

Evaluación de la eficacia de diferentes productos biológicos sobre el desarrollo y sanidad del cultivo de piña (*Ananas comosus*), variedad md-2, en la finca lyl en el sahíno, San Carlos, Alajuela, Costa Rica.

Sergio Arias Vargas

PRÁCTICA DIRIGIDA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN
INGENIERÍA AGRONÓMICA CON ÉNFASIS EN FITOTÉCNIA

ESCUELA DE AGRONOMÍA
FACULTAD DE CIENCIAS AGROALIMENTARIAS

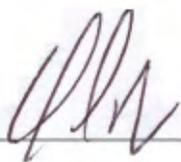
UNIVERSIDA DE COSTA RICA

2016

Evaluación de la eficacia de diferentes productos biológicos sobre el desarrollo y sanidad del cultivo de piña (*Ananas comosus*), variedad md-2, en la finca lyl en el sahíno, San Carlos, Alajuela, Costa Rica.

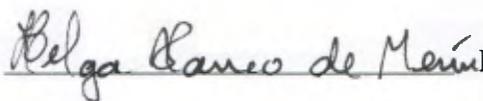
Sergio Arias Vargas

PRÁCTICA DIRIGIDA PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN
INGENIERÍA AGRONÓMICA CON ÉNFASIS EN FITOTÉCNIA



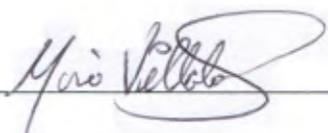
DIRECTOR DE LA PRÁCTICA DIRIGIDA

Oscar Acuña Navarro, M.Sc



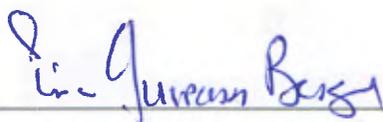
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Helga Blanco Metzler, Ph.D



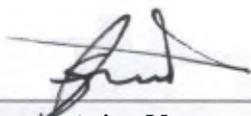
MIEMBRO DEL TRIBUNAL

Mario Villatoro, Ph.D



DIRECTOR DE ESCUELA

Eric Guevara Berger, Ph.D



SUSTENTANTE

Sergio Arias Vargas, Bach

DEDICATORIA

A Dios, que es el que da fuerzas para seguir adelante en todos los proyectos, a mi mamá, consejera y amiga, a papi, por demostrarme con su ejemplo el valor del trabajo y el esfuerzo hasta en los pequeños detalles, a Sejo, por ser ese hermano mayor que me guió en los momentos mas adversos y finalmente a mis dos abuelos, Hernán y Ovidio, que son y siempre serán un ejemplo de trabajo duro los cuales me inculcaron el amor por la agricultura y el campo.

AGRADECIMIENTOS.

A mi director de Tesis Oscar Acuña y mi compañera de laboratorio Laura, por su dedicación y disponibilidad en este proceso. Al Profe Mario, por su gran ayuda en la conclusión de este estudio.

INDICE.

1. RESUMEN.....	12
2. INTRODUCCIÓN.....	13
3. OBJETIVOS	
3.1. Objetivo General.....	14
3.2. Objetivos Específicos.....	14
4. ANTECEDENTES.....	15
4.1 Inicios de la microbiología de suelos y su aplicación en la utilización de agentes de control biológico.....	15
4.2 <i>Trichoderma</i> spp.: microorganismo de amplio espectro muy estudiado a nivel mundial.....	16
4.3 Efectos bioestimulantes del <i>Trichoderma</i> spp. y otros agentes biológicos sobre el desarrollo de plantas.....	22
4.4 Calidad de un producto a base de un agente microbiológico.....	24
4.5 Utilización de insumos biológicos en Costa Rica.....	26
4.6 Generalidades de la finca productora LyL.....	28
5. MARCO TEÓRICO.....	30
5.1 Descripción botánica de la piña.....	30
5.2 Características del híbrido MD-2.....	31
5.3 Principales enfermedades de suelo que afectan la raíz de la piña.....	32

5.3.1	<i>Fusarium spp</i>	32
5.3.2	<i>Phytophthora spp</i>	33
5.3.3	<i>Erwinia spp</i>	33
5.4	Control Biológico	34
5.4.1	<i>Trichoderma spp</i>	35
	Figura 1. Penetración de las hifas de <i>Rhizoctonia solani</i> por hifas más pequeñas de <i>Trichoderma virens</i> . Fuente: Howell, (2003).....	36
5.4.2	<i>Phytium oligandrum</i>	37
5.5	Estimulación del desarrollo	37
5.6	Eficacia y calidad de un producto biológico	38
6.	MATERIALES Y MÉTODOS	39
6.1	Ubicación y generalidades	39
6.2	Pruebas de eficacia de los insumos biológicos	39
6.2.1	Selección de plantas enfermas en campo	39
	Figura 2. Síntomas de posible presencia de <i>Fusarium spp.</i> , <i>Rhizoctonia spp.</i> o <i>Phytophthora spp.</i> en plantas de piña. Fuente: Banacol.....	40
6.2.2	Aislamiento del o los patógenos	40
	Figura 3. Lavado y separado de partes de raíz y tallo previo al aislamiento de microorganismos.....	41
	Figura 4. Secuencia del proceso aséptico de aislamiento de microorganismos en el laboratorio de bioquímica de procesos orgánicos (orden de fotos de izquierda a derecha).....	41

6.2.3 Identificación de los patógenos	42
6.2.4 Purificación de las colonias del patógeno	42
Figura 5. Purificación de las colonias de <i>Fusarium</i> spp. obtenidas del aislamiento de partes de raíz y tallo de plantas de piña enfermas.....	43
6.2.5 selección de los productos a evaluar	43
Cuadro 1. Características de los insumos biológicos a utilizar.....	43
6.2.6 Prueba de eficacia de los productos contra el patógeno	
<i>Fusarium</i> spp	44
Figura 6. Preparación y pesaje de las muestras de los cinco productos para el estudio de eficacia de insumos biológicos (arriba los 5 productos, abajo izquierda producto bioprotection, abajo derecha producto Polyversum).....	45
Figura 7. Productos pesados y listos para la dilución (arriba). Preparación de los discos de inóculo de <i>Fusarium</i> spp. para ser colocados en el nuevo plato Petri (abajo).....	46
Figura 8. Proceso de dilución final para la prueba de eficacia, donde se impregna un plato con cada producto (arriba) y luego se coloca el disco de <i>Fusarium</i> spp. (abajo).....	46
6.3 Evaluación de la calidad de los insumos	47
Cuadro 2. Parámetros y valores utilizados para determinar la calidad de un insumo biológico.....	47
Figura 9. Proceso de preparación, montaje y conteo de esporas (de izquierda a derecha) para determinación de la concentración y viabilidad de cada uno de los productos evaluados.....	48
6.4 Prueba de campo para determinar la eficacia de los insumos sobre la incidencia de los hongos fitopatógenos y el desarrollo fenológico de las plantas	48

Figura 10. Diagrama demostrativo de la unidad experimental del ensayo en campo de la eficacia de distintos insumos biológicos en piña.....	50
Figura 11. Mapa de la distribución de los tratamientos en el lote 6 de la finca LyL.....	51
6.5 Evaluación de la incidencia de enfermedades fungosas sobre las plantas de piña.....	52
6.6 Evaluación del efecto de los insumos biológicos sobre el desarrollo del cultivo.....	52
6.7 Análisis estadístico de los datos.....	55
7. RESULTADOS.....	53
7.1 Pruebas de calidad de los insumos biológicos.....	53
Cuadro 3. Parámetros de calidad evaluados para cada uno de los productos biológicos estudiados.....	53
7.2 Ensayo de laboratorio: Pruebas de eficacia de insumos biológicos...	54
Figura 12. Efecto de productos biológicos sobre el control de <i>Fusarium</i> spp., (a) Tricho Aid, (b) Tricho eco, (c) Bio trich, (d) Bio protection, (e) Testigo y (f) Polyversum.....	54
7.3 Ensayo en campo: desarrollo fenológico.....	55
Figura 13. Peso de la hoja D de plantas de piña obtenido durante los primeros 7 meses de desarrollo del cultivo.....	55
Figura 14. Largo de la hoja D de plantas de piña obtenido durante los primeros 7 meses de desarrollo del cultivo.....	56
Figura 15. Ancho de la hoja D de plantas de piña obtenido durante los primeros 7 meses de desarrollo del cultivo.....	57
Figura 16. Peso de la parte aérea de plantas de piña obtenido durante los primeros 7 meses de desarrollo del cultivo.....	58

Figura 17. Peso de raíz de plantas de piña, obtenido durante los primeros 7 meses de desarrollo del cultivo.....	59
Figura 18. Longitud de raíz de plantas de piña durante los primeros 7 meses de desarrollo del cultivo.....	60
Cuadro 4. Diferencia mínima significativa (DMS) de las variables evaluadas en el ensayo de piña en campo.....	61
7.4 Ensayo en campo: incidencia de enfermedades de suelo.....	62
Cuadro 5. Incidencia de enfermedades en el suelo (<i>Phytophthora</i> spp, <i>Fusarium</i> spp. y <i>Erwinia</i> spp.) que atacan la planta de piña en las primeras etapas de su desarrollo.....	63
8. DISCUSIÓN.....	63
9. CONCLUSIONES.....	68
10. RECOMENDACIONES.....	69
10. LITERATURA CITADA.....	71
11. ANEXOS.....	78
Anexo 1. Hoja control de las aplicaciones, dosis y costo de los productos del ensayo en campo de insumos biológicos, donde se incluye fecha y hora de aplicación y el estado del tiempo en el momento de la aplicación.....	78
Anexo 2. Análisis químico del suelo del lote 6 (área del ensayo) previo al inicio de las aplicaciones de los tratamientos.....	79
Anexo 3. Placas Petri PDA de dos muestras de suelo del área de estudio (lote 6), tomadas en dos puntos distintos previo al inicio de las aplicaciones de los	

tratamientos, donde se evidencia la presencia de colonias de *Trichoderma* spp. (izquierda) y de *Fusarium* spp. (derecha)..... 80

Anexo 4. Estructuras de reproducción (conidios) y micelio del hongo del género *Fusarium* spp. para facilitar su identificación en el microscopio..... 80

Anexo 5. Ejemplo de una hoja de campo de evaluación del desarrollo fenológico del ensayo en campo.....81

RESUMEN.

EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE DIFERENTES PRODUCTOS BIOLÓGICOS SOBRE EL DESARROLLO Y SANIDAD DEL CULTIVO DE PIÑA (*Ananas comosus*), VARIEDAD MD-2, EN LA FINCA LYL EN EL SAHINO, SAN CARLOS.

Autor: Sergio Arias Vargas

Director: Oscar Acuña Navarro

Palabras Clave: Insumos biológicos, *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp., eficacia y calidad de insumos biológicos, desarrollo y sanidad del cultivo de piña.

Se llevó a cabo una evaluación del producto biológico a base de *Trichoderma* spp., Bio Protection, comparándolo contra otros cuatro productos biológicos comerciales que se encuentran actualmente en el mercado nacional, para determinar su influencia en el desarrollo y control de enfermedades de suelo en plantaciones de piña. El estudio se desarrolló en dos etapas; la primera se llevó a cabo en el laboratorio de Bioquímica de procesos orgánicos en el CIA (Centro de investigaciones agronómicas), UCR y la segunda en la finca productora y exportadora de piña fresca LyL proyectos, ubicada en el Sahino de San Carlos, Alajuela, Costa Rica. En la primera etapa se evaluó la calidad de cada uno de los productos y su eficacia en el control del patógeno *Fusarium* spp.; se encontró que los tratamientos de Tricho Aid y Tricho eco presentaron las mejores características de calidad según los factores evaluados de concentración, viabilidad y pureza, mientras que el Bio Protection (actual producto que utiliza la finca) y Polyversum, presentaron las características de calidad más bajas. Para la prueba de eficacia se encontró que el producto Tricho Aid, tuvo el control más alto (80%) sobre la colonia de *Fusarium* spp., seguido por el Bio Trich (37%), Tricho eco (1%) y Polyversum, Bio Protection y el testigo, donde no existió crecimiento de la colonia del biocontrolador. En la segunda etapa del estudio, se evaluó el desarrollo y sanidad del cultivo de piña. Se evaluaron variables fenológicas, donde se encontró una mejor respuesta en el desarrollo de las plantas con el producto Tricho Aid, que con el Producto Bio Protection (se encontró una diferencia significativa menor al 5% entre ambos productos). En cuanto a la sanidad del cultivo,

se evaluó la incidencia de las enfermedades de suelo mas comunes en las plantaciones de piña en la etapa de desarrollo del cultivo (*Fusarium* spp., *Erwinia* spp., *Phytophthora* spp.) luego de 4 aplicaciones de cada tratamiento, se realizaron conteos de plantas enfermas con poca o nula capacidad de recuperación y no se encontraron diferencias significativa entre los tratamientos y el testigo, sin embargo, se observó una tendencia de un porcentaje menor de plantas enfermas para los tratamientos con los productos biológicos, la cual debería ser evaluada y analizada en estudios posteriores.

2. INTRODUCCIÓN.

El cultivo de piña pertenece al grupo de cultivos de mayor demanda a nivel mundial, siendo la tercer fruta tropical de mayor importancia por detrás del banano y los cítricos en volúmenes de exportación (CANAPEP). La piña en Costa Rica, compite con el banano por ser uno de los dos productos con mayor área de producción y exportación.

Según datos de la Cámara nacional de productores y exportadores de piña (CANAPEP) el área de producción de esta fruta se duplicó del 2006 al 2010, actualmente en el 2014, el área ronda las 45000 hectáreas, concentradas principalmente en la zona norte y el área de Guápiles. Esta producción le ha generado al país ingresos por 725 millones de dólares para el año 2011, según datos estadísticos de la promotora de comercio exterior (PROCOMER, 2012) donde los mayores compradores de este producto fresco son mercados de los Estados Unidos, Reino Unido, Bélgica, Holanda, Italia entre otros.

La gran demanda de este producto fresco y los cambios que han ido surgiendo en los mercados internacionales ha generado que la Unión Europea y Estados Unidos exijan a nuestro país, una reducción en las aplicaciones de plaguicidas por hectárea que se utilizan en el cultivo, lo que obliga al productor a sustituir muchos de los agroquímicos, por insumos alternativos, que no contaminen el medio ambiente, pero que además logren mantener el rendimiento y calidad de la cosecha.

Por esta razón en los últimos años, se ha incrementado el uso de insumos biológicos en el cultivo de piña en Costa Rica. Los productores nacionales poco a poco han ido incluyendo en sus paquetes tecnológicos, productos biológicos, transformándolo así en un cultivo mas sustentable (Bettiol, 2006).

Actualmente, la utilización de productos a base de microorganismos como bio-fungicidas y bio-estimulantes principalmente aquellos del genero *Trichoderma* spp. , es una actividad común en cualquier finca piñera de Costa Rica, sin embargo, en muchos casos no existen datos suficientes que evidencien su efecto positivo sobre los

cultivos. La mayoría de las fincas donde se utilizan estos productos, no realizan las pruebas necesarias a nivel de campo y mucho menos en el laboratorio para determinar qué tan eficaz es el microorganismo que se está aplicando, por lo general se basan únicamente en experiencias previas que han tenido los encargados de campo en otras fincas. A falta de información experimental, existe un alto grado de incertidumbre sobre el verdadero efecto que tiene el microorganismo sobre el suelo y el cultivo.

3.1 OBJETIVO GENERAL.

- Evaluar la eficacia de diferentes fuentes de insumos biológicos sobre el desarrollo y sanidad del cultivo de la piña en la finca LyL en el Sahino, San Carlos, Alajuela, Costa Rica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1- Cuantificar la efectividad de distintos productos biológicos sobre el desarrollo radical y aéreo de las plantas de piña.
- 2- Determinar la eficacia biológica in vitro, de los productos, sobre el combate del patógeno de suelo *Fusarium* spp. en el cultivo de piña.
- 3- Evaluar el efecto antagonista de distintos productos biológicos sobre la incidencia de algunas de las principales enfermedades de suelo (*Fusarium* spp., *Erwinia* spp., *Phytophthora* spp.) que afectan el cultivo de piña en sus primeras etapas de desarrollo.
- 4- Determinar el grado de calidad del producto que se está utilizando en la finca, evaluando su viabilidad, concentración y pureza.

4. ANTECEDENTES.

4.1 Inicios de la microbiología de suelos y su aplicación en la utilización de agentes de control biológicos.

Durante el periodo pos- segunda guerra mundial, el planeta inició una revolución agrícola de gran importancia, conocida como la revolución verde. Con esta revolución se pretendía una producción de alimentos, principalmente granos, a gran escala, utilizando tecnologías que favorecieran un mayor rendimiento de los cultivos. Este fenómeno que inició alrededor de los años 40, provocó que se aumente significativamente el consumo de agroquímicos para combatir las plagas y enfermedades que afectaban a los cultivos. Durante esos años, se le dio un uso indiscriminado a los productos químicos o plaguicidas, por lo que se comenzó a notar un deterioro del medio ambiente, principalmente por la contaminación de los mantos acuíferos, disminución significativa de poblaciones de animales silvestres, como los anfibios, problemas de salud en los seres humanos y por supuesto en el ámbito agrícola, la generación de resistencia de algunas plagas y enfermedades de gran importancia para los cultivos.

Debido a ello, surgió la necesidad de encontrar nuevas alternativas de combate, con el fin de contrarrestar el efecto negativo que los productos químicos iban generando sobre el medio ambiente y los seres humanos. Como consecuencia, el consejo nacional de investigación de la academia nacional de ciencias de USA en 1989, elaboró un reporte denominado *Agricultura Alternativa*, el cual definió esta nueva modalidad de producción agrícola, como un sistema donde se buscaba reducir los costos de producción, mantener el rendimiento y mejorar la eficiencia de los cultivos por medio de prácticas alternativas, evitando el abuso de los pesticidas, realizando prácticas como la rotación de cultivos y utilizando productos diferenciados como biofertilizantes, microorganismos benéficos, entre otros.

Para 1993, gracias al primer reporte generado, el consejo nacional de investigación nuevamente publicó otro informe llamado: “*pesticidas en la dieta de niños y jóvenes*”, el cual mencionaba el riesgo tan grande de esta población de generar

problemas de salud debido al uso sin medida de los pesticidas. Para los agricultores estadounidenses, ambos reportes representaron el inicio de lo que hoy se conoce como agricultura sostenible, donde la clave del éxito de estos sistemas productivos inició con una buena calidad de los suelos y un manejo integrado de todo el sistema. (Teruo y Parr, 1994).

A pesar de que la preocupación por alternativas agrícolas más sostenibles inició a finales de los 80, el estudio del desarrollo, interacción y dinámica de microorganismos en el suelo, o lo que se conoce como microbiología de suelos, se comienza a desarrollar con mayor fuerza a partir de los años 60. Insam (2001) consideró al suelo como un ente complejo, donde los microorganismos deben lidiar con fases sólidas, líquidas y gaseosas que pueden llegar a afectar positiva o negativamente su metabolismo y que al final de cuentas estos efectos inciden directamente en la calidad del suelo.

Al ser el suelo un micro-ecosistema complejo de muchas interacciones tanto físicas y químicas como microbiológicas, la simple extracción y conteo de microorganismos, no era suficiente información para caracterizar la microbiota del suelo, por esta razón se inician nuevos estudios acerca del metabolismo de los microorganismos, como por ejemplo mediciones de la producción enzimática microbiana, mediciones de flujos de nutrientes o compuestos como la liberación del CO₂ (respiración microbiana), mineralización del nitrógeno y digestión de otros nutrientes como fósforo y nitrógeno, con el fin de identificar de manera más precisa cada microorganismo y de esta manera conocer su metabolismo y el efecto pueda llegar a tener sobre la calidad del suelo y los beneficios para los cultivos.

4.2 *Trichoderma* spp: microorganismo de amplio espectro muy estudiado a nivel mundial.

El conocimiento de los efectos benéficos de algunos microorganismos sobre la planta, se remonta desde finales del siglo XVII donde ya se estudiaban algunos géneros específicos, capaces de controlar algunas enfermedades en los cultivos. Según Howell (2003), el potencial biocontrolador del hongo *Trichoderma* spp. fue descrito por

primera vez en los años de 1930 y en los siguientes años se demuestra su efectividad sobre gran variedad de enfermedades. El mismo Howell, en 1983, logró aislar una sepa de *Trichoderma virens*, el cual produce un antibiótico conocido como gliovirina, muy efectivo contra *Phytium ultimum* y *Phytophthora* spp. pero muy poco efectivo contra *Rhizoctonia. solani*, *Thielaviopsis basicola*, *Verticillium dahliae*. Actualmente se cambió el género de *Trichoderma virens* a *Gliocladium virens*.

Tomme et al. (1988) continúan las investigaciones con el género *Trichoderma* spp., enfocando su investigación en la producción de algunas enzimas catalíticas que interactúan en la hidrólisis de la celulosa, demostrando la capacidad del microorganismo de romper enlaces y actuar como agente de descomposición de materia orgánica.

Cano (2011) menciona dos puntos muy importantes que se deben tener en cuenta siempre que se trabaja con microorganismos: las interrelaciones que tienen los microorganismos unos con otros, que pueden ser de sinergia, antagonismo o simple mutualismo, además de que dichas interrelaciones se llevan a cabo principalmente en la rizosfera de la planta. Estas interrelaciones son afectadas por factores complejos bióticos y abióticos, por ejemplo cambios en el clima o aplicaciones de productos químicos y ellas van a incidir directamente en el desarrollo de las plantas, alterando la relación ambiente-planta-suelo-microorganismo.

Dentro de los microorganismos rizosféricos mas comúnmente encontrados en los suelos alrededor del mundo, se encuentran los hongos formadores de micorrizas arbusculares, hongos del género *Trichoderma* spp. y bacterias del género *Pseudomonas*, estos dos últimos catalogados como agentes de control biológico y microorganismos promotores del crecimiento vegetal.

La evidencia presentada por este autor, mostró como se identificó un antagonismo entre *Trichoderma* y *Pseudomonas*, debido a una menor colonización de la rizosfera por parte de alguno de los dos agentes, causada justamente por el efecto del otro agente, sin embargo a pesar de lo anterior, la expresión de los efectos benéficos sobre el desarrollo de las plantas en ninguno de los casos se vio reducida, además de que se

observó un control efectivo de los dos agentes, sobre los patógenos que afectaban las plantas; lo anterior evidenció la polifuncionalidad que tienen algunos microorganismos, capaces de controlar poblaciones de microorganismos patógenos con alguno de sus múltiples mecanismos de acción y su efectividad al mismo tiempo de promover el buen desarrollo de la planta.

Dentro del género *Trichoderma* spp. existen diversas especies que son utilizadas en la agricultura como agentes de control biológico y promotores de crecimiento vegetal, que han sido estudiadas a través de los años en distintos cultivos. Maymond et al (2004) identificaron 76 aislamientos de distintas especies del género *Trichoderma* spp. de plantas de fresa en la región central de Israel, las cuales actuaron como biocontroladores contra la enfermedad antracnosis causada por el agente (*Colletotrichum acutatum*) y la pudrición gris (*Botrytis cinerea*),

En el estudio no se menciona cual fue la especie de *Trichoderma* que tuvo un mejor control sobre los patógenos, sin embargo, por medio de métodos moleculares de extracción de ADN y PCR, se logró agrupar los aislamientos de acuerdo a su similitud genética en un árbol filogenético (Figura 2); eventualmente esta información podría ser alguna pista acerca del comportamiento similar o distinto de algunas de las especies evaluadas en el estudio.

En la mayoría de los estudios de efectividad de biocontroladores se realiza la prueba de campo y se complementa con un ensayo en laboratorio, donde se aíslan tanto el patógeno como el biocontrolador y por medio de técnicas ya establecidas se evalúa el control que pueda ejercer el biocontrolador. Elad et al. (1980) demuestran que desde que se inició la utilización de estos agentes biológicos, se aplicaban ambas pruebas. Dicho autor, realizó un estudio con la especie *Trichoderma harzianum*, el cual fue aislado del mismo suelo del cultivo de frijol infestado por los patógenos y se encontró que este biocontrolador fue capaz de ocasionar lisis y por consiguiente colonización de micelios de *Sclerotium rolfsii* y de *R. solani*. Se observó además una reducción significativa de las colonias de los patógenos, sin embargo al aumentar la temperatura se percibió una disminución de la velocidad de colonización del biocontrolador sobre

el patógeno, es decir, se observó una capacidad de biocontrol inversamente correlacionada con la temperatura.

En el ensayo en campo se encontró que la aplicación del biocontrolador en base sólida de trigo (*Trichoderma* inoculado en trigo) fue mas eficiente al controlar los patógenos y tuvo un mayor efecto sobre el desarrollo de las plantas de frijol, que una suspensión de conidios de *Trichoderma* en base líquida. Por último, se determinó que la aplicación del biocontrolador (base sólida y líquida) tuvo un efecto de control de los patógenos muy positivo y un importante aumento en el desarrollo de las plantas, comparado con el tratamiento testigo, sin el biocontrolador.

En otra investigación con *T. harzianum*, se estudiaron enzimas endoquitinasas y los genes quitinolíticos, encargados de la expresión de dichas enzimas, las cuales tienen un efecto directo sobre el control de algunas enfermedades. Viterbo et al. (2006), demostraron como en los medios de cultivo donde crecía el hongo biocontrolador y que además contenían enzima quitinasa aislada y agregada externamente al medio de cultivo, el control sobre la germinación de conidios de *Botrytis cinérea* era completo y el desarrollo de colonias de *F. oxysporum* y *S. rolfsii*, se veía disminuido considerablemente.

El género *Fusarium* spp. presenta algunas especies que son agentes causales de gran cantidad de enfermedades a nivel mundial en diversos cultivos Akrami et al. (2013) evaluaron el efecto de tres especies de un agente biocontrolador: *T. harzianum*, *T. virens* y *T. asperellum* contra los patógenos causales de enfermedades de la raíz del garbanzo en India: *F. oxysporum* y *F. solani*. Estos microorganismos causan serios problemas en el cultivo de garbanzo y otros granos que se siembran en la India, donde los principales efectos negativos para el cultivo son la marchitez, amarillamiento del área foliar y pudrición de raíz, lo que ocasiona rendimientos muy bajos o en casos extremos, nulos. Los autores utilizaron siete tratamientos: tres de los tratamientos contenían cada una de las especies de *Trichoderma* spp. individualmente, otros tres tratamientos presentaron combinaciones de dos especies del biocontrolador y el último tratamiento contenía las tres especies juntas; se utilizó un control que serviría como comparativo y la aplicación de los tratamientos se llevo a cabo en un

invernadero con plantas de garbanzos que contenían sustrato artificial previamente infestado con los patógenos y otro ensayo en campo donde el suelo fue inoculado con el patógeno una semana antes de la aplicación de los tratamientos.

Los resultados que se obtuvieron indicaron que la aplicación individual de cada uno de los agentes biológicos tuvo una eficacia sobre el control del patógeno entre un 18-35%, al igual que los tratamientos donde se combinaron dos especies de *Trichoderma* spp. sin embargo, en la combinación de las tres especies, se obtuvo una eficacia en el control tanto de *F. oxysporum* como de *F. solani* de un 84% y 83% respectivamente. Esto demuestra que existe un sinergismo importante entre las 3 especies de *Trichoderma* spp., que puede aumentar su potencial a la hora de controlar la incidencia de *Fusarium* spp. Por último, el estudio demostró que *T. harzianum* fue el biocontrolador de mayor eficacia en el control del *Fusarium* spp., seguido por *T. asperellum* y el *T. viridae* fue el menos efectivo.

Los estudios de *Trichoderma* spp. a nivel mundial se han diversificado debido a que es un microorganismo poco selectivo (de amplio espectro), con alta capacidad de generar efectos positivos a cualquier planta o suelo, es por ello que alrededor del 90% de los actuales productos a base de hongos fitopatógenos están representados por *Trichoderma* spp. (Lorito, 2006)

La utilización de biocontroladores en plantaciones de piña no es algo nuevo, desde años atrás se utilizan tanto en cultivos de piña orgánica como convencional, sin embargo, existen pocos estudios que evidencien el efecto que han tenido los biocontroladores sobre las plantas de piña.

Wijesinghe et al. (2010) aislaron cepas de *T. asperellum* de plantaciones de rambután (*Nephelium lappaceum*) y piña de Sri Lanka y los evaluaron contra patógenos conocidos de ambos cultivos in vitro. Se inocularon platos de PDA con el patógeno de piña *Thielaviopsis paradoxa* y del rambután *Colletotrichum gloeosporioides* y se introdujeron en una cámara de incubación para su crecimiento. Una vez que se obtuvo micelio de ambos patógenos, se tomó un disco de 4 mm de diámetro de

cada patógeno y se colocó en el centro de un plato de PDA nuevo, el cual previamente se le había aplicado 75 micro litros de una suspensión de 10^7 conidias/ml de la cepa *T. asperellum* y se metió cada plato en la cámara de incubación. El ensayo contaba con dos tratamientos para rambután y un tratamiento para piña, se realizó tres veces con cada patógeno y contaba con 9 repeticiones por tratamiento.

En los primeros días después de iniciar la prueba en el experimento mencionado se logró observar zonas de inhibición muy claras, en cada uno de los tres tratamientos; el crecimiento de las cepas del hongo biocontrolador fue realmente rápido y en poco tiempo las colonias entraron en contacto con la colonia del patógeno; alrededor del sétimo día después de la inoculación, el bicontrolador cubrió completamente la colonia del patógeno en los tres tratamientos y no fue posible aislar nuevamente el patógeno. No se evidenció diferencias significativas en la tasa de crecimiento de los tres tratamientos, sin embargo se observó que la tasa de crecimiento de las colonias disminuía considerablemente a menos de 20 C y a más de 30 C.

En otro estudio sobre la evaluación del antagonismo de tres especies de *Trichoderma* spp. sobre hongos fitopatógenos que afectan vitroplantas de piña, Hernández et al. (2006) demostraron el efecto que tuvieron *T. viride*, *T. atroviride*, *T. auroviride* y *T. harzianum* sobre los patógenos de piña, *Phytophthora nicotianae*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium subglutinians*, los cuales afectan las plantas de piña en sus primeras etapas de desarrollo y aclimatación.

La evaluación se realizó en un laboratorio, mediante la prueba in vitro de crecimiento dual (Sandoval y Lopez, 2000) utilizando colonias de los patógenos aisladas de suelos piñeros y la de los antagonistas de una micoteca de un centro de investigación. Los resultados obtenidos fueron distintos porcentajes de control de cada una de las especies del biocontrolador sobre los patógenos, destacando una inhibición del crecimiento de *P. nicotianae* en un 50% por *T. viride* y de un 41% por *T. auroviride*, un 53% de inhibición de *R. solani* por parte de *T. harzianum* y por último, un 48% por parte de *T. harzianum* y *T. atroviride* ante *F. subglutinians*.

4.3 Efectos bioestimulantes del *Trichoderma* spp. y otros agentes biológicos sobre el desarrollo de plantas.

Hasta este momento se ha comentado como los microorganismos benéficos, actúan sobre otros microorganismos patógenos, sin embargo, no se puede dejar de lado el efecto bioestimulador que muchos de ellos generan sobre las plantas. Ozbay y Newman (2004) realizaron un estudio con *T. harzianum* cepas comerciales y no comerciales, donde evaluaron el efecto del hongo sobre el crecimiento de plántulas de tomate en invernadero. Las plántulas de tomate fueron inoculadas con las cepas del hongo 18 días después de sembrada la semilla y plantadas en un sustrato comercial. Tanto plántulas como semillas, fueron inoculadas en una disolución de 20 ml a una concentración del hongo de 10^7 conidias/ml, por un tiempo de 30 minutos, para inmediatamente ser trasplantadas. Los resultados obtenidos fueron importantes, ya que los autores indicaron que se obtuvo un porcentaje de colonización del hongo mayores al 93% en todos los tratamientos menos el control y las poblaciones del hongo se mantuvieron altas por alrededor de cuatro semanas después de la aplicación de los tratamientos, lo cual concuerda con estudios previos que indican una permanencia de la población del hongo que ronda las cuatro semanas.

Por otro lado, se encontraron aumentos significativos en el número de hojas, largo del tallo, peso seco y fresco de parte aérea en los tratamientos tanto comercial como en las cepas experimentales; sin embargo, en el porcentaje de germinación y el peso fresco y seco de raíz, no hubo diferencias significativas de los tratamientos con el testigo. Inclusive, las variables de peso fresco y seco de raíz fueron menores en el tratamiento comercial que el testigo, lo cual contrasta con muchos otros estudios donde más bien se da un aumento de estas variables, sin embargo, según lo justifican los autores, este resultado pudo deberse a que el producto comercial se encontraba en mal estado o vencido, a pesar de que la etiqueta aun indicaba que estaba sin caducar, ya que al ser organismos vivos los que se manejan, cualquier alteración en su microambiente pudo ocasionar la inviabilidad del hongo. Esto demuestra lo importante que es tener muy claro el concepto de calidad de un producto biológico y todas sus implicaciones.

En otro estudio más reciente de Kacuk, (2014) se demuestra como el *T. harzianum* tuvo un aumento significativo en el largo y ancho del tallo, peso fresco y peso seco del tallo y de la raíz en plantas de trigo. En dicha evaluación se utilizaron semillas de trigo, las cuales fueron sumergidas en 100 ml de una solución con concentración de 10^7 conidios/ml dos aislamientos de *T. harzianum* experimentales por 60 minutos. Luego se sembraron en un sustrato estéril y se mantuvieron bajo un invernadero, comparando los 2 tratamientos contra un control.

A diferencia del estudio anterior donde no se observó un aumento en el peso fresco y seco de raíz bajo la aplicación de *T. harzianum*, en el estudio realizado en plantas de trigo, el autor indica como se observa un aumento significativo en el peso fresco y seco de raíz. Se ha comprobado en otros estudios, que una de las causas de este efecto bioestimulador, es la capacidad del *Trichoderma* spp. de hacer disponibles algunos nutrientes esenciales que la planta requiere, por ejemplo se menciona como es capaz de solubilizar el fósforo, elemento muy importante para el desarrollo radical y otras muchas funciones para la planta.

El estudio del efecto positivo de *Trichoderma* spp. sobre una amplia variedad de cultivos ha ido conduciendo las investigaciones en identificar otros géneros de microorganismos capaces de igualar o mejorar la capacidad biocontroladora y estimuladora del *Trichoderma* spp. Por ello, han surgido alternativas de estudio que han llamado la atención, tal es el caso del hongo oomicete *Phytium oligandrum* (Picard et al. 2000) el cual es conocido por su gran potencial como agente biocontrolador y de inductor de resistencia ante una amplia variedad de enfermedades en plantas. Al igual que el *Trichoderma* spp., este hongo tiene la habilidad saprofítica de competir por el espacio en la rizosfera, lo que hace más difícil el establecimiento de patógenos, además de producir algunos antibióticos y enzimas que actúan directamente sobre los patógenos.

Picard et al. (2000) estudiaron los efectos citológicos de celulasas en el parasitismo de *P. oligandrum*, sobre *Phytophthora parasítica*. Los autores encontraron como el biocontrolador tiene la afinidad hacia el patógeno, por lo que por medio de señales químicas es atraído por las células de *P. parasítica*, luego se adhiere y penetra las

hifas, desatando una respuesta inmediata del patógeno, pero que al final resulta en una alteración del protoplasma del patógeno, multiplicación de células antagonistas dentro de las hifas hospederas para que finalmente se lleva a cabo el rompimiento de las células de *P. parasitica*.

La capacidad de las hifas de *P. oligandrum* de penetrar la gruesa pared celular del patógeno hospedero, la cual es enriquecida por celulosa, sugiere que el bicontrolador produce gran cantidad de enzimas celulolíticas. La producción enzimática medida en este ensayo resultó ser casi tan efectiva como la producida por *T. viride*, contra *Phytophthora* spp. y *Phytium* spp.

Otro microorganismos que ha tomado fuerza en los últimos años es el *Gliocladium virens*; según muchos estudios este microorganismos tiene la capacidad de controlar algunos patógenos de diversos cultivos y también de estimular el crecimiento y desarrollo de las plantas.

De Silva et al. (2000) en un estudio sobre hongos y bacterias promotores de crecimiento en el cultivo de mora, encontraron efectos muy marcados de este hongo, dentro de los cuales destacan que las plantas del tratamiento de *G. virens*, produjeron 82 hojas, contra 22 producidas por el testigo, además *G. virens* aumentó el área foliar, diámetro del tallo, peso seco de parte aérea y de raíz. Por otro lado, se encontró efectos en el contenido de nutrientes de la planta, donde el P y Zn fue significativamente mayor que en los otros tratamientos. El desarrollo de las plantas bajo el efecto del *G. Virens* fue inclusive mayor que el obtenido agregando fertilizantes químicos. Esto evidencia que el hongo presenta una alta capacidad de promover el crecimiento de las plantas casi comparado al de los PGPR (Plant growth promoting rhizobacteria).

4.4 Calidad de un producto a base de un agente microbiológico.

Un producto de buena calidad, debe de garantizarle al productor, que bajo las dosis recomendada en la etiqueta, el producto va a generar un efecto positivo, ya sea de

biocontrol, de estimulación o ambos, siempre y cuando se cumplan con las normas de aplicación recomendadas por el fabricante.

Gato (2010), menciona que para obtener un producto fúngico de alta calidad, es necesario lograr el mantenimiento y conservación de las cepas de los hongos; de esta manera se garantiza que el producto va a tener las características originales del hongo, siempre manteniendo su estabilidad genética y fenotípica.

Existen varios métodos para el mantenimiento de las cepas, dentro de ellas describe el autor, se encuentra la liofilización y congelación (si se desea preservar a largo plazo) el mantenimiento por suspensión en agua destilada estéril, la conservación en capa de aceite mineral y desecación en sílica gel cuando se desea preservar periodos cortos de tiempo (menos de 1 año).

Se menciona además que un producto biológico de alta calidad debería de mantenerse estable durante el almacenamiento (como mínimo 6 meses) por lo que la formulación es otro aspecto importante a considerar. Dentro de las formulaciones más conocidas se encuentran el polvo, granulados, polvos humedecibles y secos, microencapsulados, suspensiones concentradas entre otros. Todo formulado cuenta con tres componentes principales: el ingrediente activo (conidios, clamidiosporas, micelio) el vehículo que es un material inerte sólido o líquido y adyuvantes (también inerte que cumplen función dispersora o adherente).

La temperatura y humedad son dos parámetros muy importantes en la estabilidad de un producto, ya que para lograr una estabilidad y viabilidad del microorganismo de 3 a 6 meses, se debe procurar realizar un buen empaquetado del producto, su almacenamiento debe de ser a temperaturas menores de 20 C y se debe mantener una humedad relativa baja. Fernandez et al. (2006) mencionan que para las formulaciones del hongo *Trichoderma* spp. se recomienda hacerlas en forma de polvos secos y humedecibles, formulaciones en aceite y encapsulados, tomando en cuenta que el ingrediente activo son los conidios y clamidiosporas.

Sandoval y Noelting (2011) realizaron una prueba para comparar la producción de conidios de *T. harzianum*, en dos medios de multiplicación: uno semisólido y otro líquido. Se utilizaron cinco cepas del hongo *T. harzianum*, aisladas de distintos cultivos y sustratos. El medio semisólido contenía salvado de trigo, harina de arroz, vermiculita y agua destilada, mientras que el líquido se preparó con jarabe de maíz y levadura de cerveza suspendida en agua destilada. A cada tratamiento se aplicó 500 ml de una suspensión de cada cepa con concentración 10^8 conidios/ml. Se incubó cada tratamiento por un periodo de 4 días a 26 C y un fotoperiodo de 16 horas, por ultimo, se realizaron evaluaciones de conteo de conidios a las 48 y 96 horas.

Los resultados obtenidos en este ensayo demostraron que el medio de multiplicación, el tiempo de incubación y la cepa, influyen significativamente sobre la producción de conidios, donde en el medio semisólido se obtuvo mayor producción de conidios. Esta mayor producción alcanzó el 21% a las 48 h y un 90% a las 96h. El autor considera que esta diferencia en mayor producción del medio semisólido, se debe a que es un medio mas rico nutricionalmente, ya que la harina de arroz aporta carbono, proteínas y micronutrientes (Mg, Zn y Cu) sin embargo, no se descarta la utilización de medios líquidos, utilizando procesos mas tecnificados como los fermentadores, ya que son métodos factibles para desarrollar estos productos en periodos de tiempo mas cortos.

4.5 Utilización de insumos biológicos en Costa Rica.

Los estudios y la evidencia que demuestran los beneficios que generan la utilización de microorganismos benéficos en diferentes cultivos, han propiciado que se genere toda una industria encargada de fabricar y comercializar productos a base de microorganismos vivos, los cuales deben de ser manejados bajo estrictas condiciones, con el fin de garantizar la viabilidad y eficacia del biocontrolador.

Por otro lado, la exigencia de los mercados internacionales y la concientización de los productores en cuanto al uso de alternativas sostenibles (Chaverri, 2002) ha favorecido el mercado interno de productos biológicos; es por ello que actualmente existe una cartera muy amplia de todo tipo de insumos biológicos, de distintas casas comerciales (nacionales e internacionales), de diferentes formulaciones y por

supuesto de distinta calidad, siendo los productos a base del microorganismo del género *Trichoderma* spp. de los que más se utilizan en fincas agrícolas.

A pesar de la gran cantidad de productos biológicos que se utilizan, hay poca información documentada que evidencie su efectividad en biocontrol y estimulación de crecimiento. La mayoría de los estudios han sido realizados en los últimos años.

Araya et al. (2003) evaluaron la efectividad de varios biocontroladores sobre el control de plagas en la zona norte de Costa Rica. Inicialmente visitaron la zona para conocer los principales cultivos que se sembraban, luego realizaron un estudio de las plagas más importantes de estos cultivos y por último identificaron el efecto que estaban teniendo algunos biocontroladores por medio de ensayos de campo, utilizando aplicaciones de los biocontroladores por medio de bombas de espalda en concentraciones de 10^8 y 10^9 conidias/ml. Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran la acción positiva del biocontrol que tuvieron algunos microorganismos, como *Beauveria bassiana*, sobre plagas como el león de los áfidos (*Chrysopa* spp.) en guayaba y en yuca contra mosca blanca.

Más recientemente Campos (2009) en su tesis de grado, evaluó el efecto de la inoculación de sustratos con *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento y producción de plantas de chile dulce bajo ambiente controlado. Los resultados obtenidos en este estudio demostraron la capacidad de *Trichoderma* spp. de movilizarse, colonizar y establecerse en diversos ambientes, ya que en los tratamientos sin inoculación con *Trichoderma* spp. y en el piso del invernadero (piedra volcánica), se logró aislar el hongo, evidenciando que se dio una contaminación de los tratamientos testigo, por lo que no se encontraron diferencias significativas del efecto del hongo en el crecimiento de las plantas.

Caballero (2011) utilizó cepas de *Trichoderma* spp. para evaluar el control del mal de Panamá (*Fusarium oxysporum*) en banano. En las pruebas encontró un retardo de alrededor de tres semanas en la aparición de los síntomas de la enfermedad, en reducir hasta en un 90% de los síntomas externos de la enfermedad en comparación con los testigos y una disminución significativa de los síntomas internos de la enfermedad.

A pesar de que el estudio se enfocaba en el control de la enfermedad, se documentaron los efectos en el desarrollo de las plantas, donde resalta un aumento en el peso de raíz y follaje de la planta en un 109% y 148% respectivamente, además de un incremento significativo de la altura de las plantas en comparación con el testigo.

En otro estudio realizado por el ICAFE (2009) se compararon tres productos comerciales de *Trichoderma* spp. para el control de la llaga macana (*Ceratocystis fimbriata*) en plantas de almácigo de café, variedad caturra, de aproximadamente 6 meses de edad. Las cepas comerciales del biocontrolador eran dos de *T. lignorum* y una de *T. harzianum*. La variable evaluada fue la mortalidad de plantas durante 6 meses. Se obtuvo como resultado que uno de los productos comerciales de la cepa *T. lignorum* tuvo valores significativos de mortalidad menores que el testigo siendo el más eficiente en este caso, sin embargo las otras también mostraron una reducción poco significativa de mortalidad de plantas.

4.6 Generalidades de la finca productora LyL.

Los productos biológicos son comúnmente encontrados en los programas de aplicación de cualquier finca piñera de Costa Rica. La finca productora y empacadora LyL proyectos no es la excepción, actualmente cuentan con aproximadamente 300 ha de piña convencional y están en proceso de iniciar siembras orgánicas.

Los mecanismos de control contra los patógenos de suelo que se han venido utilizando en la finca LyL son principalmente químicos y culturales, sin embargo, en los últimos años se ha comenzado a utilizar productos biológicos producidos a nivel nacional. Dentro de los productos biológicos que utilizan se encuentra *T. harzianum*, *Azotobacter* spp. y bacterias descomponedoras para los residuos.

La finca tiene muchos años produciendo y exportando producto fresco tanto a Estados Unidos como a Europa. Actualmente es una de las fincas con mejor rendimiento y calidad de fruta en la zona de Pital de San Carlos. No obstante, se han encontrado

problemas serios principalmente con el hongo *Fusarium* spp., *Phytophthora* spp. y la bacteria *Erwinia* spp., justo después de la siembra y luego de que se realiza la inducción o forza (periodo post-forza), donde indican que la afectación de las plantas por parte de estos patógenos después de la forza es muy alta, perjudicando el rendimiento y calidad de la fruta.

Fusarium spp. es el agente causal de la enfermedad conocida mundialmente como Fusariosis, considerada una de las enfermedades de mayor importancia en el cultivo de piña debido a la susceptibilidad que presenta la variedad de piña MD-2. Esta enfermedad puede atacar cualquier parte de la planta y en cualquier etapa del cultivo, siendo la etapa de desarrollo inicial y la etapa pos-forza, las dos etapas más susceptibles al ataque del hongo (OIRSA, 2011).

A este efecto tan negativo que tiene la fusariosis sobre el cultivo de la piña en Costa Rica, se le suman otros problemas no menos importantes causados también por patógenos de suelo de los géneros: *Pythium* spp., *Sclerotium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Phytophthora* spp. y *Erwinia* spp., que juntos, causan un efecto muy perjudicial en las plantas, traduciéndose en pérdidas económicas significativas para los productores de piña.

Los productos a base de microorganismos que se utilizan en piña, son tanto producidos en Costa Rica como importados desde otros países como Estados Unidos, Canadá, Taiwan, Holanda. Cada uno de ellos debe de contar con un estudio previo de calidad, donde se incluya viabilidad del microorganismo, pureza y concentración; la mayoría de ellos cumplen con estos requisitos ya que sus fabricantes realizan las pruebas de calidad pertinentes y las indica en la etiqueta, sin embargo existen algunos que no especifican esta información, lo que produce cierta incertidumbre por parte de los productores. Por esta razón, el Servicio Fitosanitario del Estado en conjunto con la Universidad de Costa Rica están trabajando en un protocolo para aplicarlo a nivel nacional, donde cada insumo biológico, importado o nacional, debe de someterse a pruebas de calidad para corroborar sus especificaciones, las cuales debe cumplirlas, sino no podrá ser registrado en caso de que sea un producto nuevo para registrar o perdería el registro en caso de que ya estuviera registrado. De esta manera el MAG

(Ministerio de Agricultura y Ganadería de Costa Rica) estaría dando una garantía real al productor de la calidad de estos productos¹

5. MARCO TEÓRICO

5.1 Descripción botánica de la piña.

La piña (*Ananas comosus*) es una planta herbácea y perenne, monocotiledonea que pertenece a la familia de las Bromeliaceae, la cual es originaria de las zonas tropicales y subtropicales de Paraguay y Brasil (Jimenez, 1999); actualmente se encuentra diseminada alrededor del mundo, incluyendo Costa Rica. Es una planta con un sistema radical principalmente de raíces adventicias secundarias y fibrosas las cuales emergen del tejido vascular que separa el cilindro central de la corteza del tallo. Se ubican generalmente en la superficie del suelo y su vida y actividad se ve afectada directamente por condiciones físicas, químicas y microbiológicas del suelo. Durante los primeros meses de desarrollo de la planta, la cantidad de raíces que la planta pueda tener, depende en gran medida del peso y tipo de material que se sembró y la cantidad de raíz va a ir en aumento conforme se incrementa el peso del tallo (Py et al. 1987).

La planta posee un tallo corto y robusto, el cual se ancla al suelo por el sistema radicular y puede medir hasta 30 cm de largo y 6,5 cm de ancho en la base. Las plantas adultas pueden llegar a medir de 1 a 1,20 m de altura y cuentan con 60 a 80 hojas adheridas a la base del tallo (Py, 1968) las cuales pueden retener alrededor de 7% de agua, gracias al sistema de tricomas con que cuentan; esta característica va a favorecer las aplicaciones foliares, práctica muy común en el cultivo de piña (Jiménez, 1999).

Las plantas de piña son capaces de soportar condiciones adversas como acidez de suelos y poca disponibilidad de agua, esto último debido a que se encuentran dentro del grupo de plantas CAM (Crassulacean Acid Metabolism), las cuales mantienen los estomas cerrados durante el día para evitar pérdidas de agua.

¹ Acuña, 2014. Com. Pers.

El ciclo del cultivo de la piña es de un año y tres meses aproximadamente, dependiendo de la variedad, donde la velocidad en el desarrollo depende mucho de las condiciones de manejo y sanidad que se le brinde a las plantas. En Costa Rica una planta logra alcanzar el peso adecuado para la inducción floral de 5,5 libras a los 8 o 9 meses. Esta inducción se realiza generando un estrés a la planta por medio de etileno, el cual induce inmediatamente a la diferenciación floral. Desde el momento que se realiza la inducción o forza, le toma a la planta alrededor de 5 meses para producir un fruto óptimo para el consumo (Castro, 2000).

El estrés que se genera en la planta el cual provoca la floración también se puede dar de manera natural por una disminución de la temperatura ambiental, combinado con una nutrición deficiente. Este fenómeno es ampliamente conocido como “fruta natural”, y se presenta generalmente en el mes de noviembre y diciembre donde se da una disminución considerable de la temperatura, producto de los vientos Alisios del Norte que entran por la vertiente Atlántica de Costa Rica.

La piña es considerada no climatérica, ya que produce pequeñas cantidades de etileno, por ello es normal que unos días antes de la cosecha del fruto, se aplique nuevamente etileno, con el fin de que el fruto madure externamente.

5.2 Características del híbrido MD-2

En Costa Rica prácticamente el 100% de las siembras de piña se realizan con el híbrido MD-2, el cual fue desarrollado e introducido por PINDECO (Pineapple Development Corporation) y la comercialización de la fruta inició en 1996. En los mercados internacionales es considerado como un fruto de lujo por su presentación y aroma, además de ser una fruta cilíndrica de pulpa amarilla y con alto contenido de vitamina C (León, 2007).

5.3 Principales enfermedades de suelo que afectan la raíz de la piña.

5.3.1 *Fusarium* spp.

El hongo *Fusarium* spp. es un hongo ascomiceto, mundialmente conocido por ser un agente patógeno de gran cantidad de cultivos. Se considera un hongo con gran habilidad saprofítica que puede sobrevivir en el suelo y en la materia orgánica por largos periodos de tiempo, por lo que se le considera un saprófito facultativo, capaz de invadir el interior de las raíces de plantas causando un daño que sino se logra controlar a tiempo, llega a causar grandes pérdidas económicas por mortalidad de plantas o por disminución significativa de la calidad del producto. En el cultivo de piña, este hongo ha causado grandes problemas en Brasil, donde el *F. gutiforme* causó el cierre de plantaciones por su alta incidencia. A pesar de que este patógeno tiene la capacidad de ingresar a la planta sin que exista una herida en la raíz o tallo, la presencia de esta enfermedad en campo se relaciona con condiciones que ocasionan algún estrés en la raíz, como la apoxia, anoxia o algún daño mecánico. Las condiciones ideales para que este hongo se desarrolle son temperaturas entre 23°C a 28°C, mucha lluvia y alta humedad relativa. Sus formas de diseminación son por partículas de suelo, agua, viento, insectos, semillas y material vegetal contaminado (BANACOL, 2005). La identificación de las colonias de *Fusarium* spp. en el laboratorio no es complicado, ya que presenta un micelio color blanco y en la parte trasera de la placa Petri presenta una coloración rosada-lila y conforme pasa el tiempo y el hongo consume los nutrientes, la coloración se torna morada y en el micelio se comienza a notar el color rosado.

Algunos de los síntomas de la presencia de esta enfermedad en campo son:

- Clorosis de hojas basales
- Síntomas de deshidratación de la planta
- Presencia de espinas en las hojas (causado por estrés)
- Pobre desarrollo del fruto
- Decoloración, amarillamiento y necrosis del tejido basal del tallo.
- Escaso o nulo desarrollo radical y necrosis en la raíz.

5.3.2 *Phytophthora* spp.

Esta enfermedad es considerada la más importante en el cultivo de piña por sus efectos tan negativos que ha tenido históricamente. Es un hongo imperfecto oomycete, saprófito, que se reproduce mediante clamidiosporas, esporangios y oosporas. Generalmente en las plantaciones se encuentran dos especies: *P. parasitica* y *P. cinnamoni*, las cuales afectan el cultivo en distintos estadios. La primera se presenta en etapas de desarrollo entre los 45 y 65 DDS y de los cinco a los siete meses después de siembra, mientras que la segunda se observa después de forza, principalmente en el fruto. Ambas especies prefieren días lluviosos, calurosos, con alta humedad siendo la época lluviosa la de mayor incidencia, sin embargo, *P. cinnamoni*, también se puede desarrollar en época seca. Sus esporas necesitan humedad para poder germinar y se diseminan mediante el agua, aire, vectores y material contaminado. La enfermedad se observa generalmente en bordes de caminos o de cunetas y en áreas donde se maltrata mucho la plantación con maquinaria y su distribución es principalmente en parches (BANACOL, 2005).

Algunos de los síntomas que comparten ambas especies son:

- Clorosis y amarillamiento progresivo del follaje.
- Fácil desprendimiento de las hojas del centro, con presencia de un halo necrótico a 1 o 2 pulgadas sobre el punto del desprendimiento.
- Olor a descomposición del área necrótica
- Necrosis basal progresiva con halo en el fruto (cuando se presenta en fruto).
- Halo necrótico en corte longitudinal del tallo.
- Raíz necrótica no funcional que comúnmente se desprende al sacar la planta del suelo.

5.3.3 *Erwinia* spp.

Erwinia se considera la segunda enfermedad mas conocida en el cultivo de piña después de *Phytophthora* spp. Este género son bacterias gram negativas, flageladas y móviles, donde todas sus especies son patógenos de plantas. Existen dos especies que afectan la planta de piña en dos momentos distintos su desarrollo, *E. carotovora*, la cual se presenta entre los 6 y 7 meses después de siembra y *E. chrysanthemi* que

afecta frutos y hojas basales, cuando el fruto está en su etapa de maduración. Esta enfermedad afecta el cultivo principalmente en momentos de transición climática, donde se combinen humedad y altas temperaturas. Su incidencia va desde baja hasta alta, dependiendo del control que se realice y su distribución es generalmente en parches, donde las plantas sufran algún tipo de daño mecánico, como en bordes o lugares de ingreso de personal y maquinaria. Su diseminación se da por medio de agua, vectores y en partículas de suelo y puede sobrevivir varias semanas en suelos secos (BANACOL, 2005).

Algunos de los síntomas que comparten ambas especies son:

- Ablandamiento necrótico del tejido y desprendimiento de hojas.
- Levantamiento de epidermis en la parte basal
- Olor fuerte a amoníaco
- Ablandamiento del tallo.
- Necrosis húmeda basal de la fruta, liberación de amoníaco en forma de burbujas (para el caso de *E. chrysanthemi* que afecta a los frutos).

5.4 Control biológico.

Krishna et al. (2006) definen el control biológico, como la utilización de cualquier organismo vivo (insectos predadores, nematodos entomopatógenos o microorganismos antagonistas) para suprimir la actividad de las poblaciones de plagas y enfermedades. En cualquiera de los casos el organismo que suprime estas poblaciones se conoce como agente de control biológico, donde se puede utilizar una sola especie que ocasione la supresión de la plaga o enfermedad o también se puede utilizar varias especies con capacidad de control como agente de control biológico (BCA, por sus siglas en inglés). El control biológico se presenta gracias a distintos mecanismos de interacción que activa el agente de control, una vez que se encuentre en contacto con el patógeno o con el hospedero que esta siendo afectado, donde siempre debe de existir una especificidad entre el agente y el patógeno.

Existen tres categorías de antagonismo descritas por Krishna et al. (2006),

parasitismo, antibiosis y competencia por espacio, dentro de las cuales se derivan mecanismos más específicos de los agentes biológicos de acuerdo a sus necesidades; algunos de estos agentes cuentan con todos los mecanismos de antagonismo, mientras que otros solo con algunos de ellos.

En muchos de los casos se requiere que exista un contacto físico entre el BCA y el patógeno para que pueda existir el antagonismo, tal es el caso del hiperparasitismo o predación, sin embargo, no siempre se necesita este contacto tan directo, ya que por medio de mecanismos como competencia e inducción de resistencia el BCA puede ocasionar el mismo efecto antagonista.

Los microorganismos que contribuyen en el control biológico, generalmente se clasifican como saprófitos competitivos, simbiontes facultativos de plantas e hiperparásitos facultativos. Algunos ejemplos de bacterias de este tipo son: *Bacillus*, *Burkholderia*, *Lysobacter*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, entre otros y algunos ejemplos de hongos: *Ampelomyces*, *Coniothyrium*, *Dactylella*, *Gliocladium*, *Paecilomyces*, *Trichoderma*, *Phytium*, entre otros.

5.4.1 *Trichoderma* spp.

El género *Trichoderma* se caracteriza por ser un hongo saprófito que está presente en la mayoría de los suelos de nuestro país y del mundo y es uno de los microorganismos más estudiados por sus grandes cualidades antagónicas aplicados a un gran número de plantas y con un amplio espectro de aplicación, por ello ha tenido gran auge en el ámbito nacional. En Costa Rica, este género es uno de los bio-fungicidas mayormente utilizados en los cultivos de piña. Es un microorganismo realmente eficiente como bio-controlador por su efecto fungicida debido a que actúa como hiperparásito competitivo produciendo metabolitos secundarios (antibióticos) y enzimas hidrolíticas, capaces de destruir las paredes de los hongos patógenos a los cuales ataca (Ezziyyani et al. 2004).

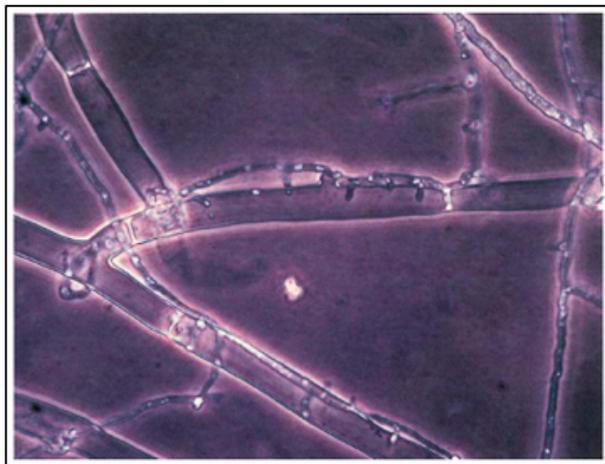


Figura 1. Penetración de las hifas de *R. solani* por hifas mas pequeñas de *T. virens*.
Fuente: Howell, (2003).

En un estudio de laboratorio realizado por Hernández et al. (2006) se observó un efecto muy positivo del *Trichoderma* spp. sobre el control in vitro de los principales patógenos que afectan el cultivo de piña en sus primeras etapas de desarrollo (*P. nicotianae*, *R. solani* y *F. subglutinans*). Se encontró y se demostró una alta capacidad antagonista de tres especies del género *Trichoderma* spp., gracias a la competencia que ejerce el hongo por el sustrato y a su gran capacidad parasítica. Las colonias de *Trichoderma* spp. crecieron rápidamente sobre la placa petri, colonizando eficientemente a los 3 patógenos estudiados. Cabe señalar que para este estudio se utilizaron tres especies de *Trichoderma* spp. donde cada una ejerció un control distinto sobre los tres patógenos estudiados, siendo *T. hazardium* la que tuvo un porcentaje mayor de control (48%), sobre las colonias del *F. Subglutians*.

Otro de los mecanismos de acción conocidos para este antagonista es la inducción de resistencia, la cual se encuentra dentro de las estrategias de antagonismo indirecto, sin embargo si se suma al fuerte grado de hiperparasitismo, producción de enzimas y competencia, el resultado es un microorganismo con alta capacidad de biocontrol sobre diversas enfermedades.

5.4.2 *Phytium olygandrum*.

Este hongo pertenece al grupo de los oomicetes, el cual, al igual que el *Trichoderma* spp. ha sido estudiado por sus grandes capacidades de antagonista. Los mecanismos

de acción que se han observado según Picard et al. (2010) son los de micoparasitismo, antibiosis, producción de enzimas hidrolíticas e inducción de resistencia. Mubben et al. (2005) mencionan como este hongo con hifas tipo gancho, aislado de una cucurbitácea, tenía la capacidad de controlar otros oomicetes y muchos otros hongos patógenos.

5.5 Estimulación del desarrollo.

Otra de las características de este tipo de microorganismos es su alta capacidad bio-estimulante radicular y foliar. Muchos de los géneros que están siendo utilizados como biocontroladores, incluyendo los géneros *Trichoderma* y *Phytium*, son capaces de liberar sustancias que estimulan la producción de enzimas por parte de la planta encargadas del crecimiento vegetal, al estimular y acelerar el desarrollo de los meristemas de las partes jóvenes de las plantas. Ha quedado demostrado que el género *Trichoderma* posee fuertes características bio-estimulantes tanto así que también se incluye dentro de las nuevas alternativas de los bio-fertilizantes (Pérez et al. 2012) o microorganismos que de una u otra manera favorecen el desarrollo de las plantas que finalmente se expresará con un mejor rendimiento de cosecha.

En la estimulación del desarrollo de las plantas, las raíces juegan un papel mas que determinante ya que afectan directa y positivamente sobre un volumen de suelo al cual se le conoce como rizosfera y es en este sitio donde los microorganismos benéficos se establecen y realizan relaciones simbióticas con las plantas, las cuales generan beneficios como la absorción y solubilización de nutrientes, estimulación radical y producción de sustancias de defensa (Harman, 2006); todo ello gestionado inicialmente por las plantas para atraer dichos microorganismos benéficos que contribuyan a un optimo desarrollo de las plantas (Berg y Smalla, 2008).

5.6 Eficacia y calidad de un producto biológico.

Cada uno de los productos biológicos que son registrados en Costa Rica, deben de presentar pruebas suficientes, las cuales garanticen su eficacia en los distintos cultivos que se está recomendando (Decreto Ejecutivo, 2004), es por ello que los parámetros

de calidad son indispensables para determinar que tan eficaz puede ser un determinado producto.

Existen algunas otras alternativas de productos bio-fungicidas, por ejemplo aquellas formulaciones en polvo, los cuales garantizan que el producto puede permanecer por muchos años viable mientras tenga las condiciones de almacenamiento adecuadas, otros incluyen microorganismos que producen esporas de resistencia o clamidiósporas asegurando una mayor agresividad a la hora del establecimiento en un suelo y algunos otros que funcionan a muy bajas dosis.

A pesar de que estos insumos son fabricados bajo técnicas de alta tecnología y las casas comerciales aseguren que sí funcionan, la eficacia en campo y calidad de un producto a base de microorganismos debe ser evaluado de distintas maneras, para que el resultado pueda ser la prueba verás de que el producto realmente cumplirá con lo que la etiqueta indica y que el efecto que tendrá sobre el cultivo sea realmente el esperado.

Según indica Vargas (2013) el éxito de los insumos biológicos está en garantizar en que en el momento de su utilización, se encuentre en óptimas condiciones y que cumpla eficientemente con el propósito de su formulación, lo que significa que un producto de alta calidad debe de cumplir con tres aspectos esenciales:

- Debe ser viable, el microorganismo necesariamente debe de tener una alta y rápida capacidad de reproducción en el suelo u otro medio de cultivo.
- Debe de tener un alto grado de pureza, que evite la interferencia entre distintos géneros de microorganismos.
- Debe de tener una concentración adecuada para que su aplicación en el cultivo tenga un efecto tangible a un corto y mediano plazo.

De acuerdo con Fernández-Larrea (2002), hay normas establecidas por el Grupo Activo de Control de Calidad de la Organización Internacional de Control Biológico, donde se incluyen los tres aspectos de calidad antes mencionados (viabilidad, concentración y pureza) que garantizan al consumidor un producto realmente efectivo.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Ubicación y generalidades.

El estudio se llevó a cabo en la empresa productora y empacadora de piña LyL proyectos, la cual se localiza 300 metros sur de la bomba del Sahino de Pital, San Carlos, Alajuela, que se encuentra a una altitud de 160 msnm aproximadamente, con una precipitación promedio anual de 3365 mm y una temperatura promedio de 26° C. El área neta sembrada actualmente ronda las 130 hectáreas de piña convencional, con siembras semanales de 1 hectárea (65000 plantas/ha). Se proyecta iniciar áreas de siembra de transición a piña orgánica.

El suelo donde se llevó a cabo el ensayo, es un suelo viejo, muy meteorizado, con problemas de acidez importantes (Anexo 2) por la poca presencia de bases debido a su intenso uso y a las pérdidas por erosión. Presenta sistemas de drenajes con gavetas para un mejor control de la humedad del suelo y evitar el encharcamiento debido las malas características de físicas que presentan estos suelos.

Las estrategias de combate de enfermedades que utilizaban en la finca en el momento del estudio, fueron básicamente control químico, combinado con aplicaciones mensuales de un producto a base de *Trichoderma* spp. a modo de prevención.

Las pruebas in vitro de calidad y viabilidad de los productos evaluados, se realizaron en el laboratorio de Bioquímica de Procesos Orgánicos del Centro de Investigaciones Agronómicas (cia) de la Universidad de Costa Rica.

6.2 Prueba de eficacia de los insumos biológicos.

6.2.1 Selección de plantas enfermas en campo.

Se realizó una visita de campo, específicamente al área donde se desarrolló el ensayo y se ubicaron las zonas que se observaban más afectadas por enfermedades o con un historial negativo, tomando en cuenta el conocimiento

y experiencia de los encargados de la finca. Se tomó una muestra de 5 plantas con síntomas visuales en la parte aérea y en la raíz, con posible presencia de hongos como *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp. o *Phytophthora* spp. sacando cada planta con su sistema radical e identificando algún daño a la parte radical ; la presencia de estos hongos se identifica en las fincas piñeras por presentar síntomas de amarillamiento y/o quema de hojas, plantas pequeñas con poco o nulo desarrollo radical (Figura 2). En la mayoría de los casos no se hace diferencia entre un hongo, sino que todos los síntomas anteriores se toman como un problema fúngico en general.

Una vez que se identificaron las plantas, se extrajeron y se embolsó su parte radicular con suelo húmedo para que la raíz se mantuviera fresca por mas tiempo, se etiquetaron y se trasladaron al laboratorio de Bioquímica de procesos orgánicos en el cia.



Figura 2. Síntomas de posible presencia de *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp. o *Phytophthora* spp., en plantas de piña. Fuente: Banacol (2005).

6.2.2 Aislamiento del o los patógenos.

Una vez en el laboratorio, se separó el suelo de cada planta, se lavó abundantemente su raíz con agua de tubo, para luego seleccionar tejido de la raíz y del tallo que se observara con daño (aproximadamente 10 gramos de cada parte). Se lavó con alcohol al 70% tres veces y luego se dejó remojando por 3 minutos en agua destilada (Figura 3).



Figura 3. Proceso de lavado y separado de partes de raíz y tallo para el posterior aislamiento de patógenos de la raíz de la piña.

Posteriormente en la cámara de transferencia, de la manera mas aséptica posible, se cortaron segmentos pequeños de raíz y tallo de cada planta por separado y se colocaron cuatro trocitos en cada borde de una placa petri con medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar). Se realizaron dos placas petri con raíz y dos más con tallo basal por planta, para un total de diez placas de raíz y diez placas de tallo basal. Por último, se identificó y se selló cada placa petri con parafina y se colocaron todas las placas en una incubadora a 25° C por tres días (Figura 4).

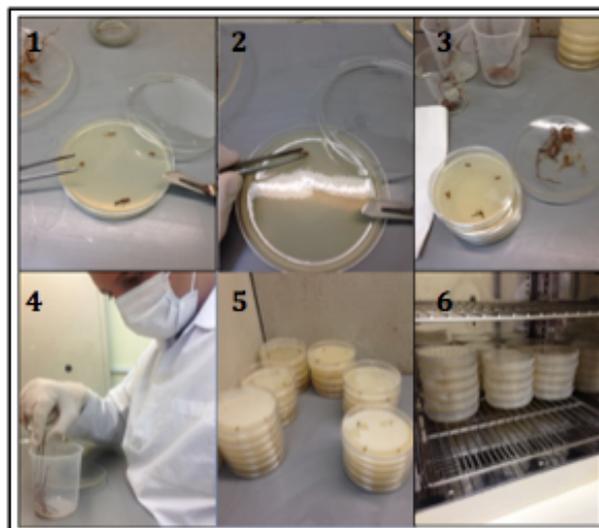


Figura 4. Secuencia del proceso aséptico de aislamiento de microorganismos en el laboratorio de bioquímica de procesos orgánicos.

6.2.3 *Identificación de los patógenos.*

A los tres días de incubación se procedió a identificar el hongo *Fusarium* spp. por medio de observaciones visuales del micelio al microscopio, comparándolo con guías de identificación (Anexo 4); además se montaron muestras en porta objetos, para observar al microscopio estructuras más específicas del microorganismo, para poder identificarlos de una manera más precisa. Para efectos de esta investigación, el interés de la finca fue determinar el efecto de los productos específicamente sobre el patógeno *Fusarium* spp. (no se pudo identificar la especie de *Fusarium* spp. ya que para eso se necesitaban pruebas moleculares, las cuales tienen un costo más elevado y la finca no estuvo de acuerdo en realizar este gasto).

6.2.4 *Purificación de las colonias del patógeno.*

La purificación de un microorganismo consiste en tomar una pequeña muestra de la colonia y colocarla en un nuevo plato Petri con el medio de cultivo en que se reproduzca mejor el microorganismo que se quiere purificar, de esta manera, se genera una nueva colonia, la cual se denomina F1; si en la F1 se encuentra algún tipo de contaminación, se puede repetir el proceso de purificación nuevamente para obtener la colonia F2 y así sucesivamente hasta que se logre una colonia del microorganismo completamente pura.

Para el caso del estudio en cuestión, una vez identificadas las colonias de *Fusarium* spp. se cortaron en pequeños cuadros las colonias que no estuviesen contaminadas por otros microorganismos y se colocaron en el centro de nuevas placas de PDA. En total se realizaron diez placas de PDA y se colocaron nuevamente en la incubadora a 25° C por 8 días (para que se dé el mayor crecimiento posible de las colonias en cada placa). En este caso solamente fue necesario realizar una única purificación por lo que se trabajó con la F1 (Figura 5).

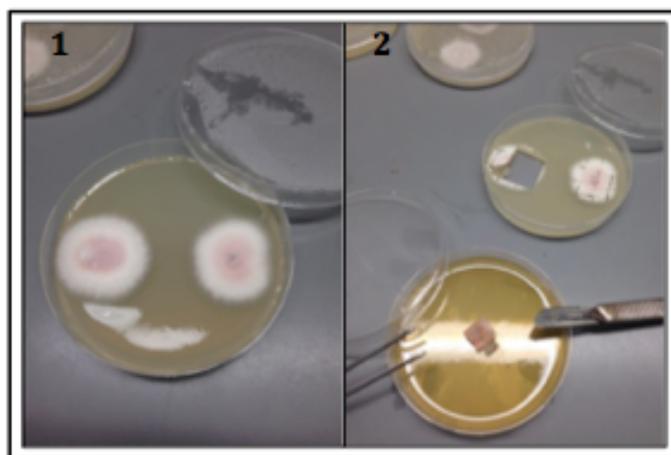


Figura 5. Purificación de las colonias de *Fusarium* spp. obtenidas del aislamiento de partes de raíz y tallo de plantas de piña con síntomas de enfermedades de raíz.

6.2.5 Selección de los productos a evaluar.

Se eligieron tres productos biológicos a base de *Trichoderma* spp. y otro a base de *Pythium oligandrum*, el cual querían que se evaluara, a pesar de que presenta otras condiciones de formulación y evaluación. Todos los productos se encuentran actualmente en el mercado y se aplican en el cultivo de piña, los cuales fueron previamente seleccionados por los encargados de la finca. Las dosis de los insumos fueron las recomendadas por las empresas formuladoras de los mismos.

Cuadro 1. Características de los insumos biológicos a utilizar.

Casa Fabricante	Producto	Ingrediente Activo	Concentración	Formulación	Dosis	País de procedencia	Cepa
Lab. Dr. Obregon	Bio-Protection	<i>Trichoderma asperellum</i>	$2,5 \times 10^9$ UFC/l	líquida	6 l/ha	Costa Rica	No indica
Bioeco Natural	Tricho eco	<i>Trichoderma harzianum viridae</i>	$2,5 \times 10^9$ UFC/l	Sólida (base arroz)	4 kg/ha	Costa Rica	TRO2
Innovative agriculture products	Polyversum	<i>Pythium oligandrum</i>	$1,0 \times 10^6$ zoosporas/g	Sólida (en polvo)	100 g/ha	Republica Checa	No indica
Inbiosa	Tricho Aid	<i>Trichoderma harzianum</i>	$1,0 \times 10^{10}$ conidias/g	Sólida (en polvo)	300 g/ha	Costa Rica	No indica
Biotech	Bio Trich	<i>Trichoderma harzianum</i>	$4,0 \times 10^9$ esporas/ml	Sólida (en polvo)	1 kg/ha	Costa Rica	No indica

6.2.6 Prueba de eficacia de los productos contra el patógeno *Fusarium* spp.

Se evaluaron cinco tratamientos contra un testigo. Para cada tratamiento se establecieron cinco repeticiones y la unidad experimental fue una placa petri con medio de cultivo PDA, el cual es el medio de cultivo que se utiliza en para este tipo de estudios en el laboratorio de bioquímica de procesos orgánicos y que para efectos de esta evaluación fue el que se tenía disponible. Cada plato con medio de cultivo contenía un disco de colonia del patógeno de 1,5 cm de diámetro.

Para evaluar la actividad antagónica de cada producto se utilizó la técnica descrita por Cherif y Benhamou (1990). Para cada uno de los cinco tratamientos o productos se depositó un disco de 1,5 cm de diámetro tomado con un sacabocados de micelio activo del hongo patógeno, en un plato Petri con PDA previamente inoculado con un volumen de concentración conocida de cada tratamiento, utilizando el protocolo del manejo de insumos del laboratorio de bioquímica de procesos orgánicos del cia, descrito a continuación y que además se ilustra en las Figuras 6, 7 y 8:

- se toman 10 g o ml de muestra/producto y se diluyen en 90 ml de agua destilada.
- De esta dilución madre, se toman 100 ul y se pasa a un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada (Primera dilución o 1×10^1)
- de la primera dilución se saca otra muestra de 100 ul y se pasa a otro tubo de ensayo, para una segunda dilución (1×10^2),
- luego se toma una última muestra pero esta vez de 10 ul que se aplica al plato Petri la cual seria la tercera dilución (1×10^3)

Se realizó una única lectura a los 8 días de que se incubaron las placas Petri y se clasificó el tipo de antagonismo según Bell et al (1982), donde:

100%= el antagonista sobrecrece al patógeno y se encuentra en la totalidad de la placa con el medio.

75%= el antagonista sobrecrece más de dos terceras de la placa con el medio.

50%= tanto patógeno como antagonista colonizan aproximadamente la mitad del medio.

25%= el antagonista no sobrepasa ni una cuarta parte de la placa petri, mientras que el patógeno coloniza el resto.

Sin crecimiento= No existe crecimiento alguno de colonia del antagonista en el medio de cultivo.



Figura 6. Preparación y pesaje de las muestras de los cinco productos para el estudio de eficacia de insumos biológicos (arriba los cinco productos, abajo izquierda producto Bioprotection, abajo derecha producto Polyversum)



Figura 7. Productos pesados y listos para la dilución (arriba). Preparación de los discos de inóculo de *Fusarium* spp. para ser colocados en el nuevo plato Petri (abajo).

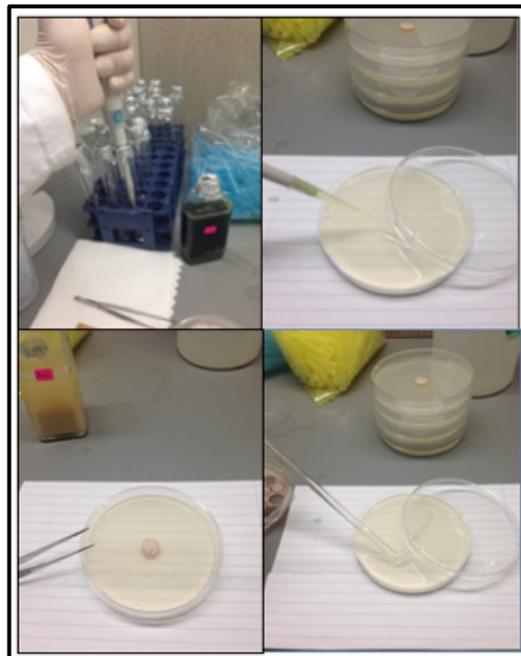


Figura 8. Proceso de dilución final para la prueba de eficacia, donde se impregnó un plato con cada producto (arriba) y luego se colocó el disco de *Fusarium* spp. (abajo)

6.3 Evaluación de la calidad de los insumos.

La metodología que se utilizó para la evaluación de calidad de los insumos, fue la misma del protocolo que se utiliza actualmente en el laboratorio de bioquímica de procesos orgánicos del cia.

Para obtener la concentración de esporas, se tomó 1 g de cada producto, se diluyó en 9 ml de agua destilada, se agitó por 1 minuto y se obtuvo una muestra de 0,1 ml de la solución y se colocó cuidadosamente una gota en la cámara de Neubauer, para realizar el conteo por medio del microscopio y de manera visual, tomando en cuenta las características de las esporas según la literatura de los microorganismos en cuestión.

En el caso de la determinación de la viabilidad, se diluyó 1 g de cada producto, en una solución de agua destilada con azúcar al 5%; una vez agregado cada producto, se dejaron los tubos en reposo por 24 horas. Pasado este periodo de tiempo, se tomó 0,1 ml de cada solución con los productos y se colocó 1 gota en la cámara de recuento de Neubauer, para finalmente poder realizar el conteo de las esporas que se observaran en las primeras etapas de germinación y así determinar su viabilidad (Figura 9).

Por último, se determinó la pureza de cada producto mediante la técnica de dilución en Plato Petri en medio PDA. Los parámetros que se evaluaron en este caso según Fernández-Larrea (2002) se exponen a continuación:

Cuadro 2. Parámetros y valores utilizados para determinar la calidad de un insumo biológico

PARÁMETRO	VALOR DESEADO
Viabilidad	Se evalúa de 10 a 24 horas después, debe ser mayor de 80%
Pureza	Debe ser mayor de 98%
Concentración	Según formulación, mayor efectividad si es superior a 10^9 esporas/g o ml.

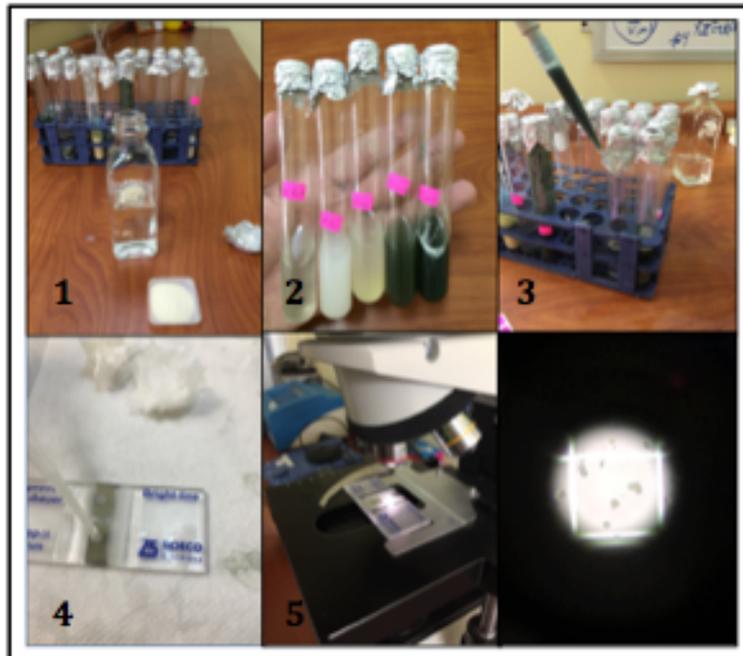


Figura 9. Proceso de preparación, montaje y conteo de esporas para determinación de la concentración y viabilidad de cada uno de los productos evaluados.

6.4 Prueba de campo para determinar la eficacia de los insumos sobre la incidencia de los hongos fitopatógenos y el desarrollo fenológico de las plantas.

Para llevar a cabo esta prueba, se determinó junto con los encargados de la finca, un área que históricamente ha tenido problemas recurrentes con enfermedades de suelo, principalmente *Fusarium* spp. y *Erwinia* spp., *Rhizoctonia* spp., *Phytophthora* spp. entre otras. Una vez escogida el área se tomaron muestras representativas de la zona (lote 6) y se analizó su estado químico y microbiológico (Anexos 2 y 3).

Los encargados del proyecto por parte de la finca, prefirieron evaluar el efecto de los productos en la etapa de desarrollo inicial del cultivo (de los 2-9 meses) en la cual la planta inicia la producción de raíces, y al ser tejido nuevo y joven son un blanco fácil para el ataque de los patógenos y en la etapa pos-forza se da un estrés causado por el etileno que genera mayor susceptibilidad de las plantas a ataques de patógenos, principalmente de *Fusarium* spp.

Se establecieron en campo aleatoriamente los tratamientos con los productos que se evaluaron en la etapa de laboratorio de la siguiente manera:

Tratamiento 1 = Bio-Protection

Tratamiento 2= Tricho Aid

Tratamiento 3= Polyversun

Tratamiento 4= Bio Trich

Tratamiento 5= Tricho eco

Testigo de finca

Cada tratamiento con el producto biológico, fue parte de las aplicaciones normales que hacen en la finca; el área total donde se ubicaron todos los tratamientos recibió el mismo paquete tecnológico que el resto de la finca ya que el área sería cosechada para exportación.

Al ser un área de producción grande, existieron diferencias entre las fechas de siembra de algunos tratamientos, por ejemplo, el tratamiento uno tenía una diferencia de un mes y medio con el testigo, sin embargo estas diferencias no llegaron a ser mayores del mes y medio entre la siembra mas nueva y la siembra mas vieja. Por otro lado, previo a que se iniciaran las siembras, a todo el área del ensayo se le aplicó una dosis del producto Bioprotection que se utilizaba en la finca a modo preventivo; esta practica la realizaban en todos los ciclos nuevos de siembra, por lo que el tratamiento testigo de finca contaba con una aplicación de *Trichoderma* spp. un mes antes de la siembra de las plantas.

La programación de las cuatro aplicaciones a lo largo de los meses que se trabajó tuvo problemas con las fechas programadas al inicio del estudio; nunca se pudo cumplir el cronograma original de aplicaciones, las cuales estaban programadas con base en la primer aplicación y a partir de ese día las restantes tres aplicaciones se programaron para ser cumplidas con un mes exacto de diferencia entre una y otra sin embargo, para la segunda y tercer aplicación se tuvo un atraso de 22 días y 15 días.

Las aplicaciones de todos los tratamientos se realizaron en las primeras horas de la mañana, alrededor de las seis y siete, iniciando siempre por el tratamiento uno y finalizando con el tratamiento cuatro, todo el mismo día y considerando la apreciación general del clima en cada momento de aplicación (Anexo 1).

Por cada tratamiento se realizaron 4 repeticiones y la unidad experimental fue un área de 0,25 hectáreas o 2500 m² (24 m de ancho x 105 m de largo) donde se sembraron 16000 plantas aproximadamente. que es el área donde se gastan 1000 L de caldo de aplicación con un spray boom de 2 brazos de 12 metros cada uno (Figura 10).

En total, para cada tratamiento, se tuvo 1 hectárea de área de aplicación, lo que implica que se necesitaron 4000 litros de caldo para aplicar sobre aproximadamente 64000 plantas (en las 4 repeticiones por cada tratamiento). El área total del ensayo tomando en cuenta el testigo de finca, fue de 6 hectáreas.



Figura 10. Unidad experimental del ensayo en campo de la eficacia de distintos insumos biológicos en piña.

El establecimiento de los tratamientos en el campo, respondía a un diseño irrestricto, ya que se buscaba tener mayor representatividad de las condiciones reales del área de estudio. Sin embargo, una vez en campo, se optó por replantear y cambiar el diseño a un diseño restringido (repeticiones no aleatorizadas en el campo) ya que la logística de aplicación de los tratamientos con el spray boom no podía tomar mucho tiempo

debido a las muchas otras aplicaciones que se debían de realizar diariamente en la finca.

Una vez que se tomó la decisión de utilizar el diseño restringido, se marcó cada parcela con señales visibles para poder identificar las áreas que se debían aplicar y se le proporcionó un mapa al tractorista encargado de realizar la aplicación, donde se especificaba la ruta que debía seguir, siempre bajo la supervisión del jefe de aplicaciones. En la Figura 11 se presenta la distribución de los tratamientos en los bloques de la finca que se utilizaron como área de estudio; se observa como el tamaño de los bloques no es homogéneo entre si, por lo que a la hora de establecer los tratamientos, se tomó en cuenta esta situación por lo que se midieron las 0,25 ha correspondientes a cada tratamiento, siempre tomando en cuenta los bordes para cada repetición.

La logística de aplicación fue cargar la tanqueta del spray boom con 4000 litros de agua mas el producto, de los cuales 1000 litros de esta mezcla correspondían a una repetición. Este procedimiento se realizó para cada uno de los cinco tratamientos.

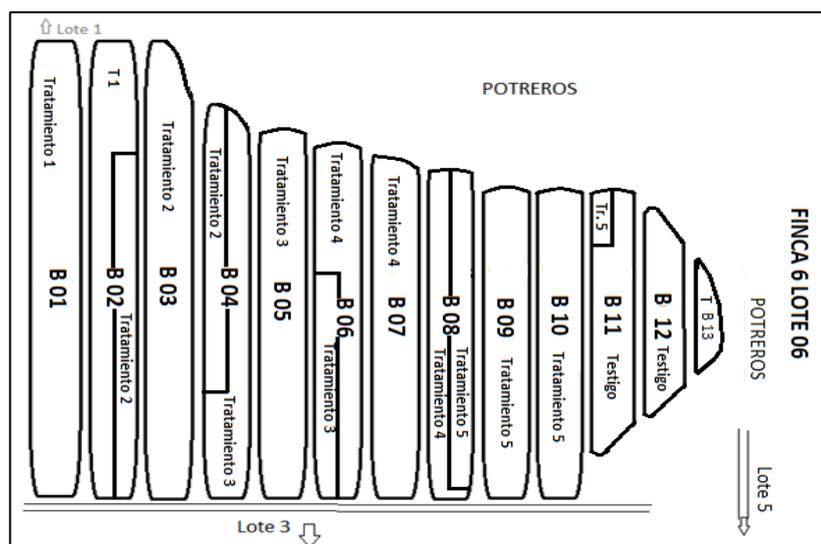


Figura 11. Mapa de la distribución de los tratamientos en el lote 6 de la finca LyL.

6.5 Evaluación de la incidencia de enfermedades fungosas sobre las plantas de piña.

Aproximadamente un mes después de finalizadas las cuatro aplicaciones de los tratamientos establecidos, se procedió a la evaluación de la incidencia. La incidencia se midió a partir de una muestra representativa por cada tratamiento cercana al 1% del total de plantas (612 plantas/tratamiento) por cada repetición se evaluaron 153 plantas de manera aleatoria tratando de representar todo el área evaluada, contando las plantas sanas e identificando las plantas enfermas que se observaban con pocas posibilidades de recuperarse, o que no iban a tener una buena cosecha. Todo esto bajo el criterio y conocimiento de los encargados de los muestreos y tomando en cuenta los síntomas más representativos de las enfermedades de suelo más críticas como lo son *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. y *Erwinia* spp. ya que ellos tienen muy claro los síntomas de enfermedades fungosas. No se realizaron identificaciones de las enfermedades presentes en las plantas, ya que no había presupuesto disponible para este tipo de análisis.

6.6 Evaluación del efecto de los insumos biológicos sobre el desarrollo del cultivo.

Se utilizó el área del ensayo anterior para realizar las evaluaciones sobre el desarrollo inicial del cultivo. Cada planta evaluada se extrajo y se trabajó de manera destructiva para evaluar todas las variables respectivas.

Las variables que se evaluaron en campo (Anexo 5) para este caso fueron:

- Peso hoja D (g)
- Largo hoja D (cm)
- Ancho hoja D (cm)
- Longitud radical (cm)
- Peso fresco de raíz (g)
- Peso fresco de parte aérea (g)

6.7 Análisis estadístico de los datos.

Para los datos del laboratorio no se realizaron pruebas estadísticas ya que únicamente se pretendía demostrar la viabilidad y calidad de cada uno de los productos. Se utilizaron solo de referencia para complementar los datos que se obtuvieron en campo.

Para los datos de desarrollo fenológico en campo, se efectuó una estandarización de los datos, debido a que se realizaron cuatro evaluaciones en el tiempo, dicha estandarización consistió en obtener un promedio de las cuatro evaluaciones. Una vez que se obtuvo este valor, se utilizó la prueba de análisis de variancia. Se evaluaron los gráficos de residuos de dicho análisis para determinar el tipo de normalidad y homogeneidad de las variancias de los datos.

Para el caso de los datos de enfermedades, debido a la información recopilada en campo y al diseño que se utilizó la prueba estadística que se utilizó fue un chi-cuadrado para determinar si hay relación entre las variables recolectadas.

7. RESULTADOS

7.1 Pruebas de calidad de los insumos biológicos.

Cuadro 3. Parámetros de calidad evaluados para cada uno de los productos biológicos estudiados.

Producto	Concentración (conidias/ml)	Viabilidad	Pureza
Bio Protection	2×10^8	77,60%	100%
Bio Trich	2×10^9	79,20%	100%
Polyversum	2×10^7	66,10%	NA
Tricho eco	9×10^8	87,80%	100%
Tricho aid	7×10^9	94,30%	100%

Según el cuadro anterior, se observa que el producto Tricho aid, presentó la concentración y viabilidad más alta de todos los productos, seguido por el Tricho eco. Los productos BioTrich, Polyversum y Bio Protection presentaron concentraciones altas, sin embargo la viabilidad estuvo por debajo de lo establecido por la metodología de Fernandes-Larrea (2002). Finalmente la pureza fue del 100% en todos los productos, a excepción del Polyversum, ya que no existió crecimiento de colonias en los platos Petri que se utilizaron para evaluar la pureza de este producto.

7.2 Ensayo de laboratorio: Pruebas de eficacia de insumos biológicos.



Figura 12. Efecto de productos biológicos sobre el control de *Fusarium* spp., (a) Tricho aid, (b) Tricho eco, (c) Bio trich, (d) Bio protection, (e) Testigo y (f) Polyversum.

En la Figura 12 se presenta el porcentaje de control que se observó en algunas de las placas Petri, de cada uno de los productos, frente al patógeno *Fusarium* spp. en la prueba de eficacia biológica. Según los resultados obtenidos en esta prueba, el producto Tricho aid, presentó el porcentaje de control más alto, con un 80% de control sobre el patógeno, luego el Bio- Trich, el cual presentó un 37% de control, seguido por el Tricho eco con solo un 1% de control y finalmente los productos Polyversum, Bio protection y el testigo, no se observó ningún crecimiento de la colonia del antagonista que afectara el patógeno.

7.3 Ensayo en campo: Desarrollo fenológico.

En la Figura 13 se presenta el peso de la hoja D con sus respectivas barras de error estándar, evaluado 15-22 días después de la aplicación de los tratamientos. Se observa una tendencia ascendente en todos a los 75, 101 y 140 DDS, sin embargo a los 215 días se presenta una leve disminución del peso en cuatro de los cinco tratamientos, siendo el Tricho eco y el testigo los únicos que tuvieron un pequeño aumento de peso.

Por otro lado se observa que las últimas tres evaluaciones el testigo se mantuvo por debajo de la mayoría de los tratamientos a excepción de la primera y última evaluación, donde tuvo valores mas altos que algunos de los tratamientos.

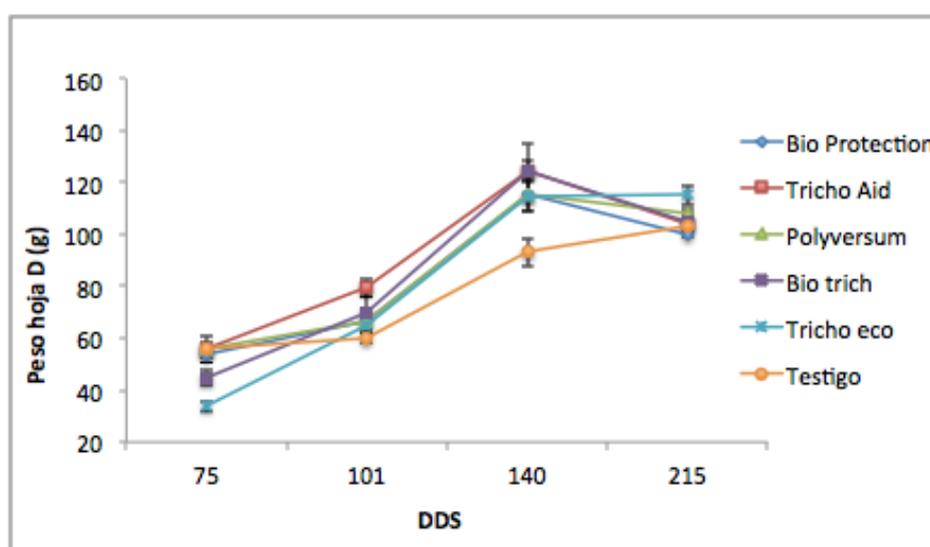


Figura 13. Peso de la hoja D de plantas de piña, obtenido durante los primeros siete meses de desarrollo del cultivo. DDS corresponde a días después de la siembra.

La Figura 14 muestra los valores del largo de la hoja obtenidos en los primeros meses del desarrollo del cultivo. Al igual que en la figura anterior, se presenta una tendencia ascendente de los tratamientos y el testigo a lo largo del tiempo, presentándose también el mismo fenómeno de disminución de los valores de la tercera a cuarta evaluación de todos los tratamientos a excepción de Tricho eco.

La tendencia general muestra también, como en las evaluaciones de 101, 140 y 215 DDS, todos los tratamientos tuvieron valores más altos que el testigo y únicamente en la evaluación a los 75 DDS, se observó como el testigo tuvo uno de los valores más altos de largo de hoja D (83 cm aproximadamente).

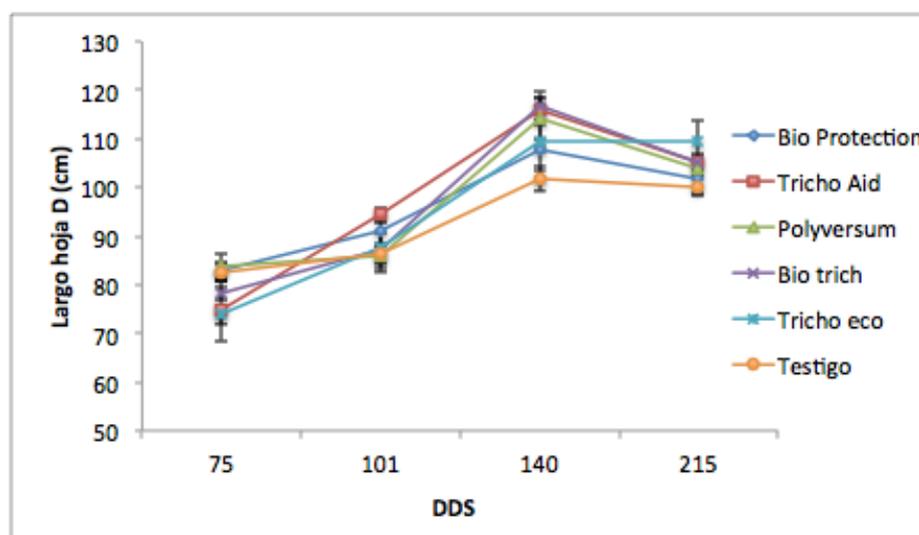


Figura 14. Largo de la hoja D de plantas de piña, obtenido durante los primeros siete meses de desarrollo del cultivo. DDS corresponde a días después de la siembra.

La Figura 15 representa las cuatro evaluaciones realizadas en la etapa de desarrollo del cultivo de la variable ancho de la hoja D. Nuevamente se observa una tendencia ascendente aún que un poco menos marcada de los tratamientos y el testigo. Los valores de esta variable se mantuvieron muy constantes a través del tiempo con

valores entre 4,5 y 6,5 de ancho, con excepción de la evaluación de Bio Protection a los 140 DDS, donde se observa un valor de aproximadamente 8 cm, el cual sobresale ante los otros tratamientos y el testigo. Además se observa como en este tratamiento a los 125 DDS se da una disminución considerable en el valor del ancho de hoja D, pasando de 8 cm a 6,7 cm aproximadamente.

Se observa también como la tendencia del testigo se mantiene muy similar a los valores de los demás tratamientos, en algunos casos por encima de algunos de los tratamientos y en otros casos por debajo.

Se observó una disminución del ancho de hoja D en el tratamiento Bioprotection de los 140 DDS a los 215 DDS, lo cual no concuerda con el crecimiento y desarrollo normal que una planta de piña debería de tener. Una reducción del ancho de hoja puede ser ocasionada por un error de muestreo, a la hora de medir la hoja o de anotar los datos en la libreta de registro.

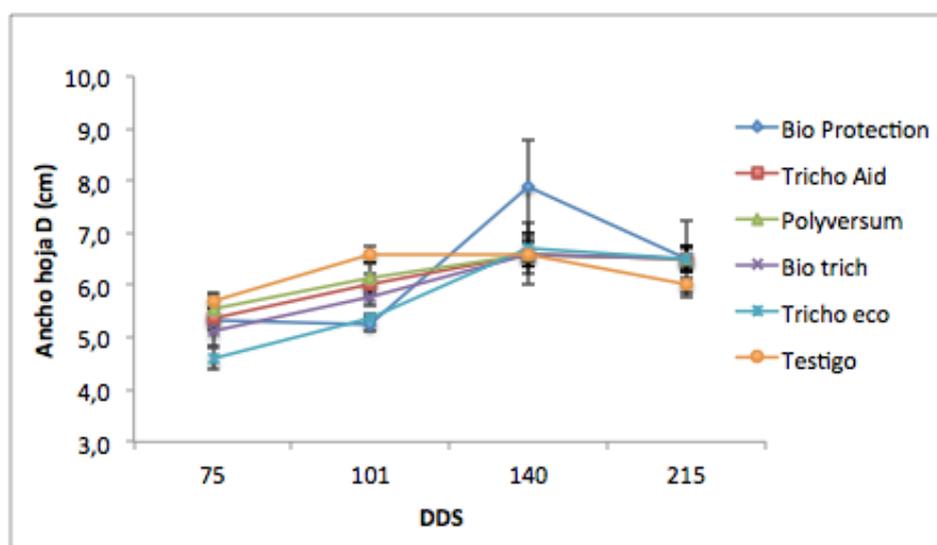


Figura 15. Ancho de la hoja D de plantas de piña, obtenido durante los primeros 7 meses de desarrollo del cultivo. DDS corresponde a días después de la siembra

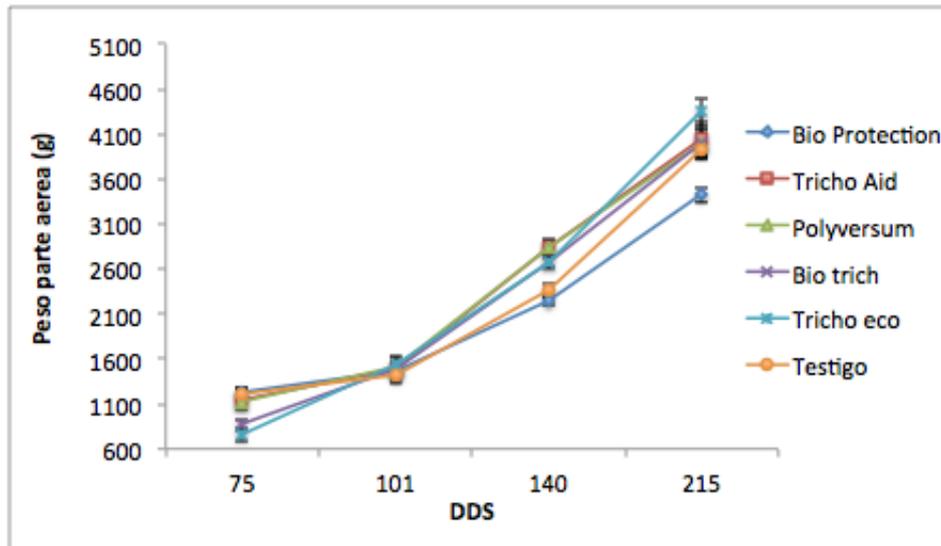


Figura 16. Peso de la parte aérea de plantas de piña, obtenido durante los primeros siete meses de desarrollo del cultivo. DDS corresponde a días después de la siembra.

La Figura 16 muestra las evaluaciones del peso de la parte aérea a lo largo del tiempo, donde se observa una tendencia de un aumento creciente muy lineal de todos los tratamientos y el testigo. El tratamiento Bio Protection, presenta valores mas bajos, inclusive que el testigo en las evaluaciones de los 140 y 215 DDS, mientras que los otros cuatro tratamientos tuvieron valores muy similares en todas las evaluaciones.

En esta Figura es importante considerar que de acuerdo a las estimaciones normales en una finca piñera en Costa Rica, una planta de piña debe pesar 5,5 libras (2400 g) en condiciones ideales para que pueda ser forzada y este peso se logra generalmente entre los siete y ocho meses de edad.

Observando los valores de peso de parte aérea en la Figura 16, se observa que en la evaluación a los 140 DDS, o a los cinco meses de edad aproximadamente, únicamente el testigo y el tratamiento de Bio Protection presentaron valores por debajo del peso de fuerza (2400 g), mientras que el resto de los tratamientos tuvieron valores superiores a 2600 g, lo que indica que perfectamente se pudo haber tomado la decisión de forzar estas áreas, con 2 meses de anticipación.

Se puede observar en la Figura 17 el peso de raíz durante la primera etapa del desarrollo del cultivo de piña. Existió una tendencia de aumento muy significativo de todos los tratamientos de los 75 DDS a los 101 DDS, mientras que el testigo se mantuvo más constante. A los 140 y 215 DDS la mayoría de los tratamientos se mantuvieron con valores constantes, algunos aumentaron y otros disminuyeron levemente; el tratamiento Tricho aid fue el único que mantuvo una curva de crecimiento ascendente más constante desde la primer evaluación. Por el contrario, el tratamiento Bio protection, sufrió una disminución del peso de raíz a los 140 y 215 DDS.

A los 75 DDS es evidente que el peso de raíz en todos los tratamientos y el testigo es muy similar, a pesar de que hay diferencias en el tiempo de siembra de aproximadamente un mes y medio entre el tratamiento uno y el testigo. A partir de los 101 DDS se observa una tendencia del testigo de un aumento en el peso de raíz menos marcado, estando siempre por debajo de la mayoría de los tratamientos, a excepción del tratamiento Bio protection a los 215 DDS, que presentó el valor más bajo.

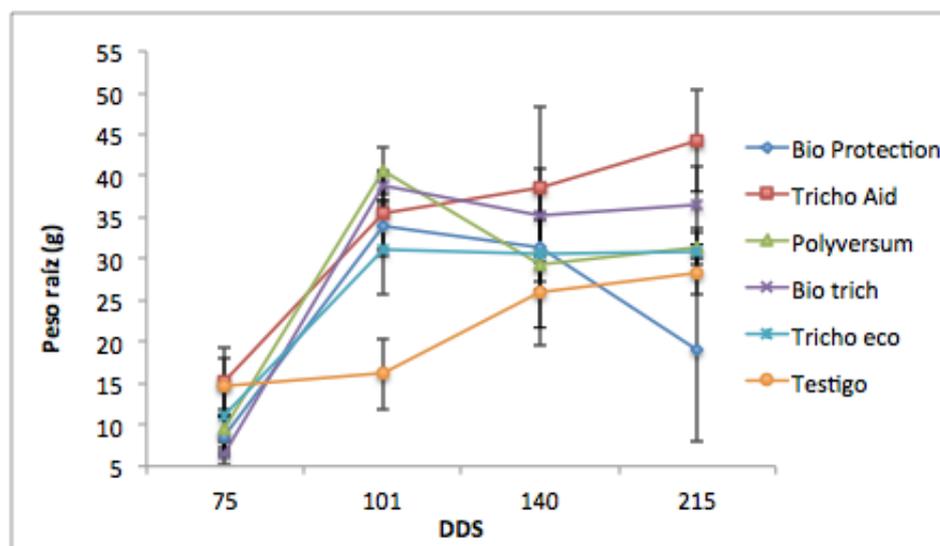


Figura 17. Peso de raíz de plantas de piña, obtenido durante los primeros siete meses de desarrollo del cultivo. DDS corresponde a días después de la siembra.

En la Figura 18 se presenta la longitud radical de plantas de piña en la primera etapa de desarrollo del cultivo. Se observa como de los 75 a los 101 DDS la tendencia de todos los tratamientos fue de un aumento importante, sin embargo de los 101 a los 140 algunos de ellos continuaron en aumento (Tricho aid y Tricho eco) mientras que otros se mantuvieron valores muy similares a la evaluación anterior o incluso se observó una disminución en el valor (Polyversun y Bio protection). El comportamiento del testigo en este caso fue muy constante con valores entre 25 y 30 cm las primeras tres evaluaciones y en la ultima evaluación sufrió una disminución considerable.

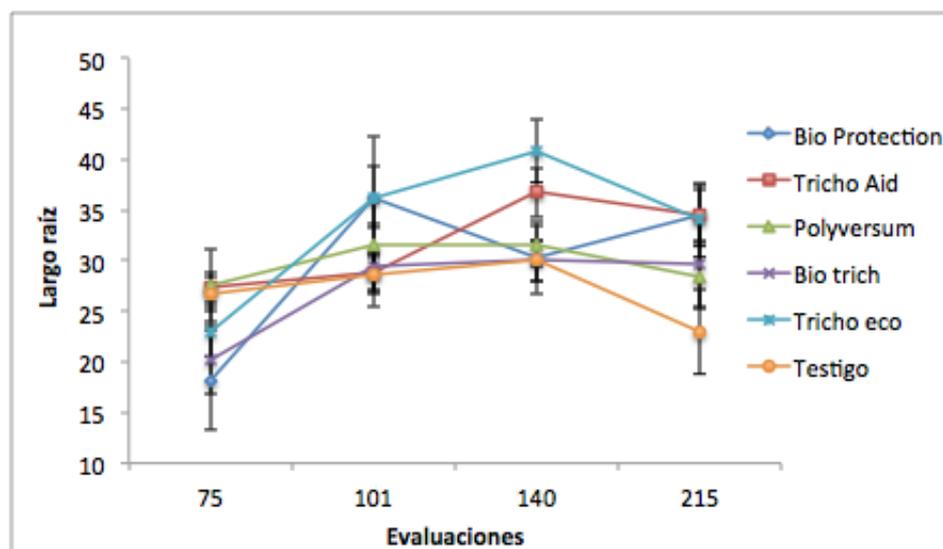


Figura 18. Longitud de raíz de plantas de piña, durante los primeros 7 meses de desarrollo del cultivo. DDS corresponde a días después de siembra.

Las Figuras de las variables fenológicas presentadas anteriormente, se incluyen para representar únicamente la tendencia a lo largo del tiempo, de las cinco variables evaluadas. Se presentan con sus respectivas barras de error estándar para poder identificar alguna diferencia que sobresalga en alguna de las cuatro fechas de evaluación, sin embargo fue necesario realizar un análisis estadístico de las cuatro evaluaciones por cada variable para determinar si existieron diferencias significativas entre los tratamientos y cuales de estos tratamientos tuvieron valores mas altos.

El análisis estadístico que se utilizó en este caso, fue un análisis de variancia, con el cual se encontró que efectivamente si existió una diferencia significativa entre tratamientos, por lo que se realizó una prueba de DMS-fisher.

En el Cuadro 4 se presenta un resumen del análisis estadístico con la prueba DMS-Fisher, y se observa mas claramente las diferencias significativas entre los tratamientos. Es evidente como la única variable que no presenta diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo es el Ancho de hoja D.

Cuadro 4. Diferencia mínima significativa (DMS) de las variables evaluadas en el ensayo de piña en campo.

Tratamiento	Variable					
	<i>Peso Hoja D</i>	<i>Largo Hoja D</i>	<i>Ancho Hoja D</i>	<i>Peso parte aérea</i>	<i>Peso raíz</i>	<i>Largo raíz</i>
Tricho Aid	a	a	a	a	a	a
Bio Trich	ab	a	a	a	ab	ab
Polyversum	ab	a	a	a	abc	abc
Tricho eco	abc	a	a	ab	bc	bc
Bio protection	bc	ab	a	c	bc	bc
Testigo	c	b	a	bc	c	c
<i>Valor-P</i>	<i>0,02</i>	<i>0,09</i>	<i>0,51</i>	<i>0,004</i>	<i>0,02</i>	<i>0,017</i>

En la variable del Peso de hoja D, se observa como se forman dos grupos principales que presentan diferencias significativas; Tricho aid es significativamente mayor que Bio protection y el testigo. Mientras que los tratamientos Bio trich, Polyversum y Tricho eco, no presenta diferencias significativas con ninguno de los dos grupos.

La variable de Largo de hoja D, presenta un comportamiento similar al anterior, donde se divide dos grupos por su diferencias significativas; el primer grupo son Tricho aid, Bio trich, Polyversum y Tricho eco, los cuales son significativamente mayores que el testigo, mientras que el tratamiento Bio protection no presenta diferencias significativas con el grupo o con el testigo.

El peso de la parte aérea presenta también diferencias significativas importantes. Tricho aid, Bio trich, Polyversum y Tricho eco muestran valores significativamente más altos que el Bio protection. Tricho eco no presenta diferencias significativas con el testigo y por último, entre el testigo y Bio-protection no se evidenció diferencias significativas entre ambos tratamientos

Las dos últimas variables de peso y largo de raíz presentaron el mismo comportamiento y presentan las mismas diferencias significativas entre algunos de los tratamientos. Se observa como el tratamiento Tricho aid tiene una diferencia significativa con el tratamiento Bio protection y el testigo El Bio trich es significativamente mayor que el testigo y por último, los tratamientos de Polyversum, Tricho eco, Bio protection y testigo no presentaron diferencias significativas entre ellos.

7.3 Ensayo en campo: Incidencia de enfermedades de suelo.

En el Cuadro 5 se presentan los resultados de incidencia de enfermedades de suelo, que los piñeros le llaman complejo fúngico de las raíces. Las plantas que se evaluaron para determinar la incidencia presentaban síntomas de alguno o de todos los patógenos de suelo que afectan directamente al cultivo en las primeras etapas de su resarrollo: *Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. y *Erwinia* spp.; en dicha evaluación se consideraron únicamente las plantas que no se iban a recuperar debido a una alta severidad.

Se observa en el cuadro 5 como existe una tendencia de los tratamientos a disminuir la incidencia de las enfermedades, sin embargo no se observa ninguna diferencia significativa entre ninguno de los tratamientos y el testigo. Debido a las condiciones de evaluación y al diseño experimental, la prueba estadística que mejor se ajustó al diseño y los datos obtenidos fue la de chi cuadrado. El valor de la probabilidad para esta prueba estadística fue de 12%, indicando que no existe diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo.

Cuadro 5. Incidencia enfermedades de suelo (*Phytophthora* spp., *Fusarium* spp. y *Erwinia* spp.) que atacan la planta de piña en las primeras etapas de su desarrollo.

Tratamiento	MUESTREO DE ENFERMEDADES	
	Muestra	% incidencia
Bioprotection	612	5,4
Tricho Aid	612	5,1
Poliversum	612	4,4
Bio Trich	612	3,6
Trico Eco	612	4,6
Testigo	612	7,0
chi cuadrado= 8,687		Valor P= 0,12

8. DISCUSIÓN

El ensayo de laboratorio sobre la evaluación del grado de calidad del producto biológico que la finca utilizaba, el cual fue comparado con otros productos que se encontraban en el mercado en el momento del estudio, evidenció como existen diferencias claras entre los parámetros de calidad de los distintos insumos y se considera como algo común a la hora de trabajar con organismos vivos en diferentes formulaciones, líquida, sólida, semi sólida, etc (Fernandez-Larrea 2002).

Al observar los valores de la concentración obtenidos en el laboratorio del cia, se evidencia como en todos los casos las concentraciones superan los 10^9 esporas/ml o g; estos valores de concentración de esporas para un producto biológico son considerados como valores altos, principalmente para productos a base de *Trichoderma* spp².

La concentración del producto Tricho aid (7×10^9 conidias/ml) no coincidió con lo que indicaba la etiqueta (1×10^{10} conidias/ml), por una diferencia muy pequeña si

² Acuña, 2015. Com. Pers.

consideramos las altas concentraciones de esporas que los microorganismos pueden producir. Esta diferencia pudo ser ocasionada por error en el conteo de las esporas, ya que este conteo se realiza de manera visual, directamente en un microscopio y muchas veces se pueden incurrir en errores de este tipo al contar más o menos esporas. A pesar de esto, el producto presenta una concentración de esporas que se considera alta para este tipo de microorganismo.

En cuanto al parámetro de viabilidad, el cual expresa el porcentaje de esporas germinadas en una solución al 5% de azúcar, se encontró que el producto Tricho aid, presentó la viabilidad más alta con un 94,3%, lo cual indica que este producto tendría un mayor porcentaje de esporulación y mejor oportunidad de desarrollarse en el suelo que el resto de los productos. Según los parámetros de calidad utilizados por Fernandez-Larrea, (2002), únicamente el Tricho aid y el Tricho eco, superaron el valor mínimo establecido de 80% como un porcentaje de viabilidad aceptable, el resto de los productos estuvo por debajo de este valor.

Al evaluar el parámetro de pureza, se encontraron valores del 100% de pureza para los productos Tricho eco, Tricho aid, Bio trich y Bio protection. Para el caso del producto Polyversum, que no se registró ningún crecimiento de colonias del microorganismo en ninguno de los platos Petri evaluados; este resultado pudo ser debido a que el microorganismo presenta selectividad hacia medios de cultivos semi específicos a base de harina de maíz (Le Floch et al. 2007) y el medio de cultivo que se utilizó en este estudio para todos los tratamientos por igual fue únicamente PDA, por su disponibilidad, facilidad de preparación y precio.

Debido a lo anterior, no se observó ningún tipo de crecimiento de colonias del producto Polyversum en el ensayo de eficacia biológica sobre el patógeno *Fusarium* spp. y en todos los casos los valores del porcentaje de control fueron de un 0%, sin embargo, esto no indica que el producto no funciona, sino que se debería de tener el medio específico para su crecimiento adecuado.

Los resultados del ensayo de eficacia biológica que se llevó a cabo en el laboratorio del Cia demostraron que el producto Tricho aid, presentó el porcentaje de control mas

alto (80%) sobre la colonia del patógeno *Fusarium* spp., seguido por el Bio trich (37%) y Tricho eco (1%), mientras que el Polyversum, Bio protection y el testigo, no presentaron ningún crecimiento de colonias del antagonista que afectara al patógeno (Figura 12).

Estos resultados se respaldan con las evaluaciones de los parámetros de calidad de este mismo estudio, donde el Tricho aid fue el producto que presentó el porcentaje de viabilidad mas alto de todos los productos, además una pureza del 100% y una concentración alta, demostrando su eficacia en el control de *Fusarium* spp. a nivel de laboratorio. Estos resultados obtenidos son respaldados además por Hernández et al. (2006) donde en su estudio con tres especies de *Trichoderma* spp. encontró una mejor respuesta de la especie *T. hazardium* sobre colonias de *F. subglutians*.

Para caso específico del producto Bio protection, el cual no presentó crecimiento de ninguna colonia antagonista que afectara a la colonia de *Fusarium* spp. se podría concluir que a pesar de que contaba con una concentración de conidias/ml media-alta ($2,0 \times 10^8$) su viabilidad fue baja (77%) pudiendo deberse a su formulación en base líquida, ya que como lo indica Agamez et al. (2008) el microorganismo *Trichoderma* spp., requiere una relación carbono/nitrógeno muy alta, debido a que este hongo necesita degradar sustratos complejos como almidón, pectina, celulosa, entre otros, para un buen desarrollo y producción de conidios. Además este mismo autor, indica que los productos en bases sólidas, presentan mayor concentración que las bases líquidas ya que el desarrollo del antagonista es mas eficientemente en base sólida al requerir fuentes de carbono no estructurales y algunos micronutrientes, lo cual se evidenció con los productos en base solida Bio trich, Tricho eco y Tricho aid de este estudio (Cuadro 3).

Los primeros meses de desarrollo del cultivo son claves para obtener una buena calidad de fruta (BANACOL, 2005). Al observar las Figuras 13 a 18 se evidenció una tendencia en el desarrollo fenológico creciente en todos los tratamientos incluyendo al testigo. En los primeros meses de establecimiento del cultivo en el campo, la producción radical se desarrolla con mucha mas fuerza a partir del mes y medio y es en este momento donde se requiere mayor atención al sistema radical, el cual

reflejará su buen desarrollo en la parte aérea y en el llenado del fruto (Py et al. 1987). La tendencia general en todas las variables evaluadas fue positiva, la cual retrató un mejor y mas rápido desarrollo de plantas en los tratamientos que en el testigo, evidenciando como existió un estímulo en la parte radical, lo cual es respaldado por Pérez et al. (2012) el cual menciona en su estudio como el *Trichoderma* spp. y otros microorganismos estimulantes del desarrollo, liberan enzimas que favorecen y aceleran el crecimiento de los meristemas radicales.

La variable de peso radical, fue la que presentó una tendencia positiva más marcada entre los tratamientos y el testigo causado por la aplicación de productos biológicos sobre las plantas de piña, principalmente de los 75 a los 101 DDS, donde se da un aumento significativo en todos los tratamientos mientras que el testigo se mantiene muy por debajo de ellos. De los 101 a los 140 DDS, se observó una disminución en el peso de raíz, esto se pudo deber a que en esos días, hubo un temporal de aproximadamente 15 días de mucha lluvia, lo que pudo ocasionar que la producción de raíces estimulado en gran medida por los microorganismos, se viera disminuida por el estrés de las condiciones climáticas (Py et al., 1987). A pesar de ello la tendencia positiva causada por la aplicación de los insumos biológicos se mantuvo en las siguientes evaluaciones.

Para complementar los datos de campo se realizaron pruebas estadísticas de acuerdo al tipo de datos y se encontró que sí existieron diferencias significativas en casi todas las variables evaluadas menos en la variable de ancho de hoja D ($P < 0,51$); esto indica que los productos si tienen efecto en producción de biomasa con incrementos propios de acuerdo a los tratamientos. En este caso, el tratamiento Tricho aid, fue el que presentó una mejor tendencia en general, en cuanto al desarrollo de las variables que se evaluaron, posiblemente a causa de su buen grado de calidad, evidenciado en los ensayos de laboratorio de este mismo estudio y que además la especie *T. hazardium* cuenta con grandes condiciones estimulantes según Kacuk, (2014) el cual encontró en su estudio un aumento significativo del peso fresco y el largo de raíces y tallos de plántulas de trigo inoculadas con el microorganismo.

Estos resultados demuestran que para la estimulación y desarrollo vegetativo y radical del cultivo de piña en la finca LyL, el producto Tricho aid, es significativamente más eficaz, que el producto Bio protection que se estaba utilizando en la finca, pero que no hubo diferencias significativas entre el Tricho aid y el Polyversum, Bio trich y bio eco en todas las variables evaluadas, por lo tanto su aplicación sería más eficiente con el de menos costo. Nuevamente la eficacia del Tricho aid, es probable que se debió a sus buenas características de concentración y viabilidad las cuales quedaron demostradas en las pruebas de calidad de este mismo estudio.

Para el caso del ensayo en campo donde se evaluó la incidencia de enfermedades de suelo en las plantas de piña, no se encontró diferencia significativa entre los tratamientos y el testigo en cuanto a plantas enfermas, por lo que no se pudo evidenciar un efecto positivo de los productos sobre los patógenos que causan las enfermedades de suelo en el cultivo.

La utilización de un microorganismo a manera de fungicida debe de llevarse a cabo de la menor manera y con los conocimientos adecuados del tipo de microorganismo y su adaptabilidad al cultivo y suelo donde se va a aplicar, más si se va a utilizar en monocultivos de altas densidades como el cultivo de piña. Se debe considerar todos estos factores que pueden afectarlo tanto positiva como negativamente, ya que de ellos depende mucho la adaptación y la eficacia que va a tener el microorganismo contra el patógeno que se quiera atacar (Agrios, 2005). El efecto fungicida que se esperaba para el caso de este estudio no presentó valores positivos estadísticamente significativos, ya que las condiciones de pH bajo, acidez del suelo alta (Anexo 2) poca presencia de bases, condiciones malas de drenaje, eventos climáticos extremos, rotación nula de cultivos, entre otras cosas, aumentaron la presencia de microorganismos patógenos, lo cual provocó una mayor presión de estos sobre los microorganismos benéficos, evitando que se diera una adaptación adecuada y un efecto significativo de los benéficos sobre los patógenos.

A pesar de que estadísticamente no existieron diferencias significativas sobre el porcentaje de incidencia de enfermedades del suelo sobre las plantas de piña, si se observó una tendencia en la disminución de esta incidencia para todos los

tratamientos. Al observar el Cuadro 6 es posible notar, como los valores del porcentaje de incidencia de todos los tratamientos son menores que el testigo. Con esta información sería importante darle seguimiento a esta parte del ensayo y ampliar su estudio, más aún tomando en cuenta el porcentaje de pérdidas que la finca productora debería manejar para no incurrir en pérdidas, según indicaron los encargados de producción de la finca (5% como máximo en campo y 5% como máximo en empaque).

9. CONCLUSIONES

- La utilización de insumos biológicos en los programas de aplicación en fincas de piña es una herramienta valiosa para mejorar las condiciones del desarrollo en las primeras etapas del cultivo, esto quedó demostrado en este estudio ya que todos los tratamientos tuvieron una tendencia positiva en el aumento del crecimiento de las plantas de piña.
- Los productos Tricho eco y Tricho aid, presentaron el grado de calidad mas alto con valores de concentración y viabilidad y pureza mas altos. Bio trich y Bio protection tuvieron concentraciones de esporas altas ($>1 \times 10^8$ esporas/ml o g) pureza del 100%, pero su porcentaje de viabilidad fue menor al 80% que se necesita para catalogar un producto biológico de buena calidad. Para el caso de Polyversum, no se tuvo los resultados deseados ya que nunca se obtuvo crecimiento de colonias, ya que este microorganismo requería un medio semi-selectivo.
- No existieron diferencias significativas en ninguna de las variables entre los tratamientos Tricho aid, Tricho eco y Polyversum sin embargo, si existieron diferencias significativas en casi todas las variables, a excepción de ancho de la hoja D, entre el Tricho aid y el Bioprotection (producto de la finca) y testigo, lo que significa que hubo un producto que eficazmente fue superior al que la finca utilizaba, en todas las variables evaluadas del desarrollo fenológico de las plantas de piña.

- También el tratamiento con Tricho aid fue el que presentó el porcentaje de colonización mas alto con un 80%, sobre la colonia de *Fusarium* spp. en el ensayo de laboratorio, seguido por el Bio trich con un 37%, tricho eco 1% y Polyversum, Bio protection y testigo tuvieron un 0% de colonización. Estos resultados demostraron nuevamente que el Tricho aid fue el producto mas eficaz, pero en este caso en el control del patógeno *Fusarium* spp.
- No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos, en cuanto al porcentaje de incidencia de enfermedades de suelo en las plantas de piña sin embargo, se evidenció una tendencia a la disminución de la incidencia donde se aplicaron los tratamientos que seria muy valioso darle seguimiento en posteriores estudios.

10. RECOMENDACIONES

- Para este tipo de estudios es importante contar con una estación meteorológica o datos de alguna estación cercana del lugar donde se llevará a cabo el ensayo, que complementen los resultados de la dinámica microbiana en el suelo de las colonias de los microorganismos evaluados, de esta manera los resultados del ensayo serán respaldados por los datos de clima en caso de que haya existido una influencia directa de este factor.
- Es importante que para cada evaluación, se tome una muestra de suelo y de raíz por cada tratamiento (de manera previa, durante el ensayo y posterior al mismo), que verifique la presencia o no del microorganismo que se está aplicando y de esta manera asegurar que el efecto que se está observando es gracias a la presencia del microorganismo.
- Cuando se inicia un estudio de este tipo, se debe de asegurar que el área donde se llevará a cabo, no tenga ninguna aplicacion previa de algún producto biológico que pueda llegar a influir en los resultados finales.

- Se debe considerar que el cultivo presente la misma edad fenológica cuando se va a iniciar el estudio, para evitar diferencias entre las fechas de siembra que puedan llegar a perjudicar los resultados.
- La evaluación de las variables en cuestión es tan importante como la misma aplicación de los tratamientos, por ello es necesario que sea realizada siempre por las mismas personas, evitando variaciones en la metodología y dándole un seguimiento cercano al desarrollo en general de las plantas, de esta manera sí existieran datos extremos se pueda explicar a qué se debió esta situación y si fuera el caso de que se incurrió en algún error de muestreo, se debe realizar nuevamente la evaluación.
- Es importante mencionar que el producto Polyversum fue evaluado por sugerencia de la empresa productora LyL, este producto requería medios selectivos para su crecimiento y posterior evaluación in vitro, sin embargo por asuntos económicos no se pudo desarrollar en el medio que necesitaba, por esta razón no se observó crecimiento de ninguna colonia de este producto en la prueba de laboratorio. Para estudios posteriores se debe de tomar en cuenta este detalle y contar con el recurso económico necesario para obtener el medio de cultivo y darle las condiciones adecuadas al microorganismo para su crecimiento.

10. LITERATURA CITADA

ACUÑA, O. 2014. Protocolo y normas para la evaluación de la calidad y eficacia de los insumos biológicos por parte del servicio fitosanitario del estado (entrevista). San Pedro, SJ, CR. Centro de Investigaciones Agronómicas.

ACUÑA, O. 2015. Concentraciones adecuadas de insumos biológicos. (Entrevista). San Pedro, CR. Universidad de Costa Rica. (O.ACUNA@ucr.ac.cr)

AGAMEZ, E; ZAPATA, R; OVIEDO, L; BARRERA, J. 2008. Evaluación de sustratos y procesos de fermentación para la producción de esporas de *Trichoderma* sp. spores. Revista Colombiana Biotecnológica. 10(2):23-34

AGRIOS, G. 2005. Plant Pathology. 5 ed. Nueva York, US. Academic Press. 803 p.

AKRAMI, M; KARBALAEI, H; SHIKHLINSKI, H; KHOSHVAGHTEI, H. 2013. Bio controlling two pathogens of chickpea *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* by different combinations of *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma asperellum* and *Trichoderma virens* under field condition. International Journal of Microbiology Research. 1(2): 52-55

ARAYA, R; FIGUEROA, M; PINO, S; GADEA, A; RAMIREZ, C; GONZÁLEZ, H. 2003. Efectividad de varios biocontroladores en el control de plagas en la Zona Norte de Costa Rica. Tecnología en Marcha. 16(1): 92-100

BANACOL. 2005. Guía de identificación y manejo integrado de plagas y enfermedades en piña. Ed. M Rodriguez. Santa Ana, SJ, CR. 57 p.

BARNETT, H; HUNTER, B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. 4 ed. Minnesota, US. APS Press. 218 p.

BELL, DK; WELL, HD; MARKHAM, CR. 1982. "In vitro" antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72:379–382.

BETTIOL, W. 2006. Productos alternativos para el manejo de enfermedades de cultivos comerciales. *Fitosanidad*. 10(2): 85-98

BERG, G; SMALLA, K. Plant species and soil type cooperatively shape the structure and function of microbial communities in the rhizosphere. *FEMS Microbiol Ecol*. 68: 1-13

CABALLERO, A. 2011. Uso de hongos endofíticos de *Trichoderma* spp., para el biocontrol del mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense) raza tropical 1 en vitroplantas del cultivar Gros Michel (AAA). Tesis M. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 80 p.

CASTRO, Z. 1994. Cultivo de la piña. In Gonzalo C., E. Atlas Agropecuario de Costa Rica. San José, CR, Editorial Costa Rica. p. 193–04

CALDERÓN, JC; CHACÓN, M; LÓPEZ, K; MEDAGLIA, C; VARGAS, F; VARGAS, JM; VARGAS, L. 2012. Estadísticas de comercio exterior de Costa Rica 2011. Procomer (Promotora del comercio exterior de Costa Rica). mayo: 15-16.

CAMPOS, M. 2009. Efecto de la inoculación de sustratos con *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento y producción de plantas de chile dulce (*Capsicum annuum*) Linn, bajo ambiente protegido. Tesis Lic. San Carlos, CR, ITCR. 64 p.

CANAPEP (Cámara Nacional de Productores y Exportadores de Piña). 2011. Area sembrada de piña se duplico en últimos cuatro años. (en línea). San José, CR. Consultado 16 ene. 2014. Disponible en <http://www.canapep.com/area-sembrada-de-pina-se-duplico-en-ultimos-cuatro-anos>

CANO, M. 2011. Interacción de microorganismos benéficos en plantas: micorrizas, *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp. una revisión. U.D.C.A Actualidad y divulgación científica. 14(2): 15-31

CHAVERRI, JF. 2002. Agricultura orgánica y su promoción como alternativa al uso unilateral de plaguicidas en Costa Rica. Materia Orgánica Materia Orgánica: Características y uso de los insumos en suelos de Costa Rica. Heredia, CR, euna. 107p

CHERIF, SS; BENHAMOU, CS. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* spp., on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Phytopathology 80:1406–1414.

DECRETO EJECUTIVO: 31961-0. 2004. Resolución N: 118-2004 (COMIECO): Protocolo patrón para ensayos de eficacia biológica de plaguicidas de uso agrícola. Poder Ejecutivo. San José; CR. 47 p.

DE SILVA; A. PATTERSON, K; ROTHROCK, C; MOORE, J. 2000. Growth Promotion of Highbush Blueberry by Fungal and Bacterial Inoculants. HortScience. 35(7): 1228-1230

ELAD, Y; CHET, I; KATAN, J. 1980. *Trichoderma harzianum*: Agent effective against *Sclerotium rolfsii* and *Rhizoctonia solani*. Disease control and pest management. 70(2): 119-121

EZZIYYANI, M; PÉREZ, C; SID AHMED, A; REQUENA, E; CANDELA, E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). Anales de biología. no. 26: 35-45

FERNÁNDEZ-LARREA, O. 2002. Control de Calidad de los Insecticidas Microbianos. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología (Costa Rica). 65(2002): 120-122

FERNÁNDEZ-LARREA, O; ELÓSEGUI, O. 2006. Alternativas de producción de *Trichoderma* en Cuba, *Fitosanidad* 10 (2):147

GATO, Y. 2010. Metodos de conservación y formulación de *Trichoderma harzianum rifai*. *Fitosanidad*. 14(3): 189-195

HARMAN, G. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology*. 96(2): 190-194

HERNÁNDEZ, A; SIERRA, A; CARR, A. 2006. Evaluación *in vitro* del antagonismo de especies de *trichoderma* sobre hongos fitopatógenos que afectan las vitroplantas de piña (*ananas comosus* (l.) merr.). *Fitosanidad*. 10(2): 105-108

HOWELL, C. 2003. Mechanism employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The story and evolution of current concepts. *Plant disease*. 87(1): 4-10

INSAM, H. 2001. Developments in soil microbiology since the mid 1960s. *Geoderma*. 100(2001): 389-402

INTITUTO DEL CAFÉ DE COSTA RICA (ICAFFE). 2009. Efecto de diferentes cepas comerciales de *Trichoderma* sobre *C. fimbriata*. Informe anual de investigación, Centro de Investigaciones en Café. Heredia, CR. 134-136

JIMÉNEZ D. 1999. Manual práctico para el cultivo de la piña de exportación. Cartago, Editorial Tecnológica de Costa Rica. 224 p.

KACUK, C. 2014. Enhanced root and shoot growth of wheat (*Triticum aestivum* L.) by *Trichoderma harzianum* from Turkey. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 17(1): 122-125

KRISHNA, K; MCSPADDEN, B. 2006. Biological control of plant pathogens. *The Plant Health Instructor*: 1-25 p.

- LE FLOCH, G; TAMBONG, J; VALLANCE, J; TIRILLY, Y; LEVESQUE, A; RAY, P. 2007. Rhizosphere persistence of three *Pythium oligandrum* strains in tomato soilless culture assessed by DNA macroarray and real-time PCR. *FEMS Microbiol Ecol.* 61: 317-326
- LEÓN, D. 2007. Diagnóstico y dinámica poblacional de nematodos en el cultivo de piña (*Ananas comosus*) (L.) Merr., finca el Tremedal S.A San Carlos. Tesis Bach. San Carlos, CR, ITCR. 48 p.
- LORITO, M. 2006. The Molecular Biology of the Interactions Between *Trichoderma*, phytopathogenic Fungi and Plants: Opportunities for Developing Novel Disease Control Methods. Memorias del Taller Latinoamericano Biocontrol de Fitopatógenos con *Trichoderma* y Otros Antagonistas, marzo 28-31, La Habana.
- MAYMON, M; MINZ, D; BARBUL, O; ZVEIBIL, A; ELAD, Y; FREEMAN, S. 2004. Identification of *Trichoderma* biocontrol isolates to clades according to ap-PCR and ITS sequence analyses. *Phytoparasitica.* 32(4): 370-375
- MUBEEN, A; SHAHZAD, S; GHAFAR, A. 2005. A new report of *Pythium oligandrum* from Pakistan.. 37(2): 487-491
- OZBY, N; NEWMAN, S. 2004. Effect of *Trichoderma harzianum* strains to colonize tomato roots and improve transplant growth. *Pakistan journal of biological sciences.* 7(2): 253-257
- OIRSA (Organismo Internacional Regional de Salud Agropecuaria). 2011. Fusariosis en piña: *Fusarium guttiforme*, una grave amenaza para la producción de piña en los países de la región del OIRSA. (En Línea). D.F, México. Consultado 16 ene. 2014. Disponible en: <http://www.oirsa.org/portal/documents/fusariosis/sobre-la-fusariosis-pina.pdf>

PÉREZ, Y; AYALA, JL; CALERO, A. 2012. Efecto bioestimulante de dos formulados líquidos de *Trichoderma harzianum* Rifai A-34 en el cultivo de tomate protegido. 2012. Revista infociencia. 16(3): 1-10.

Picard, K; Tirilly, Y; Benhamou, N. 2000. Cytological effects of cellulases in the parasitism of *Phytophthora parasitica* by *Phytium oligandrum*. Applied and Environmental Microbiology. 66(10): 4305-4314

PY, C. 1968. La piña tropical. Colección agricultura tropical. BLUME. Barcelona, ES. p 269.

PY, C; LACOEUILHE, J; TEISSON, C. 1987. The Pineapple Cultivation and Uses. Trad. D Goodfellow. París, FR. Maisonneuve y Larose. 551 p.

SANDOVAL, I; M, LÓPEZ. 1995. *Trichoderma harzianum* (cepa A-34): biopreparado de amplio espectro para micopatologías del tomate y del pimiento. Boletín Técnico 4, CID-INISAV, La Habana.

SANDOVAL, M; NOELTING, M. 2011. Producción de conidios de *Trichoderma harzianum* rifai en dos medios de multiplicación. Control biológico. (2011): 215-221

TERUO, H; PARR, J. 1994. Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment. International Nature Farming Research center. Atami. 1-16

TOMME, P; VAN TILBEURGH, H; PETTERSSON, G; VAN DAMME, J; VANDEKERCKHOVE, J; KNOWLES, J; TEERI, T; CLAEYSSSENS. 1988. Studies to the Cellulolytic system of *Trichoderma reesei* QM 9414, Analysis of domain function in two cellobiohydrolases by limited proteolysis. Eur. J. Biochem 581(1988): 170-575

VARGAS, C. 2013. Control de calidad de productos bioinsumos a base de microorganismos. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria (INTA). San José, CR, Abr. 1-3.

VITERBO, A; HARAN, S; FRIESEM, D; RAMOT, O; CHET, I. 2001. Antifungal activity of a novel endochitinase gene (chit36) from *Trichoderma harzianum rifai* TM. FEMS Microbiology Letters. 200(2001): 169-174

WIJESINGHE, C; WILSON, R; SAMARASEKARA, J; WIJESUNDERA, R. 2010. Identification of *Trichoderma asperellum* from selected fruit plantation of Sri Lanka. Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka. 38(2): 125-129

11. ANEXOS

Anexo 1.

Hoja control de las aplicaciones, dosis y costo de los productos del ensayo en campo de insumos biológicos, donde se incluye fecha y hora de aplicación y el estado del tiempo en el momento de la aplicación.

DOSIS
POLIVERSUM: 100 grs. / Ha. (\$60/Ha)
BIOPROTECTION: 15 lt / Ha \$2.66 / lt (\$26,6 / Ha)
TRICHO-AID WP: 300 gr / Ha \$109 / kg (\$32,7 / Ha)
TRICHO-ECO: 5 kg /Ha \$8.91 / kg (\$44,55 / Ha)
BIO-TRI: 1 kg / Ha \$40 / Kg (\$40 / Ha)
PRIMERA APLICACION:
FECHA 23-05-2014
HORA 6 am
OBSERVACIONES: Clima soleado. Lluvia leve en la última
SEGUNDA APLICACION
FECHA: 18-06-2014
HORA: 6:15 am
OBSERVACIONES:
NORMAL
TERCERA APLICACION
FECHA 09-08-2014
HORA 7:00 am
OBSERVACIONES:
CUARTA APLICACION
FECHA 14-11-2014
HORA 6:00 am
OBSERVACIONES:

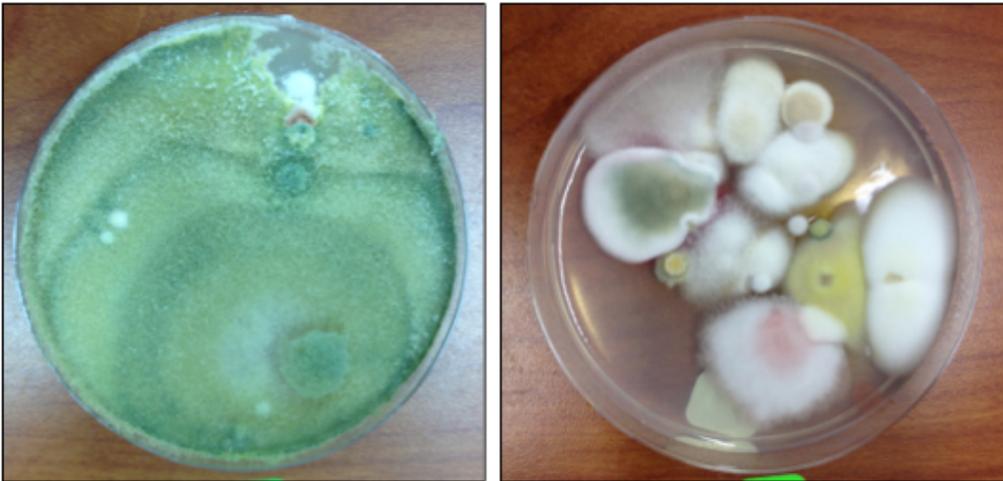
Anexo 2.

Análisis químico del lote 6 (área del ensayo) previo al inicio de las aplicaciones de los tratamientos.

	RESULTADO DE ANÁLISIS QUÍMICO INFORME DE ANÁLISIS DE SUELOS: S-5049-01		AGROANÁLISIS DE COSTA RICA - LABORATORIO QUÍMICO Grecia, Alajuela, C.R. Cédula Jurídica 3-101-248437 Teléfonos: Lab: 2494-0592/ Fax: 2 Correo Electrónico: eduqonz@ice.co.cr									
											CÓDIGO AG-R03 Versión 01 Pág. 1 de 1	
Fecha: 19 de mayo del 2014			Cliente: L y L Proyectos									
Finca: Cultivo:			Provincia: Cantón: Distrito:			Fecha de ingreso: 08/05/2014 Fecha de muestreo:						
				cmol(+)/L				mg/L				
Nº Lab.	Identificación de campo	pH	K	Ca	Mg	Acidez	P	Fe	Cu	Zn	Mn	
38158	F5 / L01	4,29	0,19	1,58	0,71	1,20	2,6	112	7,1	1,4	111	
38159	F6 / L06	4,64	0,26	4,76	1,38	0,80	2,6	134	6,6	1,6	120	
Metodología: Olsen Modificado: K, P, Fe, Zn, Cu, Mn – KCl 1N: Ca, Mg, Acidez – pH en H ₂ O												
Este informe no podrá ser reproducido en forma parcial o total sin la aprobación de Agroanálisis de Costa Rica S.A.												
Los resultados de los análisis de este informe se refieren únicamente a la muestras aquí descritas.												

Anexo 3.

Placas Petri PDA de dos muestras de suelo del área de estudio (lote 6), tomadas en dos puntos distintos previo al inicio de las aplicaciones de los tratamientos, donde se evidencia la presencia de colonias de *Trichoderma* spp. (izquierda) y de *Fusarium* spp. (derecha).

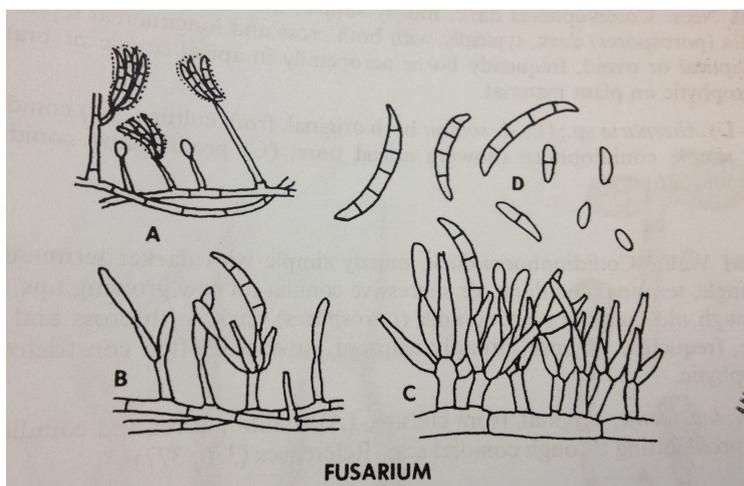


Resultado: Plato 1: hongos (*Trichoderma* spp. $> 10^4$ conidias/ml)

Plato 2: $1,4 \times 10^4$ conidias/ml, con presencia de una colonia de *Fusarium* spp. (micelio blanco, coloración rosa).

Anexo 4.

Estructuras de reproducción (conidios) y micelio del hongo del género *Fusarium* spp. para facilitar su identificación en el microscopio (Barnnet y Hunter, 1998)



Anexo 5

Ejemplo de una hoja de campo de evaluación del desarrollo fenológico del ensayo en campo.

ENSAYO DE BIOCONTROLADORES					
EVOLUCIÓN DE LA PLANTACIÓN					
Fecha del Muestreo		Encargado Wilber Chinchilla			
Producto	Características a Evaluar	Número de Parcela			
		1	2	3	4
1 Bioprotection	Peso Hoja D	99	102	100	98
	Largo Hoja D	101	1100	95	101
	Ancho Hoja D	6	6.5	6	5.5
	Peso Parte Aérea	41200	4000	3400	3100
	Peso Raíz	18	22	15	21
	Largo Raíz	35	41	29	33
	2 Tricho Aid	Peso Hoja D	104	95	97
Largo Hoja D		100	97	98	105
Ancho Hoja D		6	5.5	5.5	6.5
Peso Parte Aérea		3950	4050	3850	4300
Peso Raíz		55	43	39	40
Largo Raíz		45	33	31	29
3 Poliversum	Peso Hoja D	108	102	109	100
	Largo Hoja D	104	99	99	98
	Ancho Hoja D	6	5.5	6.5	5.5
	Peso Parte Aérea	4000	3975	4100	3950
	Peso Raíz	31	28	38	29
	Largo Raíz	20	33	33	28
4 Bio Tri	Peso Hoja D	105	109	99	105
	Largo Hoja D	100	99	105	104
	Ancho Hoja D	6.5	6	5.5	6.5
	Peso Parte Aérea	3900	4100	3850	4100
	Peso Raíz	30	35	29	49
	Largo Raíz	25	30	24	20
5 Tricho Eco	Peso Hoja D	115	105	115	99
	Largo Hoja D	110	102	111	101
	Ancho Hoja D	4	6.5	7.5	6
	Peso Parte Aérea	4300	4000	4600	405
	Peso Raíz	38	30	21	31
	Largo Raíz	39	31	25	41
Testigo	Peso Hoja D	99	105	110	97
	Largo Hoja D	104	100	102	95
	Ancho Hoja D	6.5	6	6.5	5
	Peso Parte Aérea	4000	3950	4200	3550
	Peso Raíz	26	34	31	19
	Largo Raíz	21	25	28	15