentaron la misma capacidad de inhibición del crecimiento contra el patógeno *Fusarium sacchari* (Figura 18), se ha reportado que los mecanismos antagónicos que utiliza *Trichoderma* spp., para la inhibición de patógenos son competencia, antibiosis y micoparasitismo, con la anotación que ninguno de estos mecanismos es excluyente (López-Ferrer *et al.* 2017).

Trichoderma spp., puede inhibir el crecimiento de otros hongos y bacterias mediante la producción varios metabolitos secundarios volátiles y no volátiles como la gliotoxina, viridina, gliovirina a lo que se llama antibiosis (López-Ferrer *et al.* 2017). Seokyoon Jang *et al.* (2017), menciona que este hongo biocontrolador produce una serie de metabolitos secundarios y una variedad de enzimas. Los metabolitos secundarios incluyen antibióticos, que actúan contra hongos y bacterias y pueden ser utilizados como agentes de control biológico para patógenos.

Se deduce que la implicación de estos mecanismos de acción se desarrolló durante la prueba de antagonismo, ya que el porcentaje de inhibición rondó entre 65 y 80 %, sin embargo, la competencia por espacio y nutrientes entre los

organismos fue el modo de acción más importante, ya que no se desarrolló el crecimiento micelial del patógeno a diferencia del que se observó en el tratamiento testigo.

La competencia es un comportamiento desigual de dos o más organismos ante un mismo requerimiento (nitrógeno, carbohidratos, azúcares, polisacáridos, microelementos), este tipo de antagonismo está favorecido sobre las características del agente de control biológico como plasticidad ecológica, velocidad de crecimiento y desarrollo, además que influyen directamente factores externos como tipo de suelo, pH, temperatura, humedad (Infante *et al.* 2009).

1.5 Etapa experimental V: Prueba de campo

Se obtuvo que los tratamientos a prueba presentaron diferencias significativas en las variables de incidencia y severidad. El tratamiento ITM2324 (*Trichoderma asperellum*, proveniente del lote M-2) se destacó por presentar la menor incidencia siendo uno de los mejores tratamientos.

Seguidamente, los tratamientos ITL211 (*Trichoderma asperellum*, proveniente del lote L-2) y ITE1435 (*Trichoderma virens*, proveniente del lote E-14) presentaron una incidencia media.

Los tratamientos ITM2325 (*Trichoderma asperellum*, proveniente del M-2), ITE134 (*Trichoderma virens*, proveniente del E-14) y el Testigo presentaron una incidencia alta de síntomas de Pokkah Boeng.

Con respecto a la severidad, los tratamientos ITM2324, ITM2325, ITE1434, ITE1435 no presentaron diferencias significativas entre ellos con valores bajos de severidad, por su parte, los tratamientos ITL211 y Testigo presentan los índices de severidad más elevados y no tienen diferencias significativas entre ellos.

Se puede indicar que la cepa ITM2324 desarrolló el mejor biocontrol con respecto al tratamiento testigo en cuantificación de la incidencia y severidad de síntomas de Pokkah Boeng. Los demás tratamientos ejercieron biocontrol, pero no fue homogéneo, ya que solamente se destacan en solo una de las variables.

En otras investigaciones se ha reportado que el mayor éxito de las aplicaciones de *Trichoderma* spp., para el control biológico de enfermedades de suelo se registra en patógenos como: *Rhizoctonia solani*; *Sclerotium rolfsii*; *Sclerotinia sclerotiorum*; *Fusarium* spp., y *Pythium* spp., (Infante *et al.* 2009). Así mismo, afirman que la utilización de cepas nativas de *Trichoderma* spp., en suelos agrícolas probablemente sean agentes de control biológico más efectivos, ya que ya están adaptados a condiciones de campo variable (Yuan Jiang *et al.* 2016).

El efecto de *Trichoderma* spp., sobre *Fusarium sacchari* puede estar relacionado a mecanismos de defensa, estudios recientes han indicado que ciertas cepas de *Trichoderma* pueden inducir resistencia sistémica y localizada a varios patógenos de plantas, la colonización de las raíces con cepas de *Trichoderma* spp., puede aumentar los niveles de enzimas vegetales relacionadas con la defensa, incluyendo peroxidasas, quitinasas, β -1-3glucanasas, formación de callos enriquecidos en las paredes de los sitios de penetración de hongos y proteínas relacionadas con la patogénesis (Altinok y Erdogan 2015).

Dado el amplio control biológico que puede ejercer *Trichoderma* spp., sobre los patógenos causales de muchas enfermedades, las investigaciones actuales se dedican a determinar los mecanismos de acción específicos que pueden ejercer según su especie, mediante análisis moleculares. Un estudio realizado por Qiong *et al.* (2017), determinó los mecanismos de control biológico que ejerce *Trichoderma asperellum* en el biocontrol de *Fusarium oxysporum*. Los autores llegaron a la conclusión que el hongo reúne todos los mecanismos de acción en forma global (micoparasitismo, resistencia inducida y antibiosis). *Trichoderma asperellum* secreta enzimas específicas como quitinasa, glucanasa y proteasa que son capaces de degradar las paredes celulares de algunos patógenos. Las xilanasas pueden inducir resistencia a la planta, también es responsable por la producción de nueve metabolitos secundarios, siendo precursores de compuestos antimicrobianos.

Consecuentemente, en Brasil se realizaron estudios para determinar la interacción de diversos hongos en cultivos de caña de azúcar convencional y

transgénica, específicamente la interacción de *Trichoderma virens* como endófito y la planta huésped. Se obtuvo que la interacción de este hongo no produjo ningún cambio fenotípico en la planta huésped, pero se encontró que se formó una cubierta micelial densa en las raíces de la caña que fue capaz de penetrar los espacios intercelulares de las capas superiores de la epidermis de la raíz, por lo tanto, se concluyó que *Trichoderma virens*, tiene una enorme capacidad de colonizar raíces y un enorme potencial para proteger la salud de las plantas como la caña de azúcar mediante mecanismos de inhibición de patógenos o estimulando la resistencia inducida (Romão-Dumaresq *et al.*2016).

Tomando en cuenta la información generada por estos últimos estudios de los autores citados, se puede decir que los mecanismos de acción específicos que estuvieron implicados en el control biológico de *Fusarium sacchari* en la prueba de campo, requiere de muchos más estudios a nivel molecular, sin embargo, lo que reporta la literatura por muchas investigaciones realizadas en el pasado, es la capacidad de biocontrol que tiene *Trichoderma* spp., sobre patógenos del género *Fusarium* spp., en donde destacan la antibiosis, competencia y micoparasitismo (López-Ferrer *et al.* 2017).

CAPÍTULO VII: CONCLUSIONES

- Se aisló 2 cepas de *Trichoderma virens* (ITE1434, ITE1435), y 3 cepas de *Trichoderma asperellum* (ITM2324, ITL211, ITM2325), provenientes de agroecosistemas con modalidad de rotación arroz-caña de azúcar característico de suelos arcillosos.
- A partir de plantas con síntomas de Pokkah Boeng, se aisló el presunto agente causal, *Fusarium sacchari*, obteniendo una cepa proveniente de tallos infectados.
- Se comprobó mediante una prueba de patogenicidad que *Fusarium sacchari* es el agente causal de la enfermedad Pokkah Boeng, para ello se observó el comportamiento de la planta, la expresión y el desarrollo de los signos en plantas infectadas con *Fusarium sacchari*. Posteriormente se volvió a aislar el patógeno y se identificó a *Fusarium sacchari* mediante análisis de PCR. Por lo tanto, se validó la patogenicidad como agente causal de Pokkah Boeng.
- Se determinó que las cinco cepas nativas de *Trichoderma* spp., no presentan diferencias significativas en cuanto a la capacidad de inhibición *in vitro* contra el patógeno *Fusarium sacchari*.
- Se encontró que las cepas nativas de *Trichoderma* spp., presentan diferencias significativas en cuanto a la incidencia y severidad de Pokkah Boeng en la prueba de campo, la cepa ITM2324 presentó la menor incidencia y severidad, siendo la más eficiente en el biocontrol.
- Se determinó que la incidencia de Pokkah Boeng en campo, puede ser atenuada con aplicaciones de *Trichoderma* spp., ya que el biocontrol que ejerce este agente con respecto al testigo absoluto es de un 11.41% en la disminución de la incidencia de la enfermedad. Consecuentemente, la severidad de la enfermedad disminuye significativamente.

CAPÍTULO VIII: RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar más estudios acerca de la diversidad, distribución, comportamiento poblacional y morfológico de *Trichoderma* spp., en agroecosistemas rotacionales, ya que puede llegar a ser una herramienta útil para el control biológico, aumento de microbiota, generación de materia orgánica, entre otros.
- Se recomienda realizar otras investigaciones acerca de la interacción ambiente-clima-hospedero entre *Fusarium sacchari* y la enfermedad Pokkah Boeng.
- Se recomienda realizar pruebas de validación para la identificación del agente causal de Pokkah Boeng, ya que no se han reportado patrones específicos de comportamiento, sino que puede variar según las regiones y las condiciones climáticas, entre otras.
- Se recomienda realizar investigaciones que estudien acerca de los síntomas de marchitez asociados a la enfermedad de Pokkah Boeng.
- Se recomienda la utilización de cepas nativas de *Trichoderma* spp., para el biocontrol de Pokkah Boeng en el cultivo de caña de azúcar, ejerce una disminución significativa en la incidencia y la severidad.

LITERATURA CITADA

- Altinok H., Erdogan O. 2015. Determination of the *in vitro* Effect of *Trichoderma harzianum* on Phytopathogenic Strains of *Fusarium oxysporum*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 43 (2): 494 – 500.
- Angulo A., Chaves M., Barrantes J., Rodríguez M., Calderón G., Alfaro R., Chavarría E., Rodríguez J. 1999. Limitantes para la producción de caña de azúcar en costa rica durante 1997: la opinión del agricultor. Dirección de Investigación y Extensión de la Caña de Azúcar (DIECA-LAICA), Costa Rica.
- Argumedo R., *et al.* 2009. El Género Fúngico *Trichoderma* y su Relación con Contaminantes Orgánicos e Inorgánicos. *Revista Internacional Contaminación Ambiental* 25(4): 257 – 269.
- Barrantes M., Molina J. 2007. Determinación de los cambios físicos, químicos y microbiológicos causados por la rotación arroz-caña de azúcar en un suelo Typic haplustert en Guanacaste, Costa Rica. Tesis de Maestría. Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 66 p.
- Benadof D. 2010. *Fusarium* especie. *Revista Chilena de infectología* 27(4): 327-328 p.
- Camacho N., Gil J. 2008. Evaluación preliminar de modelos de infección cruzada por *Fusarium* spp., aislados de procesos patológicos en plantas, animales y humanos. Tesis para optar al título de Microbiólogo Agrícola y Veterinario y Microbiólogo Industrial. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. 31 p.
- Camarena G. 2001. Señales entre hongos patógenos y plantas hospederas resistentes. *Revista Chapingo* 7(1): 15-19 p.
- Chaves M. 2006. Producción de *Trichoderma* spp., y la evaluación de su efecto en el cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Tesis de grado. Colombia, Pontificia Universidad Javeriana. 32 p.

- Chaves M., Bermúdez L. 2015. Agroindustria azucarera costarricense: un modelo organizacional y productivo efectivo con 75 años de vigencia. Congreso de la Caña de Azúcar (10, 2015, Cali, Colombia). Asociación Colombiana de Técnicos de la Caña de Azúcar. 159-171 p.
- Colón V. 2018. La Industria del azúcar en el Siglo XVI (en línea). Puerto Rico. Consultado 15 oct 2018. Disponible en <https://enciclopediapr.org/mensaje-del-director/>
- Cubillos J., Valero N., Mejía L. 2009. *Trichoderma harzianum* como promotor del crecimiento vegetal del maracuyá (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener). Revista Agronomía Colombiana 27(1).
- Díaz L., Portocarrero T. 2002. Manual de producción de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Tesis de Licenciatura. Honduras, Zamorano. 20 p.
- Duarte Y., Pozo L., Martínez B. 2018. Antagonismo *in vitro* de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt & Nirenberg frente a aislados de *Fusarium* spp. Revista de Protección Vegetal 33(1): 1-11.
- FAO. 2018. Buenas prácticas agrícolas (BPA) y Buenas prácticas de manufactura (BPM) en la producción de caña y panela. Colombia, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Consultado 15 oct 2018. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/pdf/010/a1525s/a1525s04.pdf>
- Goswami D., Jyoti P. and Deka, S. 2014. Rhamnolipid biosurfactant against *Fusarium sacchari*: The causal organism of Pokkah Boeng disease of sugarcane. Journal of Basic Microbiology 54: 548 – 557.
- Govender P., Mcfarlane A., Rutherford R. 2010. *Fusarium* species causing Pokkah Boeng and their effect on *Eldana Saccharina* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). South African Sugarcane Research Institute 83: 267-270.

- Guigón C., González A. 2004. Selección de Cepas Nativas de *Trichoderma* spp. con actividad antagónica sobre *Phytophthora capsici* Leonian y promotoras de crecimiento en el cultivo de Chile (*Capsicum annuum* L.) Revista Mexicana de Fitopatología 22 (1): 117-124 p.
- Hernández F., Valencia A., Toledo J., Hernández H. 2013. El sector cañero en Nayarit desde una perspectiva organizacional y ambiental. Nayarit, México, Fundación Universitaria Andaluza Inca Garcilaso. 5 p.
- Hilton A., Zhang H., Yu H., Won-Bo Shim. 2017. Identification and characterization of pathogenic and endophytic fungal species associated with Pokkah Boeng disease of sugarcane. Plant Pathology 33(3): 238-248.
- Infante D., Martínez B., González N., Reyes Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Revista Protección Vegetal 24(1): 14-21 p.
- Jiang Y., Wang L., Chen J., Mao J., Feng X., Zhang C., Fu-Chen L. 2016. *Trichoderma* Biodiversity of Agricultural Fields in East China Reveals a Gradient Distribution of Species. Plos One 11(8).
- León J., Arrollo N. 2010. Desarrollo histórico del sector agroindustrial de la caña de azúcar en el siglo XX: aspectos económicos, institucionales y tecnológicos. Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.
- León J., Arroyo N. 2012. Desarrollo histórico del sector agroindustrial de la caña de azúcar en el Siglo XX: aspectos económicos, institucionales y tecnológicos. San José, Costa Rica, Instituto de Investigaciones en Ciencias Económicas. 14 p.
- Lin Z., Xu S., Que Y., Wang J., Comstock C., Jinjin W., McCord., Baoshan C., Rukai C., Muqing Z. 2014. Species-Specific Detection and Identification of *Fusarium* Species Complex, the Causal Agent of Sugarcane Pokkah Boeng in China. PLOS ONE 9(8).

- López C., Brito H., López D., Salaya J. 2017. Papel de *Trichoderma* en los Sistemas Agroforestales-Cacaotal como un Agente Antagónico. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 20: 91 – 100.
- López D., López M., Estrada G. 2004. Especies de *Fusarium* de Cuba sobre nuevos sustratos. *Revista Protección Vegetal* 19 (1): 14-18 p.
- López J. 2015. La caña de azúcar para la producción de panela. Caso: Nordeste del departamento de Antioquia. Tesis de Lic. Colombia, Universidad Nacional Abierta y a Distancia (UNAD). 35 p.
- Martínez B., Infante D., Reyes Y. 2013. *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista Protección Vegetal* 28(1): 1-11 p.
- Martínez E., Martínez P., Guillén D., Peña G., Hernández M. 2015. Diversidad de *Fusarium* en las raíces de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en el estado de Morelos, México. *Revista Mexicana de micología* 42: 33-43 p.
- Ministerio de agricultura y ganadería (MAG) ^a. 2007. Agrocadena de la caña de azúcar para la producción de dulce. Documento informativo, Puriscal, Costa Rica.
- Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) ^b. 2007. Plan regional de desarrollo sector productivo Chorotega 2007-2010. Documento informativo, Guanacaste, Costa Rica.
- Mycobank (International Mycological Association) ^a. 2018. *Fusarium sacchari* (en línea). Utrecht, Países Bajos, Centro de Biodiversidad de Hongos. Consultado 15 oct 2018. Disponible en <http://www.mycobank.org/Biolomics.aspx?Table=Mycobank&Rec=10945&Fields=All>
- Mycobank (International Mycological Association) ^b. 2018. *Trichoderma asperellum* (en línea). Utrecht, Países Bajos, Centro de Biodiversidad de Hongos. Consultado 15 oct 2018. Disponible en <http://www.mycobank.org/BioloMICSDetails.aspx?Rec=52833>

- Mycobank (International Mycological Association) ©. 2018. *Trichoderma virens* (en línea). Utrecht, Países Bajos, Centro de Biodiversidad de Hongos. Consultado 15 oct 2018. Disponible en <http://www.mycobank.org/BioloMICSDetails.aspx?Rec=43090>
- Oerke C. 2006. Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science* 144(1): 31-43 p.
- Pavone D., Dorta B. 2015. Diversidad del hongo *Trichoderma* Spp. en plantaciones de maíz de Venezuela. *INTERCIENCIA* 40(1): 1 – 9.
- Perniola O. Staltari S., Chorzempa S., Astiz M., Del Carmen M. 2014. Control biológico de *Fusarium graminearum*: utilización de *Trichoderma* spp. y biofumigación con parte aérea de *Brassica juncea*. *Revista Facultad De Ciencias Agrarias* 46(2): 45-56 p.
- Ploetz, R. C. 2006. Fusarium-induced diseases of tropical, perennial crops. *Phytopathology* 96: 648-652.
- Qiong W., Ruiyan S., Mi N., Jia Y., Yaqian L., Chuanjin Y., Kai D., Jianhong R., Jie C. 2017. Identification of a novel fungus, *Trichoderma asperellum* GDFS1009, and comprehensive evaluation of its biocontrol efficacy. *PLOS ONE* 12(6).
- Rodríguez F. 2013. Identificación de *Fusarium* asociadas a semillas de ajo provenientes de Zacatecas, México. Tesis de Lic. México, Universidad Autónoma Agraria de Antonio Narro. 36 p.
- Rodríguez M. 2001. Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. *Acta Zool. Mex.* 1: 53-78 p.
- Romão-Dumaresq A., de Araújo W., Talbot N., Thornton C. 2012. RNA Interference of Endochitinases in the Sugarcane Endophyte *Trichoderma virens* 223 Reduces Its Fitness as a Biocontrol Agent of Pineapple Disease. *PLOS ONE* 7(10): 1 - 13.

- Sánchez Hernández, L., R. M. Arias Mota, J. E. Rosique Gil y C. J. Pacheco Figueroa. 2018. Diversidad del género *Trichoderma* (Hypocraceae) en un Área Natural Protegida en Tabasco, México. *Acta Botanica Mexicana* 123: 167-182.
- Schuster A., Schmoll M. 2010. Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Microbiology Biotechnology* 87: 787-799 p.
- Seokyoon J., Yeongseon J., Chulwhan K., Hanbyul L., Joo-Hyun H., Young M., Young M., Dong W., Hyang B., Jae-Jin K. 2017. Five new records of Soil-Derived *Trichoderma* in Korea: *T. albolutescens*, *T. asperelloides*, *T. orientate*, *T. spiraie*, and *T. tomentosum*. *Mycobiology* 45(1): 1-8.
- Serna-Cock L., Arias-García C., Hernández L. 2011. Efecto de la biofertilización sobre el crecimiento en maceta de plantas de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). *Biotecnología en el sector agropecuario y agroindustrial* 9(2): 85-95 p.
- Silva E. Braga F. Ribeiro A., Oliveira W., Araújo J. 2015. Producción de conidios y clamidosporas de los hongos *Duddingtonia flagrans* y *Monacrosporium thaumasium* en diferentes medios sólidos. *Arquivos do Instituto Biológico*, 82: 1-5 p.
- Singh A., Chauhan S., Singh A., Singh B. 2006. Deterioration in Sugarcane Due to Pokkah Boeng Disease. *Sugar tech* (2)3: 187-190 p.
- Siti Nordahliawate B., Mohamed S. ^a. 2007. Pathogenicity and Aethiology of Fusarium Species Associated with Pokkah Boeng Disease on Sugarcane. Thesis submitted in fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science. Universiti Sains Malaysia. Penang, Malasia: 19 p.
- Siti Nordahliawate, M.S., Nur Ain Izzati, M.Z., Atmi, A.R. and Salleh, B. 2008. Distribution, Morphologieal Characterization and Pathogenidty of *Fusarium sacchari* Associated with Pokkah Boeng Disease of Sugarcane in Peninsular Malaysia. *Pertanika L. Trop. Agric. Sci.* 31(2): 279 – 286.

- Tan S. 2013. Morphological characterization and sequence analysis of 5.8s-its region of *Trichoderma* species. Project of degree of Bachelor of Science. Malaysia, Universiti Tunku Abdul Rahman. 26 p.
- Tapia C., Amaro J. 2014. Retrato microbiológico: Género *Fusarium* spp. Revista Chilena Infectología 31(1): 85-86 p.
- Victoria J., Guzmán M., Angel J. 1995. Enfermedades de la caña de azúcar en Colombia. Cali, Cenicaña. 265-293 p.
- Vishwakarma R., Kumar P., Nigam A., Singh A., Kumar A. 2013. Pokkah Boeng: An Emerging Disease of Sugarcane. Plant Pathology and Microbiology 4: 170.
- Viswanathan R., Balaji C., Selvakumar R., Palaniyandi M., Amalraj R., Chandrasekaran N., Chhabra M., Parameswari L. 2017. Epidemiology of *Fusarium* Diseases in Sugarcane: A New Discovery of Same *Fusarium sacchari* Causing Two Distinct Diseases, Wilt and Pokkah Boeng. Sugar Technology 19(6): 638-646 p.
- Waleed M., Alghuthaymi M. 2016. Plants pathogens. Arabia Saudita, Shaqra, Shaqra University. 50-59 p.

ANEXOS

Lunes, 02 de marzo de 2015

Identificación de Fusarium muestra de caña de azúcar

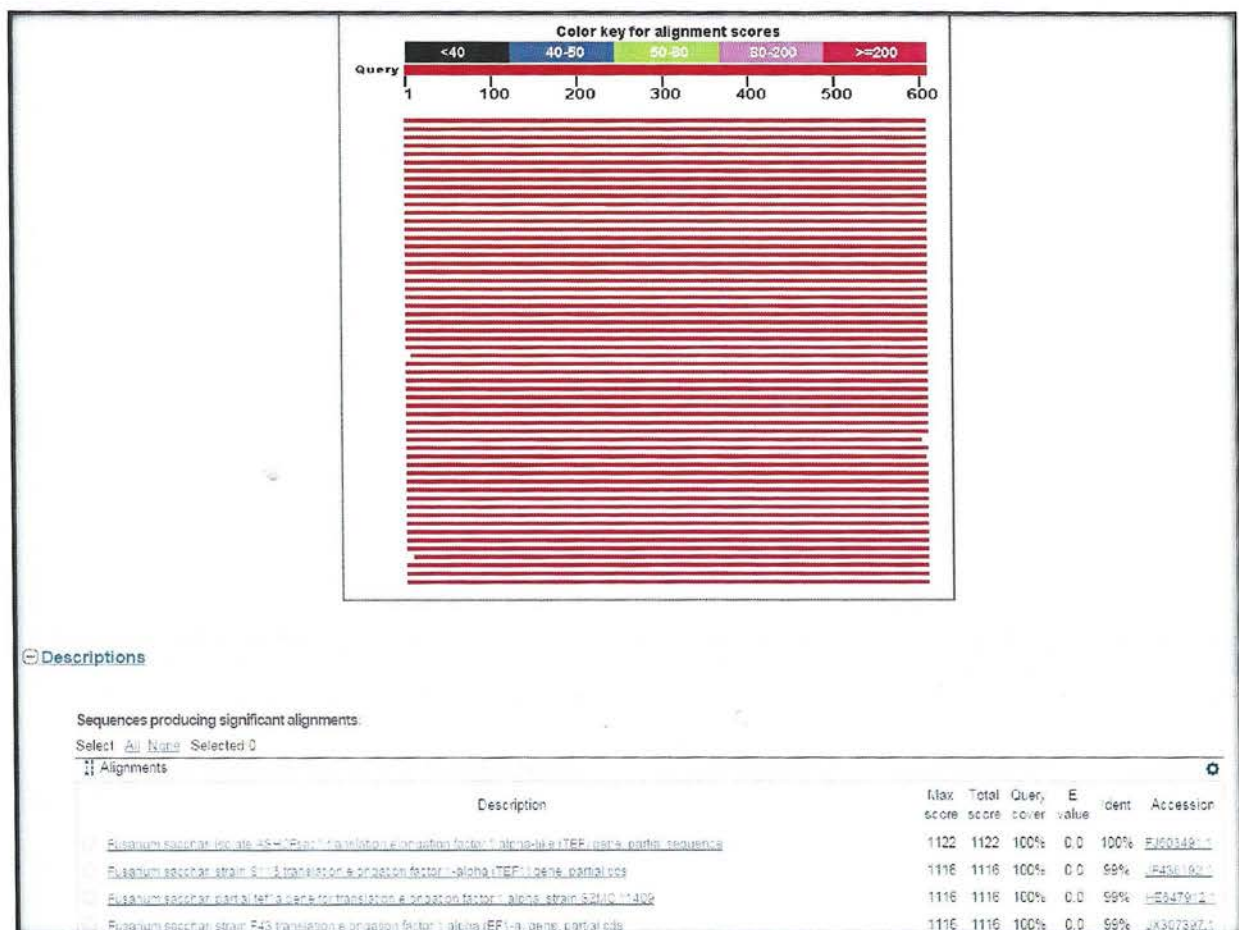
Estimado José,

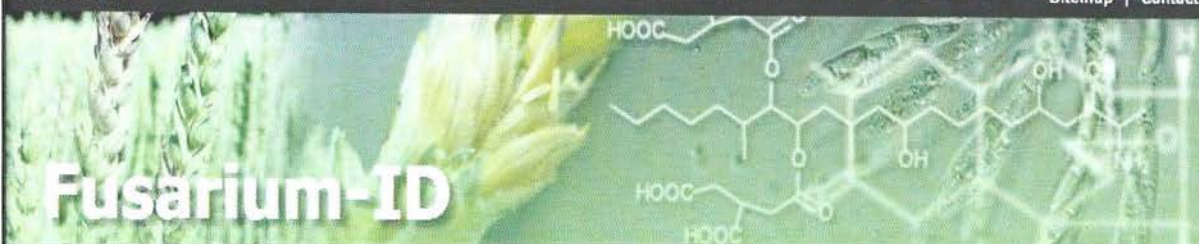
Adjunto los resultados de la identificación del aislamiento recibido proveniente de caña de azúcar. La identificación se realizó con base en la secuencia del ADN de una porción del gen del Factor de Elongación (EF) que se utiliza para la identificación de especies de Fusarium. La secuencia obtenida se comparó con las depositadas en dos bases de datos, GenBank (NCBI) y Fusarium ID. En ambas bases de datos, la secuencia correspondió a *Fusarium sacchari*, con una similitud de 100% (GenBank) y 99,8% (Fusarium ID).

El costo del análisis es de US \$100.00.

Saludos,

Luis Gómez.





Fusarium-ID

[Home](#) |
 [Introduction](#) |
 [Database](#) |
 [Search & Analysis](#) |
 [Guide](#) |
 [CIF Gateway](#)

FD_01170_EF-1a

Isolate FD_01170 (*Fusarium sacchari*)
Source(s) and alternative IDs 13999 (NRRL)
Marker Translation Elongation Factor 1 alpha
Genbank Accession Number To be deposited

Sequence
 (646 bp)

```

TCGTGTEATCGGCCACDTGGACTCTGGCAAGTGGACCACTGTGAGTACTACCCCTGGAOGATGAGCGTATCTGCCATGGA
AAACCTCACCAAGACTGGCGAGSTATTCTCTTGAAGCAAGATGCTGACATGGCTACACAGACCGGTCACTTGATCTAC
CAGTGGCGTGGTATCGACAAGGSAACCAFCBAGAASTTCGASAAAGSTTAGTCACTTCCCTTCGATCGGGGTCCTTTGT
ACATCGATTTCCCTAGCACTGSAAGCGTGGCCGTACCCCGCTCGAAGCCAAAATTTTCCGATATGACCGTAATTTT
TTGGTGGGGCATTACCCCGCCACTCGAGCGATGGCCCGCTCTTTGCCCTTTCCTATCCACAACCTCAATGAGCGCATCG
TCACGTGTCAAGCAGTCACTAATCATCTGACAAATAGGAAGCCGCTGABCTCGGTAAAGGGTTCCTTCAAGTACGCTGGGT
TCTTGACAAGTCAAAGSCCGAGCGTGAAGCTGATCAACATCGATATTGCTCTCTGGAAGTTCGABACTGCCCGCTACT
ATGTCAACCGTCATTGGTATGTTGTGGTCAATGCGCTTACTCTATTTCTAGTACTAAGATGTCACTCAGAGCGTCCCGGTC
ACCGTG
  
```

Isolates carrying the same sequence to this isolate FD_01170 : 646 bp

Comment

[Back](#)

Lab 3051 julio, 2018

Liberia, 30 de julio del 2018

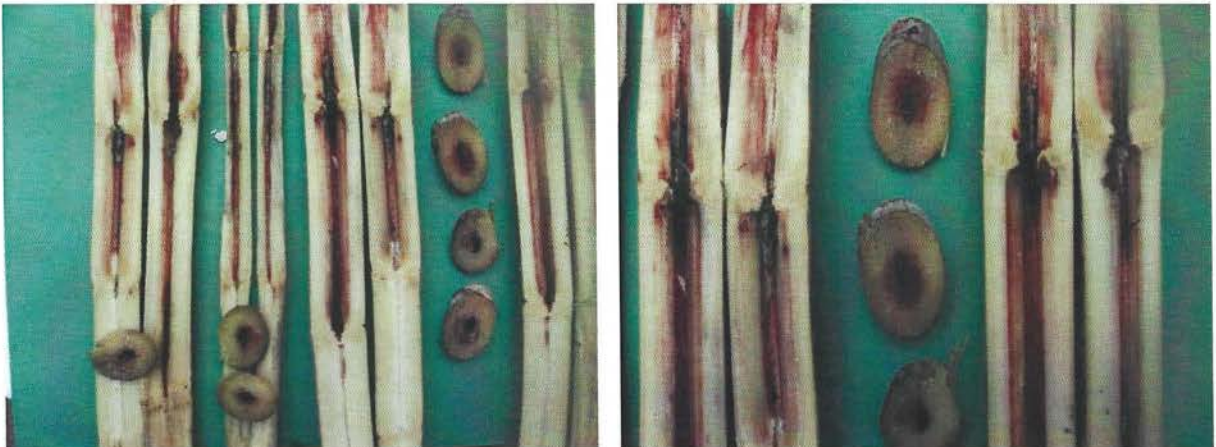
Señor:

Ing. José molina
Ingenio Taboga
Cañas, Guanacaste

Estimado señor:

A continuación le remito reporte de diagnóstico clínico, realizado en sus muestras de caña de azúcar analizadas en este laboratorio.

1. *Muestra N°1.recibida: Lote A-10 Sección Laberinto C.v. RB 877515: Canutos de plantas en desarrollo afectadas por la presencia de una coloración rojo-naranja en el eje central de la planta. En las ilustraciones adjuntas se visualiza claramente la dolencia que afecta al cultivo. En el ejercicio de análisis de los tallos recibidos se encontró algunas larvas de *Diatrea sp* en el interior de los mismos. No has más datos.*



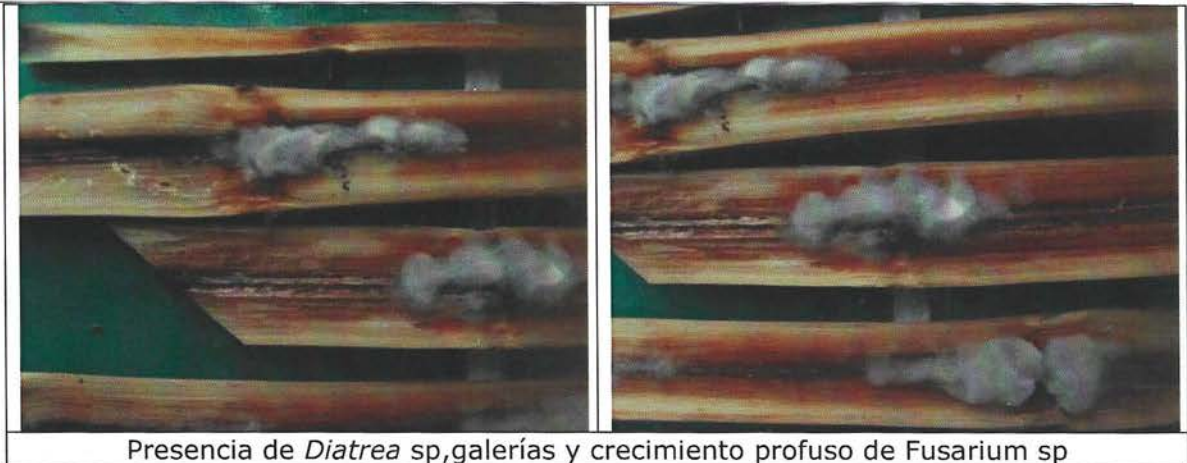


2. *Muestra N°2.recibida*: Sistema radicular de plantas afectadas con todo el área radicular recubierto de suelo. *No has más datos.*

Resultados de análisis clínico:

1. *Muestra N°1: Lote A-10 Sección Laberinto C.v. RB 877515*

- a. Presencia consistente de galerías en el interior de los canutos asociados con taladrador de la caña. Algunas larvas de *Diatrea sp* presentes, que parecen estar asociadas con las galerías encontradas.
- b. Presencia predominante del hongo *Fusarium sp* creciendo profusamente sobre todo el tejido central afectado. Los conidios de la especie presente no corresponden a *F. moniliforme*. En consecuencia; el hongo *Fusarium sp* encontrado en la muestra; parece más asociado con una expresión secundaria del problema y no como una causa primaria de la enfermedad.



2. *Muestra N°2: Sistema radicular de plantas afectadas: Lote A-10 Sección Laberinto C.v. RB 877515.*

- a. Sistema radicular sano y con ausencia de patógenos asociados.
- b. No hay más datos.

3. Estrategias de control y manejo:

1. Será de gran importancia realizar un monitoreo completo de la plaga en el campo porque con la llegada del período seco de agosto; la plaga podría incrementar su daño.
2. Se requiere hacer una valoración de la parte superior de las plantas en desarrollo para ver por donde está ingresando la plaga, así como la presencia de posturas en el campo.
3. Es posible la necesidad de hacer control químico.
4. En cuanto al manejo del hongo; su presencia disminuirá conforme se haga control de la plaga.

5. El análisis de laboratorio indica que el hongo presente no es *Fusarium moniliforme*. Sin embargo; eventualmente el empleo de *Trichoderma sp* podrían ayudar en el manejo de éste y otros hongos asociados con el cultivo.

Se suscribe de usted muy atentamente,

Joaquín Salazar M. Msc/ Fitopatólogo
Laboratorio de patología vegetal Joaquín Salazar.
Joaquinsalazar.m@hotmail.com
Tel. 8938-5980.

ANEXO II



16 de noviembre 2017
TM-510

Señorita Wendy Gómez
Ingenio Taboga

Características de la muestra:

Género/especie/variedad: hongos en petri

Recolectada por: se ignora

Cláusula: ninguna

El análisis del ADN se realizó a partir de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés). Se analizó la región del factor de elongación alfa. Los resultados fueron confirmados mediante electroforesis en gel de agarosa (0.8%). La secuenciación se realizó mediante producto de PCR purificado a una concentración de 50 ng/μl. Los resultados pueden ser enviados como archivos adjuntos al correo electrónico si son solicitados, incluyendo los cromatogramas.

Los resultados según el BLAST (GenBank-NCBI) muestran los siguientes resultados:

ID: #ITFU10, para un total de 542 bases analizadas, 541 corresponden a un 99% de similitud con muestras de *Fusarium sacchari* (número de accesoión KY524232.1).

ID: #ITL211, para un total de 829 bases analizadas, 816 corresponden a un 99% de similitud con muestras de *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma asperelloides* (número de accesoión KT302162.1 y KP262478.1). Ambas especies presentan la misma secuencia genética.

ID: #ITE1434, para un total de 844 bases analizadas, 834 corresponden a un 98% de similitud con muestras de *Trichoderma virens* (teleomorfo: *Hypocrea virens*) (número de accesoión KU301740.1 (EU280047.1)).

ID: #ITE1435, para un total de 845 bases analizadas, 831 corresponden a un 98% de similitud con muestras de *Trichoderma virens* (teleomorfo: *Hypocrea virens*) (número de accesoión KU301740.1 (EU280047.1)).

ID: #ITM2324, para un total de 829 bases analizadas, 816 corresponden a un 99% de similitud con muestras de *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma asperelloides* (número de accesoión KT302162.1 y KU955367.1). Ambas especies presentan la misma secuencia genética.

ID: #ITM2325, para un total de 829 bases analizadas, 816 corresponden a un 99% de similitud con muestras de *Trichoderma asperellum* y *Trichoderma asperelloides* (número de accesoión KT302162.1 y KP262478.1). Ambas especies presentan la misma secuencia genética.

Atentamente,



A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Mónica Blanco Meneses', is written over a circular official stamp.



Dra. Mónica Blanco Meneses.
Laboratorio de Técnicas Moleculares Aplicadas a la Fitoprotección

ANEXO III



6 de noviembre 2018

TM-0577_extra

Ing. Wendy Gómez Mata
Biodyne C.R.

Características de la muestra:

Género/especie/variedad: aislamiento provenientes de caña de azúcar

Recolectado por: desconocido

Parte (s) de la planta analizadas: se ignora

Síntomas: se ignoran

Cláusula: ninguna

Para el análisis se realizó lo siguiente:

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), se realiza directamente de las colonias en el plato de cultivo. Se utilizaron los cebadores universales de la región del EF-1a para identificación específica de *Fusarium* spp. Los resultados fueron confirmados mediante electroforesis en gel de agarosa (0.8%).

La secuenciación se realizó mediante el producto de PCR purificado a una concentración de 50 ng/μl. Los resultados pueden ser enviados como archivos adjuntos al correo electrónico si son solicitados, incluyendo los cromatogramas.

Los resultados según el BLAST (GenBank-NCBI) muestran el siguiente resultado:

ID-raíz: para un total de 679 bases analizadas, 678 corresponden a un 99% de similitud con muestras de *Fusarium sacchari* (número de accesoión JF740708).

ID-tallo: para un total de 609 bases analizadas, 610 corresponden a un 99% de similitud con muestras de *Fusarium sacchari* (número de accesoión HE647912).

Atentamente,


Dra. Mónica Blanco Meneses
Laboratorio de Técnicas Moleculares Aplicadas a la Fitoprotección



Laboratorio de Técnicas Moleculares Aplicadas a la Fitoprotección