

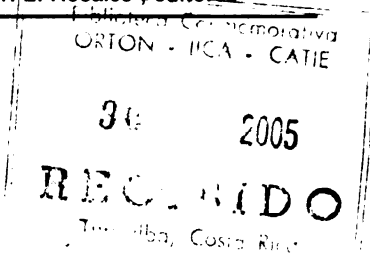
**CATIE**

# Inducción de resistencia y uso de tecnologías limpias para el manejo de plagas en plantas



*Memorias del taller internacional realizado en el CATIE,  
Turrialba, Costa Rica-27-30 de Agosto de 2002*

A.S. Riveros, L. E. Pocasangre y F. E. Rosales, editores



# Contenido

<b>Presentación</b>	5
<b>Desarrollo histórico de la Inducción de Resistencia</b> Dr. Joseph Kuc, Universidad de Kentucky, EEUU	7
<b>Caracterización e importancia de la biodiversidad microbial en ecosistemas agrícolas, para la salud del sistema radical de las plantas</b> Dr. Richard Sikora, Universidad de Bonn, Alemania	11
<b>Bases bioquímicas de la resistencia en plantas</b> Dr. Alba Stella Riveros, Universidad del Tolima-CATIE	13
<b>Manejo del estrés de cultivos utilizando bioestimulantes de suelo y plantas</b> Dr. Ruben Ortiz, Universidad de Florida, EEUU	24
<b>Mejoramiento biológico de vitroplantas de banano mediante hongos endofíticos para el control del nematodo barrenador <i>Radopholus similis</i></b> Dr. Luis E. Pocasangre, INIBAP-CATIE	33
<b>Uso potencial de hongos micorrízicos para el control de patógenos de raíz</b> Dr. <u>María del Carmen Jaizme-Vega</u> y A. S. Rodríguez-Romero, ICIA Islas Canarias, España	40
<b>Estrategias para el manejo de sistemas biológicos para el control de fitonematodos en la producción de cultivos tropicales</b> Dr. Richard Sikora, Universidad de Bonn, Alemania	47
<b>Presente y futuro de las aplicaciones prácticas de la inducción de resistencia para el control de enfermedades</b> Dr. Joseph Kuc, Universidad de Kentucky, EEUU	54
<b>La microscopía electrónica como herramienta en la investigación fitopatológica: efectos inducidos por activadores de resistencia</b> M.Sc. <u>Ethel Sánchez</u> , Omar Corrales y Mayra Montiel. Universidad de Costa Rica, Costa Rica	61
<b>Papel de los metabolitos secundarios en la inducción de resistencia y tecnologías limpias en plantas</b> M.Sc. Jorge Eduardo Loaiza, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica	65
<b>Potencial insecticida de la albahaca (<i>Ocimum</i> sp.) y alelopático del algodón lechero (<i>Colotropls procera</i>)</b> MSc. <u>E. Murillo</u> , M. Montealegre., D. Villanueva., M. Alcocer y M.Cardona, Universidad del Tolima, Ibagué (Tolima), Colombia	68

<b>Extractos vegetales como repelentes, para el manejo de plagas: estudios de caso con <i>Bemisia tabaci</i> e <i>Hypsipyla grandella</i></b>	77
Dr. Luko Hilje, Unidad de Fitoprotección CATIE, Turrialba, Costa Rica	
<b>Banano orgánico y en transición: experiencias con microorganismos eficientes (EM)</b>	87
Dr. P. Tabora, <u>S. Okumoto</u> y F. Elango	
<b>Anexos</b>	94
<b>1. Características del taller</b>	96
<b>2. Programa</b>	97
<b>3. Acrónimos y abreviaturas</b>	100
<b>4. Listado de conferencistas</b>	101

## **Presentación**

Este taller internacional, que reunió a científicos y técnicos de varios países de América Latina y el Caribe (ALC) involucrados en la investigación de resistencia en plantas y manejo integrado de plagas y enfermedades, es como una punta de lanza en el novel esfuerzo del CATIE (Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza) por aumentar y fortalecer esta línea de investigación en beneficio de sus países miembros y de la región tropical de las Américas.

La inducción de resistencia sistémica (IRS), también conocida como SAR, es un fenómeno ampliamente reportado y que ofrece muy buenas oportunidades para el manejo de plagas y enfermedades. La SAR ocurre cuando a través de inoculaciones en las hojas y raíces de la misma planta, con diferentes productos del patógeno, el patógeno per se, o productos no patogénicos químicos u orgánicos naturales o sintéticos, se estimulan o activan los genes relacionados con los sistemas de defensa de la planta a plagas o enfermedades.

El trabajo realizado en los últimos 50 años de investigaciones en SAR ha mostrado que este fenómeno es una alternativa efectiva y valiosa en el manejo integrado de plagas y enfermedades, especialmente en sistemas de producción con tecnologías limpias o amigables al ambiente. Siendo este un tema muy amplio, el taller se concretó en presentar tres temas principales: moléculas inductoras de resistencia, tipos de inducción y caracterización de resistencia en plagas, y aplicaciones de los mecanismos de resistencia en plantas. Todo esto con el objetivo primordial de promover el estudio, desarrollo y utilización de la SAR como una alternativa a la forma tradicional de manejo de plagas y enfermedades en ALC. Paralelamente, se busco promover la investigación conjunta en temas estratégicos para ALC, priorizando y fortaleciendo las actividades que ya se desarrollan en diferentes instituciones de la región pero en forma aislada y con muy poco apoyo financiero y humano.

Queremos dejar expreso nuestro más sincero agradecimiento a todos los autores por su decidido apoyo en responder al llamado de colaboración y por su entusiasmo durante el desarrollo del taller. También, queremos reconocer y agradecer a los doctores Alba Stella Riveros y Luis E. Pocasangre por concebir y desarrollar la idea del taller, promoverlo y buscar los recursos financieros y humanos para asegurar el éxito del evento. Y, finalmente, un reconocimiento al CATIE por su visión futurista al incluir el tema de inducción de resistencia para cultivos tropicales, en sus líneas de investigación, buscando desarrollar y utilizar nuevas soluciones para el mejoramiento de la productividad del sector agroforestal de ALC.

Franklin E. Rosales  
Coordinador Regional de INIBAP para  
América Latina y el Caribe

# A HISTORICAL DEVELOPMENT OF INDUCED RESISTANCE: BIOLOGICAL AND MOLECULAR BASIS

**Joseph Kuc**

*Professor Emeritus, University of Kentucky  
5502 Lorna Street, Torrance,  
California 90503 - U.S.A.  
e-mail: JoeKuc@Aol.com*

**CATIE**



## **The Phenomenon**

Induced systemic resistance (ISR) in plants to disease is a phenomenon whereby the inoculation of lower leaves (or roots) with restrictive pathogens, nonpathogenic races of pathogens or some nonpathogens or treatment with pathogen products, nonpathogen products, organic or inorganic chemicals induces systemic resistance to disease. ISR is sometimes referred to in the literature as SIR and SAR. ISR persists for different lengths of time ranging from one week to three months depending upon the choice of plant, pathogen and inducing agent. Induced local resistance (ILR) is restricted to areas around the site of induction and varies in persistence.

ISR has likely been with us as long as plants and pathogens coevolved just as ISR (immunization) has been evident as long as animals and pathogens have coevolved. Observations of ISR were reported as early as the 1800's (Chester, 1933), and Muller and Borges (1940) described experiments establishing ILR in potatoes to late blight (*Phytophthora infestans*). Inoculation of potato tubers with cultivar-nonpathogenic races induced local resistance to pathogenic races of the fungus. This work and subsequent studies by Muller and coworkers also established the concept of active defense mechanisms for resistance to disease, a response after infection, and proved to be the foundation for work with phytoalexins.

ISR were analytically established by Kuc *et al.* (1959) and Ross (1966). Kuc *et al.* (1959) demonstrated that apple seedlings could be made systemically resistant to apple scab (*Venturia inaequalis*) by infusing lower leaves with some D-amino acids. Ross (1966) demonstrated that the inoculation of the lower leaves of tobacco with a local lesion strain of tobacco mosaic virus (TMV) systemically enhanced resistance to the same strain of the virus. The continued research by Kuc and coworkers verified the reports by Ross and added to and expanded our understanding of ISR and its application for disease control.

Kuc and coworkers demonstrated that ISR was not specific with respect to the nature of the inducer or the biological spectrum of its activity. Thus, unrelated fungi, bacteria, viruses or chemicals induced resistance systemically against all three classes of pathogens, and in some cases reported, even protected plants against damage caused by herbicides and oxidants (Kuc, 1982, 1995ab, 1997, 1999; Dalisay and Kuc, 1995; Fought and Kuc, 1996; Gattstein and Kuc, 1989; Karban and Kuc, 1999; Lusso and Kuc, 1999; Mucharromah and Kuc, 1991; Strobel and Kuc, 1995). This was demonstrated

with different plants including cucumber, watermelon, muskmelon, tobacco, tomato, apple and pear and all three classes of pathogens. An important aspect of ISR first reported by Kuc and coworkers (Kuc, 2001) is that it sensitizes (primes) plants to respond rapidly after infection. The molecular basis for sensitization is still unknown, but the phenomenon appears even more important for defense against disease than the initial elevation of defense compounds as result of induction (Kuc, 2001; Conrath *et al.*, 2001). It is intriguing to compare the sensitization associated with ISR with aspects of the immune response in animals.

Research in ISR has expanded rapidly with contributions from many laboratories worldwide. It has been reported in plants as diverse as *Arabidopsis* and coffee and includes nematodes and insects (Agrawal, Tuzun and Bent, 1999; Schmidt and Huber, 2001). Clearly, ISR offers exciting possibilities for the control of disease and insects and this subject will be presented in my second talk.

### **Inducers and Mechanisms for Defense**

What is the molecular basis for the induction of ISR and what are the defenses the plant mobilizes as a result of ISR? It is clear from evidence based on many scientific approaches that a signal(s) for ISR is produced at the site of induction and this signal (s) either travels systemically or caused the production/release of signal (s) which travel systemically and condition ISR. The nature of the initial and translocated signal (s) is unknown. It is also well established that at least two chemicals are involved in the signaling process, salicylic acid (SA) and jasmonic acid (JA). Both compounds are critical for the activation of different pathways for defense; however, neither appears to be the initial (primary) signal and it is uncertain whether they are the translocated signal (s) (Bostock *et al.*, 2001; Metraux, 2001; Pieterse *et al.*, 2001). Evidence also exists that additional compounds independent of SA and JA are important for signaling as it relates to plant defenses. Depending on numerous factors including the plant and timing of their application, SA and JA can have synergistic or additive effects or activation by one can inhibit activation by the other. In at least one report of induced resistance by bacteria, concurrent expression of both SA and JA – mediated pathways for resistance were expressed (Bostock *et al.*, 2001). Central to the activation of multiple pathways for defense may be the production of reactive oxygen species, (ROS) a free radicals and nitric oxide (Kuc, 2001; Delledonne, *et al.*, 1998; Dixon *et al.*, 1994; Baker and Orlandi, 1995; Lamb and Dixon, 1997).

The inducers of resistance vary greatly from insects, fungi, bacteria, viruses and nematodes to simple inorganic chemicals such as di and tri potassium phosphates and ferric chloride (Kuc, 2001). Organic chemicals reported to induce resistance vary in structure from proteins and polysaccharides to amino acids, sugar derivatives, herbicides and fatty acids. Because of the diversity of inducing agents, the inducers of ISR are likely active not for a unique structural feature but rather for something (s) they do in common.

The compounds associated with defense elicited by ISR also vary greatly and include phytoalexins, ROS, oxidative enzymes, hydrolytic enzymes, cell wall polymers, antimicrobial peptides and proteins and lipoxygenases (Kuc, 2001). Not all of these responses are apparent in all plants and with all inducing agents and pathogens. However, in all reports of ISR the response is multicomponent and this likely explains the effectiveness of ISR against many diseases.

The lack of specificity of ISR with respect to its induction and broad biological spectrum of effectiveness makes ISR extremely attractive for the practical control of disease and insects. However, the same properties of ISR also make the elucidation of signaling processes and the molecular basis for defense and its regulation more difficult.

## References

- Agrawal, A. Tuzun, S. and Bent, E. (ed.). 1999.** Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores. Amer. Phytopathol. Soc. Press., St. Paul.
- Baker, C. Orlandi, E. 1995.** Active oxygen in plant pathogenesis. *Annu Rev. Phytopathology* 3:299-321.
- Bostock, R. Karban, R. J. Thaler; Weyman, P. Gilchrist, D. 2001.** Signal interactions in induced resistance to pathogens and insects. *European J. Plant Pathology* 107:103-111.
- Chester, K. 1933.** The problem of acquired physiological immunity in plants. *Quar. Rev. Biol.* 8:129-154, 275-324.
- Conrath, U. Thulke, O. Katz, V. Schivendling, S. Kohler, A. 2001.** Priming as a mechanism in induced systemic resistance in plants. *European J. Plant Pathology* 107:113-119.
- Dalisay, R., Kuc, J. 1995.** Persistence of induced resistance and enhanced peroxidase and chitinase activities in cucumber plants. *Phytopathol. 47:315-327.*
- Delledonne, M. Xia, Y. Dixon, R. Lamb, C. 1988.** Nitric oxide functions as a signal in plant disease resistance. *Nature* 394:585-588.
- Dixon, R. Harrison, M. Lamb, C. 1994.** Early events in the activation of plant defense responses. *Annu Rev. Phytopathology* 32:479-501.
- Fought, L. Kuc, J. 1996.** Lack of specificity in plant extracts and chemicals as inducers of systemic resistance in cucumber plants to anthracnose. *J. Plant Pathol.* 144:1-6.
- Gottstein, H. Kuc, J. 1989.** The induction of systemic resistance to anthracnose in cucumber by phosphates. *Phytopathology* 79:271-275.
- Karban, R. Kuc, J. 1999.** Induced resistance against herbivores and pathogens: an overview. In: Agrawal, A., Tuzun, S., Bent, E. (ed) *Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores* pp. 1-16 Amer. Phytopathol. Soc. Press, St. Paul.
- Kuc, J. 1982.** Induced immunity to plant disease. *Bioscience* 32:854-860.
- Kuc, J. 1995a.** Phytoalexins, stress metabolism and disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:275-297.

- Kuc, J. 1995 b.** Induced systemic resistance: an overview. In: Hammerschmidt R., Kuc, J. (ed). *Induced Systemic Resistance to Disease in Plants* (pp. 169-175). Kluwer, Dordrecht.
- Kuc, J. 1997.** Molecular aspects of peanut response to pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum* 19:551-559.
- Kuc, J. 1999.** Specificity and lack of specificity as they relate to plant defense compounds and disease control. In: Russell, P., Dehn H. (ed) *Modern Fungicides and Antifungal Compounds*, 12th Inter Symp Rheinhardtbrunn (pp. 31-37) Intercept Ltd. UK.
- Kuc, J. 2001.** Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *European J. Plant Pathol.* 107:7-12.
- Kuc, J. Barnes, E. Daftisios, A. Williams, E. 1959.** The effect of amino acids on susceptibility of apple varieties to scab. *Phytopathology* 49:313-315.
- Lamb, C. Dixon, R. 1997.** The oxidative burst in plant disease resistance. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec Biol.* 48:251-275.
- Lusso, M. Kuc, J. 1999.** Plant responses to pathogens. In: Jernes H. (ed.) *Plant Responses to environmental Stresses from Phytohormones to Genome Reorganization* (pp. 683-706) Marcel Dekker, NY.
- Metraux, J.P. 2001.** Systemic acquired resistance and salicylic acid: current state of knowledge, *European J. Plant Pathol.* 107:13-18.
- Muller, K.; Borges, H. 1940.** Experimentelle untersuchungen uber die Phytophthora resistaz der kartoffel. *Arbeiten Biologischern anst. reichsunstalt Berlin* 23:189-231.
- Pieterse, C. Van Pett J. Van Wees, S. Tom, J. Leon-Kloosterziel, K. Keunenjes, J. Verhagen, B. Knoester, M. Van der Gluis, J. Bakker, P. Van Loon, L. 2001.** Rhizobacteria mediated induced systemic resistance: triggering, signaling and expression, *European J. Plant Pathol.* 107:51-61.
- Ross, A. 1966.** Systemic effects of local lesion formation. In: Beemster, A., Dykstra S. (ed) (pp. 127-150) North Holland Press Amsterdam.
- Schmidt, A., Huber, J.. 2001.** Proc. Conf on Induced Resistance to Pathogens and Insects, Wageningen, the Netherlands.
- Strobel, N., Kuc, J. 1995.** Chemical and biological inducers of systemic resistance to pathogens protect cucumber and tobacco plants from damage caused by paraquat and cupric chloride. *Phytopathology* 85:1306-1310.



# CHARACTERIZATION AND IMPORTANCE OF MICROBIAL BIODIVERSITY IN AGRICULTURAL SOIL-ECOSYSTEMS FOR PLANT ROOT HEALTH

**Richard A. Sikora**

*Institute for Plant Pathology, University of Bonn  
Nussallee 9, 53115 Bonn, Germany  
e-mail: Rsikora@uni\_bonn.d*



**Richard A. Sikora.** Soil-ecosystem Phytopathology and Nematology,  
Institute for Plant Pathology, University of Bonn, Nussallee 9, 53115 Bonn, Germany

The soil is a treasure chest containing an enormous number of microorganisms. The vast majority of these organisms still have unknown potential with regards to their use in biological control of soil-borne nematodes and diseases. It has been shown, however, that approximately ten percent of the microorganisms that colonizing the rhizosphere of plants have significant levels of biological control activity. Biological control with microorganisms has been very successful for a number of soil-borne nematode and fungal diseases. However, there are only a few commercial products on the market.

The techniques selected to isolate and test soil-borne microorganisms for biological control activity are extremely important in determining overall practical success. Methodology determines whether a research program designed to find new and effective biological control agents will detect microbes that can be produce commercially and work effectively in the field. Often the organisms isolated and studied for biological control are of little practical importance for a number of important reasons.

In order to be successful the isolation and screening protocols have to reflect:

- 1) **weak links in the biology** of the pest or disease agent targeted for control and
- 2) **commercial characteristics** of the agents needed for commercial production

In many instances these two points are ignored or are not initially considered important. This often leads to the detection of biological control agents that are effective under greenhouse conditions, but not acceptable to industry or the grower.

Research has demonstrated that control of plant parasitic nematodes and root pathogens is most effective when the biological control microorganisms are either:

- **rhizosphere competent** or
- able colonize the root tissue **endophytically**

The intimate nature of this type of tri-trophic interrelationship **root – biological agent - disease** increases the level of biological control and practical acceptance by:

- 1) Targeting biological control to the exact site of infection
- 2) Limiting side-effects by reducing control to the primary damage window
- 3) Concentrating treatment to seed, tissue culture plantlets or seedling and thereby
- 4) Minimizing inoculum required which reduces overall costs

In some cases management of the **antagonistic potential** naturally present in a soil can lead to the development of a suppressive soil. However, total suppressiveness is not a common occurrence in agricultural soils. In fact, in modern agriculture and with our knowledge of plant protection, suppressiveness may not even be needed to effectively limit damage due to soil-borne nematodes or diseases and increase crop yield. A definite, and in some cases measurable, degree of biological control occurs constantly in agricultural soils. It leads to what is often seen as a healthy root system.

**Rhizosphere specific microbial communities** as well as microorganisms present in the soil have unique qualities, when examined as a whole, regarding nematode and disease suppressiveness. The management of these communities and integration of this knowledge in integrated control has to be examined more closely. Various aspects of the above mentioned characteristics of microbial diversity in soil as it relates to a healthy root system will be discussed in detail in this lecture.

# BASES BIOQUIMICAS DE LA RESISTENCIA EN PLANTAS

**Alba Stella Riveros**

Convenio UT-CATIE c/o Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza "CATIE"

Unidad de Fitoprotección, 7170, Turrialba, Costa Rica,

e-mail: [asrivero@catie.ac.cr](mailto:asrivero@catie.ac.cr) /o/ [stella@racsa.co.cr](mailto:stella@racsa.co.cr)

Tels: (506) 558 2446 ó 556 1632 Fax (506) 556 0606

**CATIE**



## Resumen

En este artículo se hace una revisión sobre algunas de las actividades enzimáticas de origen vegetal, las cuales pueden tener la capacidad de alterar la pared de oligo o polisacáridos propia de bacterias u hongos. Se conoce que las plantas responden al ataque de patógenos de diferentes formas. Entre las respuestas de defensa más estudiadas están la reacción de hipersensibilidad (RH) y la síntesis de proteínas relacionadas con la patogénesis (Pathogenesis Related - PR), donde se encuentran las enzimas hidrolíticas  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas, con actividad antimicrobial. Asimismo, se analizarán los mecanismos que se presentan en la reacción oxidativa con la participación activa de proteínas estructurales localizadas en la pared celular, la cual se compara frecuentemente a la de los macrófagos en animales. Finalmente, se estudia un caso de actividad inducida de la  $\beta$ -1,3-glucanasa, no-específico del cultivar, obtenida desde el fluido intercelular de cultivares de banano resistentes y susceptibles a *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra.

**Palabras claves:** PR-proteínas,  $\beta$ -1,3-glucanasa, banana, *Mycosphaerella fijiensis*, fluido intercelular

## Introducción

Las plantas superiores a lo largo de su evolución, han sido capaces de desarrollar una gama de mecanismos o sistemas de defensa para contrarrestar a los patógenos e insectos plagas que las atacan. Estas reacciones de defensa han sido caracterizadas ampliamente en el ámbito celular, histológico, inmunocitológico, bioquímico o enzimológico y/o molecular. Como respuestas pasivas en la pared celular, podemos mencionar: la lignina, la callosa, capas de corcho o suberina, depósitos de gomas, la cutina, glicosidos fenólicos, fenoles, quinonas, esteroides, glicoalcaloides, terpenoides y proteínas (tioninas). En las respuestas activas, las cuales progresan después de la infección, encontramos: las fitoalexinas, especies activas de oxígeno "AOS", activación del programa de muerte celular, radicales libres, los iones calcio, siliconas y silicatos, polifenoloxidasas, peroxidadas, fenilalanina-amoniaco-liasa, polímeros de pared unidos a formas fenólicas, glicoproteínas ricas en glicina o hidroxiprolina, callosa, lignina, lipooxigenasas, fosfolipasas, tioninas, proteínas ricas en leucina, ribonucleasas, proteasas, péptidos y proteínas antimicrobiales relacionadas con la patogenicidad (quitinasas y  $\beta$ -1,3-glucanasas, entre otras).

Las proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR) pueden ser expresadas de forma constitutiva e inducida en respuesta a la infección, se pueden localizar tanto en los espacios inter como intracelulares, lo que las hace a veces ser básicas o ácidas, se han encontrado de preferencia almacenadas en las vacuolas [Yun *et al* 1997]. En los primeros estudios de relación planta-patógeno, se identificaron 5 clases de PR, caracterizadas mediante la utilización de técnicas bioquímicas y moleculares [Bol *et al* 1990]. Luego, se reconocieron 11 familias de proteínas PR y recientemente, se han incluido tres familias más (PR-12, PR-13 y PR-14) al listado [van Loon and van Strien 1999]. En la relación planta-insectos plaga; también, se ha reportado la inducción de las PR y se ha indicado especial reserva con las quitinasas, donde se evidencian efectos negativos sobre insectos mutualistas [Heil *et al.* 1999, Inbar *et al.* 1999, Mayer *et al.* 1996].

Entre las PR mas comúnmente estudiadas encontramos: (i) la  $\beta$ -1,3-glucanasas, la cual hidroliza los  $\beta$ -1,3-glucanos similares a la laminarina; (ii) la quitinasa que se ocupa en degradar la quitina; (iii) la quitosanasa que hidroliza el quitosano y (iv) la lysosimasas que degrada los peptidoglicanos. Los  $\beta$ -1,3-glucanos, el quitin y el quitosano se encuentran frecuentemente en la pared de los hongos, donde los extremos de las hifas en crecimiento son altamente expuestas a estas enzimas (vea figura 1); mientras que, los peptidoglicanos son constituyentes de la pared de bacterias.

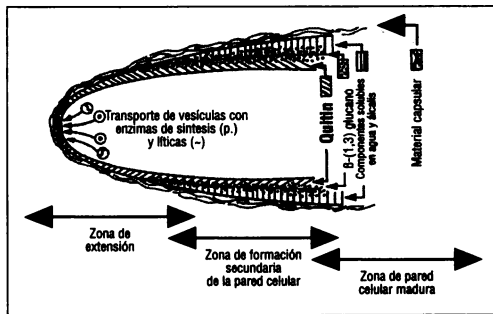


Figura 1. Representación esquemática de la pared de una hifa fúngica de Ascomycotinos en crecimiento (Boiler 1987).

La reacción de defensa necrótica rápida y localizada, reacción hipersensible (RH) acompañada de muerte celular, fue descrita por primera vez por Stakman [1915] ocurriendo únicamente en plantas resistentes. La RH esta asociada al bloqueo en el desarrollo del patógeno (bacteria, hongo o virus), con la aparición de puntos de color café que se tornan prontamente necróticos coalescentes que se extienden al citoplasma de la célula invadida. Se sugiere que la RH es una forma de programa de muerte celular (PMC) en plantas, donde intervienen intermediarios de oxígeno reactivos "sistema redox", iones superóxidos y el peróxido de hidrógeno. Por consiguiente se tiene que, la RH es un multicomponente asociado a un proceso dinámico donde intervienen funciones metabólicas y estructurales en y alrededor de las células comprometidas con la infección, causando agregación del citoplasma, cambios en el potencial de membrana, generación de iones  $O_2^-$ , inducción de enzimas de la biosíntesis de fitoalexinas y activación de PR. El saber si la RH es pre-requisito para que sé de la resistencia o simplemente es la consecuencia de otros mecanismos que limitan al patógeno siempre ha sido la incógnita. Ya se han encontrado casos de plantas interactuando con bacterias, hongos o virus que siendo resistentes no utilizan la señal

de RH y esto cuestiona el papel central y prioritario que siempre se le había asignado a la RH [Bendahmane *et al.*1999, Kombrink and Schmelzer 2001]. No obstante, en el futuro inmediato, aún quedan preguntas sin responder sobre la RH y/o el PMC que deben ser abordadas con técnicas genéticas, bioquímicas y citológicas de alta resolución

Actualmente, se están estudiando sistemas de resistencia más duradera en las plantas, mediante el proceso de inducción de señales de defensa, en lo que se denomina la resistencia sistémica adquirida (SAR) [Kuc 2001]. En este proceso se realiza una transcripción en cascada de una serie de genes en los diferentes tejidos de la planta, cuya función es poner a sintetizar proteínas, a partir de estos genes SAR, que cumplirían el papel de enzimas activadoras de la acumulación de productos de defensa, tales como enzimas hidrolíticas ( $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas), enzimas que intervienen en el metabolismo de productos secundarios, entre otros [Tuzun 2001]. El sistema SAR, al cual se ha hecho amplia referencia en algunas de las presentaciones de este mismo taller [Kuc, 2002a], posee un gran valor, al ser inducido por una variedad de moléculas activadoras "elicitors" [revisión Riveros, 2001].

### **Evidencia de actividad inducida de $\beta$ -1,3-glucanasa no-específica del cultivar en la interacción *Mycosphaerella fijiensis*-banano**

El cultivo de banano se encuentra ampliamente distribuido en las regiones tropicales y subtropicales del mundo. El estimado de la producción es de 88 millones de toneladas al año con una área calculada de siembra de 10 millones de hectáreas. Este cultivo forma parte de la dieta alimenticia de más de 400 millones de personas y ocupa el cuarto renglón en productos de gran demanda después del arroz, el trigo y la leche [FAO 2001]. América Latina y el Caribe, es una de las regiones más productoras de banano (*Musa* AAA), el cual constituye una fuente alimenticia muy importante, fuente de divisas y de trabajo. Entre las enfermedades y plagas que afectan al cultivo, podemos mencionar las causadas por: virus, bacterias, hongos, nematodos y plagas como el picudo negro, entre otras. Entre las enfermedades fungosas, en orden de importancia tenemos la Sigatoka negra ocasionada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, el cual ocasiona lesiones en las hojas con fuerte reducción en la producción y pérdidas económicas cuantiosas.

La sensibilidad a la Sigatoka negra ha sido estudiada bajo condiciones de campo en un gran número de cultivares que corresponden a diversos grupos genéticos, esto permitió agrupar en tres categorías: (1) cultivares altamente resistentes (AR) caracterizados por un bloqueo temprano de la infección; (2) cultivares parcialmente resistentes o tolerantes (PR), los cuales exhiben una evolución lenta de los síntomas y (3) los clones susceptibles (S) caracterizados por una evolución rápida de lesiones necróticas y la presencia de un número bajo de hojas funcionales al momento de la cosecha. La interacción *Musa-M. fijiensis* (cepa 049HND) fue posteriormente estudiada bajo condiciones de inoculación controlada en el invernadero, donde corroboraron los resultados de campo con tres cultivares de referencia: AR=Yangambi Km5 (AAA); PR=Fougamou (ABB) y S=Gran enano (AAA) [Beveraggi *et al.* 1995].

Estudios citológicos de *Musa-M. fijiensis* en estos mismos tres cultivares revelaron que este hongo, es un parásito biotrófico por lo menos en la primera fase de su desarrollo, su penetración la hace a través de los estomas y coloniza exclusivamente el espacio intercelular entre las células del mesófilo de la hoja sin formar haustorio. De esta

manera, el cultivar S muestra un largo periodo de fase biotrófica del patógeno antes de las primeras observaciones de modificaciones citológicas de las células del mesófilo (acumulación intravacuolar de glóbulos esféricos) alrededor del día 28 después de la inoculación [Sallé et al. 1989]. En cuanto a la necrosis, las células de guarda de estomas y la aparición de aposiciones fluorescentes alrededor del sitio de penetración de *M. fijiensis* están asociadas a la interacción incompatible en el cultivar altamente resistente Yangambi Km5, en donde se produce un colapso rápido de unas pocas células que mueren limitando la progresión de la infección, reacción que la hace definir como de hipersensibilidad (RH) y lo deja como uno mecanismo primario de resistencia en enfermedades en plantas en el marco de una relación gen-por-gen.

La inducción de este fenómeno podría ser explicado bien por la presencia de inductores específicos o por la acción de inductores no-específicos trabajando en conjunto con supresores específicos. Estos inductores pueden ser producidos *in vitro* o en medio sintético, lo que hace difícil para evaluar su relevancia en la RH, ocurriendo en plantas inoculadas o infectadas en campo o desde extractos provenientes de tejido infectado [Sutherland and Deverall 1990, De Wit *et al.* 1985]. En este sentido, la interacción *M. fijiensis*-banana es un buen sistema modelo para estudiar la interacción entre planta-patógeno, como una interface de intercambio de moléculas cuyo escenario es la cavidad apoplástica de la célula vegetal desde la cual se hacen extracciones de fluidos intercelulares desde combinaciones compatibles e incompatibles, con facilidad para hacer análisis enzimáticos de estas proteínas PR.

## **Materiales y métodos**

### **Material vegetal y fúngico : condiciones de crecimiento e inoculación**

Se utilizaron plantas de los cultivares Gran enano susceptible y Yangambi Km5 resistente fueron micropropagadas por las técnicas convencionales de cultivo de tejidos. Las hojas número 2 provenientes de vitroplantas de 8 a 9 semanas de edad (estado cinco hojas funcionales) fueron o bien inoculadas con esporas de *Mycosphaerella fijiensis* o usadas para la metodología de inyección de fluido intercelular mediante el empleo de micro-jeringas.

Cultivos monospóricos de *M. fijiensis* (cepa 049HND origen Honduras y donada de la colección del Dr. Xavier Mourichon, Laboratorio de Patología Vegetal CIRAD-FHLOR en Montpellier, Francia) fueron subcultivados en medio V8. Suspensiones conidiales fueron preparadas de cultivos con 12 días de edad. Para efectos de inoculación, se obtuvo una suspensión de  $2 \times 10^5$  cfu/ml a la cual se le adiciona una solución al 1% de gelatina antes de asperjar sobre la hoja número dos de cada planta y cultivar tratado. A esta inoculación inicial se le permitió secar y luego se aplicó de nuevo una segunda y última aspersión para dar una mayor presión de inóculo y lograr una completa homogenización de la suspensión sobre el tejido. Se establecieron controles, donde se retiró únicamente la suspensión conidial de *M. fijiensis*. Durante las primeras 72 horas de incubación se mantuvieron en una cámara de incubación que mantiene una alta humedad relativa cercana al 96% a  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  con 16 h de fotoperiodo de luz [Riveros y Lepoivre 1998].

### **Preparación de fluido intercelular (FI) y Extracto total de hojas (ETH)**

El FI fue obtenido mediante el método adaptado y modificado desde De Wit and Spikman [1982]. El FI fue extraído desde hojas de plantas inoculadas y no-inoculadas (control) colectados en diferentes tiempos después de la inoculación. Los pasos seguidos hasta la obtención de proteína aparecen consignados en Riveros [2002a]. El ETH fue

preparado desde hojas inoculadas u hojas control desde cada uno de los cultivares estudiados. El tejido de hoja fue colectado en varios intervalos de tiempo después de la inoculación o inducción e inmediatamente pesadas y guardadas a  $-70^{\circ}\text{C}$ . El material pesado se somete a maceración inicial al mortero utilizando hielo seco con polyvinil-polypyrrolidone (0.25 g/g peso fresco) y diluido en 50 mM del tampón acetato de potasio (pH 5), 15mM de 2-mercaptoetanol (5ml/g peso fresco) y llevado al Ultra-turrax para homogeneización a razón de 24000 vueltas/90 segundos. Estos homogeneizados fueron filtrados sobre etamina y clarificados por centrifugación a 12000 rpm durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante fue recuperado cuidadosamente usado inmediatamente o guardado para las valoraciones de cantidad de proteína total [Bradford 1976] y la aplicación del método de lectura de la enzima correspondiente. Para mayores detalles en Riveros [1995, 2002a] se consignan procedimientos para efectos de concentración, obtenciones de fracciones crudas y parcialmente purificadas y liofilización de productos.

### **Procedimiento de Inyección foliar**

Antes de la inyección, las plantas aclimatadas provenientes de cultivo *in vitro* y en estado de cinco hojas funcionales fueron sometidas a una pre-incubación en cámara húmeda a  $25\pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 1 o 2 h. El FI a aplicar fue pasado por un filtro Millipore (0.22 $\mu\text{m}$ ) e inyectado en plantas sanas de cada uno de los cultivares sobre la hoja numero dos, utilizando una micro-jeringa insertada en un corcho de caucho y presionada suavemente para lograr la penetración por presión del liquido al interior de la hoja . La zona que muestra la penetración del FI, generalmente en forma circular, es marcada con un marcador y en todos los casos controles fueron establecidos que llevan aplicación del tampón estéril (fosfato de potasio 10mM, pH 5.1). Cada hoja fue inyectada de 2 a 4 sitios por hoja con 25 $\mu\text{l}$  de FI por sitio, lo que permite aproximadamente un área de 0.5  $\text{cm}^2$  por sitio. Se llevaron a cabo tres replicas utilizando otras plantas del mismo cultivar. Las plantas fueron mantenidas en cámara de incubación bajo condiciones similares a la fase después de la inoculación, citada en el primer párrafo de esta misma metodología.

### **Actividad enzimática $\beta$ -1,3-glucanasa**

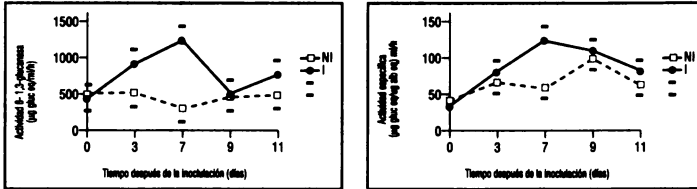
La determinación de la actividad enzimática de la  $\beta$ -1,3-glucanasa fue realizada utilizando el método de Nelson-Somogyi el cual determina la cantidad de azúcar reducido que se produce después de la incubación de cada muestra con el sustrato laminarina (Sigma) [Nelson 1944, Somogyi 1952]. La mezcla reaccional contiene 250  $\mu\text{l}$  de extracto crudo de la enzima y 250 $\mu\text{l}$  de la solución de laminarina a partir de laminarina disuelta en 1ml de 50 mM de tampón acetato de potasio (pH 5). Esta mezcla reaccional fue incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 1h y bloqueada llevándola a inmersión a  $100^{\circ}\text{C}$  por 10 min. Cada determinación de la actividad enzimática incluye controles consistentes en mezcla de la enzima desnaturalizada, con sustrato + tampón y dos controles estándares internos. Una unidad de enzima fue definida como la cantidad de enzima liberada desde 1  $\mu\text{g}$  glucosa equivalente en ml/h.

### **Diseño experimental y análisis estadístico**

Los experimentos fueron conducidos siguiendo un diseño de bloques completos al azar. Dos bloques fueron usados con dos plantas por bloque y por tratamiento (días después de la inoculación, horas después de la inyección, concentración y origen del FI). Los análisis estadísticos fueron realizados como se describe en protocolos anteriores y los datos fueron sujetos a análisis de varianza (ANOVA) mediante el SAS (Statistical Analysis System) y seguidos por una prueba de Newman-Keuls.

## Resultados

Los FI provenientes de hojas de banano (cv. Yangambi Km5) no-inoculadas e inoculadas con *Mycosphaerella fijiensis* (0, 3, 7, 9 y 11avo día después de la inoculación) fueron examinadas para la actividad enzimática  $\beta$ -1,3-glucanasa, inducción diferencial de la enzima fue observada significativamente al día 7 después de la inoculación y 48 horas de inyección como se muestra en la figura 2 (análisis de varianza  $P < 0.05$ ).



**Figura 2.** Cinética de la actividad enzimática de la  $\beta$ -1,3-glucanasa obtenidas durante la inyección del FI colectado después de la inoculación (0, 3, 7, 9 y 11 días) con *M. fijiensis*. Los datos son la media de tres repeticiones con cuatro plantas por fecha. La barra representa el error estándar de intervalo de confianza ( $\approx 5\%$ ).

NI: FI de cv. Yangambi Km5 plantas no-inoculadas  
I: FI de cv. Yangambi Km 5 plantas inoculadas

La figura de la derecha representa la actividad específica expresada en ( $\mu\text{g gluc eq}/\mu\text{g alb eq}/\text{ml/h}$ ) y la de la izquierda la actividad enzimática medida en ( $\mu\text{g gluc eq}/\text{ml/h}$ ), ambas en la horizontal, en función del número de días después de la inoculación.

Hojas de banano inoculadas y no-inoculadas (control) de los dos cultivares, colectadas 7 días después de la inoculación con *M. fijiensis*, se le fue analizada en el FI la cantidad de actividad enzimática  $\beta$ -1,3-glucanasa antes de someterlo a los procedimientos de concentración y periodo de diálisis (Tabla1). Estos resultados muestran que la actividad de esta enzima es un poco más elevada en el clon Gran enano susceptible que en el Yangambi Km5 resistente. Patrones similares fueron similares en ambos cultivares cuando fueron inoculados con *M. fijiensis*.

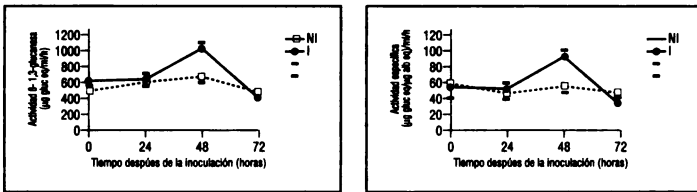
Actividad enzimática	Plantas no-inoculadas		Plantas inoculadas	
	Yangambi Km 5	Gran enano	Yangambi Km 5	Gran enano
$\beta$ -1,3-glucanasa ( $\mu\text{g gluc eq}/\text{ml/h}$ )	75	82	92	109

**Tabla 1.** Actividad enzimática  $\beta$ -1,3-glucanasa obtenida desde el FI al día 7 después de la inoculación con *Mycosphaerella fijiensis*<sup>a</sup>

<sup>a</sup>: Los valores son la medida de tres replicas

Basados en los resultados anteriormente presentados, nosotros usamos el FI colectado el día 7 después de la inoculación con *M. fijiensis* y monitoreamos la inducción de la cinética enzimática de la  $\beta$ -1,3-glucanasa a lo largo del tiempo (0, 24, 48 y 72 horas) después de la inyección de hojas de banano (figura 3). Esto fue demostrado que la actividad de la  $\beta$ -1,3-glucanasa aparece para tener una diferencia altamente significativa ( $P < 0.001$ ) a las 48 h después de la inyección de FI de plantas inoculadas como comparado con los FI provenientes de plantas no-inoculadas. La diferencia fue significativa, por tanto, esto sugiere que el óptimo de incubación para la inducción de la  $\beta$ -1,3-glucanasa se encuentra a las 48 h luego de haber ocurrido la inyección.



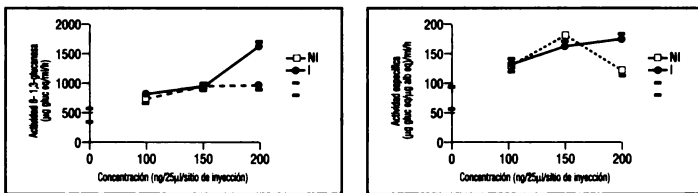


**Figura 3.** Cinética de la inducción de la actividad enzimática  $\beta$ -1,3-glucanasa después de 0, 24, 48 y 72 horas de inyección del FI colectado 7 días después de la inoculación con *M. fijiensis*. Los datos son la media de tres repeticiones con cuatro plantas por tiempo de muestreo. La barra error representa el intervalo de confianza ( $\alpha=5\%$ ).

NI: plantas tratadas con el FI desde plantas no-inoculadas del cv. Yangambi Km5  
 I: plantas tratadas con el FI desde plantas inoculadas del cv. Yangambi Km5.

La figura de la derecha representa la actividad específica expresada en ( $\mu\text{g gluc eq}/\mu\text{g alb eq}/\text{ml/h}$ ) y de la izquierda la actividad enzimática medida en ( $\mu\text{g gluc eq}/\text{ml/h}$ ), ambas en la horizontal, en función del número de horas después de la inoculación.

En los resultados presentados en la figura 4, es claro observar que la actividad enzimática  $\beta$ -1,3-glucanasa medida en las hojas de banano (clon Yangambi Km 5) infectadas por FI proveniente de plantas inoculadas revelan un incremento en la concentración base sobre contenido en concentración total.



**Figura 4.** Actividad enzimática  $\beta$ -1,3-glucanasa inducida después del tratamiento con 0, 100, 150 y 200 ng de proteína contenida en 25 ml por sitio de inyección del FI colectado el día 7 después de la inoculación con *M. fijiensis* y durante 48 h de incubación.

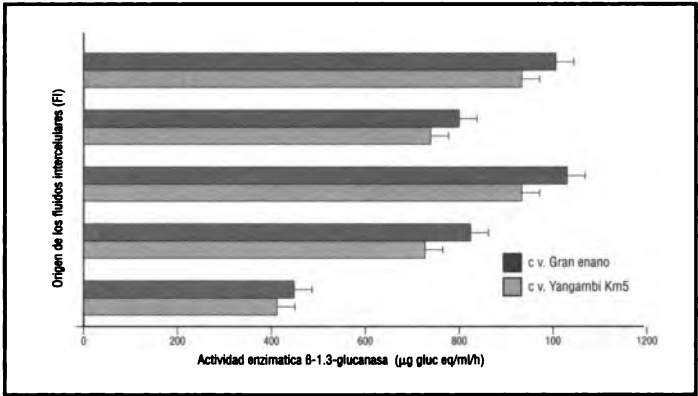
Los datos son la media de tres repeticiones con cuatro plantas por concentración dada. Las barras error representan el intervalo de confianza ( $\alpha=5\%$ ).

NI: plantas tratadas con FI desde plantas no-inoculadas del cv. Yangambi Km 5  
 I: plantas tratadas con FI desde plantas inoculadas del cv. Yangambi Km 5

La figura de la derecha representa la actividad específica expresada en ( $\mu\text{g gluc eq}/\mu\text{g alb eq}/\text{ml/h}$ ) y de la izquierda la actividad enzimática medida en ( $\mu\text{g gluc eq}/\text{ml/h}$ ), ambas en la horizontal, en función de la concentración ( $\text{ng}/25\mu\text{l}/\text{sitio}$ ) de inyección.

La actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa se encontró altamente significativa (análisis de varianza,  $P<0.001$ ) en la concentración máxima de 200  $\text{ng}/25\mu\text{l}$  por sitio de inyección. De esta manera y con el fin de identificar si la actividad enzimática  $\beta$ -1,3-glucanasa estaba presente o no en el genotipo de banana susceptible (clon Gran enano), se tomó el FI obtenido 7 días después de la inoculación con *M. fijiensis* extraído separadamente desde ambos cultivares, fue usado para inyectar hojas sanas de plantas de los dos cultivares y se realizó un protocolo experimental cruzado. Retomando los resultados anteriores, únicamente se trabajó 200  $\text{ng}/25\mu\text{l}$  por sitio de inyección y se dejó reaccionar en la incubación durante 48 h después de haber sucedido la inyección de FI. De esta manera, FI desde plantas inoculadas del (cv, Yangambi Km 5) y del cv. Gran enanos muestran un incremento significativo de actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa en comparación con los FI provenientes de cultivares no-inoculados ( $P<0.001$ ), pero una diferencia significativa fue detectada cuando los FI tenían orígenes de plantas R o S (vea figura 5).

En forma global, el experimento de inyección cruzada reveló que los FI desde cultivares S inoculados presentan actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa significativamente superior que aquellos provenientes del cultivar R (cv. Yangambi Km 5).



**Figura 5.** Actividad enzimática  $\beta$ -1,3-glucanasa inducida (en la horizontal en valores de 200 a 1200  $\mu\text{g gluc eq/ml/h}$ ), después del tratamiento con inyección cruzada de FI obtenidos desde plantas R y S, inoculadas o no-inoculadas, las cuales fueron inyectadas en hojas sanas de los dos clones de referencia en el estudio. Los datos son las medias de tres repeticiones con cuatro plantas por tiempo. Barras error representan los intervalos de confianza ( $\alpha=5\%$ ).

En la vertical se encuentran los FI, los cuales se encuentran ubicados de abajo hacia arriba según su origen, como sigue:  
**C:** control, hojas no-inoculadas de ambos cultivares tratadas con el tampón fosfato de potasio (10mM, pH 5)  
**RMI:** no-inoculadas del genotipo R (cv. Yangambi Ykm 5)  
**RI:** inoculadas del genotipo R (cv. Yangambi Ykm 5)  
**SMI:** no-inoculadas del genotipo S (cv. Gran enano)  
**SI:** inoculadas del genotipo S (cv. Gran enano)

## Discusión

En este estudio, se encontró la presencia de actividad inducida de  $\beta$ -1,3-glucanasa en el FI obtenido bien desde hojas de cultivares R y S inoculados con *M. fijiensis* siguiendo la inyección de hojas sanas de los mismos cultivares. Esta actividad fue evidenciada en ambos clones independientemente de la diferencia en sensibilidad a la infección. Estos inductores responsables de la inducción muestran claramente una no-especificidad en relación con el cultivar. Sin embargo, un aumento en la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa fue siempre superior en plantas del cultivar S (Gran enano) inoculadas, donde una mayor biomasa hifal se presenta colonizando los espacios intercelulares, lo que no es igual en el clon R [Sallé et al 1989], escenarios similares han sido reportados en tomate con *Verticillium albo-atrum* [Pegg and Young 1982] o con *Fusarium* [Ferraris et al 1987]. Esto ha sido demostrado que la actividad inductora encuentra su punto máximo a los 7 días después de la inoculación y que el tiempo que *M. fijiensis* penetra vía los estomas señala una correlación positiva entre inducción de la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa con la penetración y colonización del patógeno.

De otro lado, la inyección de FI en los espacios intercelulares de las hojas de banano no induce ni necrosis ni aposiciones fluorescentes después de 48 h de incubación (resultado no mostrado). Saber si la inducción de la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa es indispensable para resultado posteriores y contribuir con la cascada de mecanismos de defensa en cultivares de banano resistentes, es algo que aún no podemos concluir.

También, el encontrar en plantas no-inoculadas sometidas a los mismos procedimientos la presencia de esta enzima, similar al caso de quitinasa medidas para estos mismos cultivares (resultado no presentado), nos lleva a asumir que esta enzima, se encuentra en forma constitutiva. Primero, es posible tener una respuesta no-específica desde plantas que han recibido un estrés físico causado por el método de inyección. Y, segundo, se podría pensar que el ácido salicílico, el etileno, el metil metano jasmonato u otra señal molecular volátil presentes al interior de la célula en plantas inoculadas, podría ser la responsable, en forma indirecta, como mediador secundario, de conducir el mensaje a la inducción de la actividad  $\beta$ -1,3-glucanasa, en las hojas de plantas no-inoculadas. Lo anterior, coincide con estudios en otras especies de plantas [Wubben *et al* 1993; Farmer and Ryan 1990; Mauch *et al* 1988].

Nosotros podemos concluir que, en la interacción *M. fijiensis*-banana, la inducción de la actividad enzimática de la hidrolasa  $\beta$ -1,3-glucanasa extracelular en las hojas de banana no parece jugar un rol determinante en relación al desarrollo de la enfermedad y esto se reafirma al no encontrar acumulación diferencial entre una relación compatible e incompatible. Este tipo de comportamiento ha sido igualmente observado en *Cladosporium fulvum*-tomate [Wubben *et al* 1993] y desde *Puccinia recondita*-trigo [Sutherland and Deverall 1990]. Expresiones similares con otras proteínas tipo peroxididas asociadas con la resistencia sistémica adquirida han revelado como en algunos casos la inducción y acumulación de estas proteínas o compuestos de defensa no explican el verdadero significado de la resistencia [Ray *et al* 1998].

## Referencias

- Bendahmane, A, K Kanyuka and DC Baulcombe 1999.** The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses. *Plant Cell* 11: 781-791.
- Beveraggi, A., Mourichon, X and G. Sallé 1995.** Etude des interactions hôte-parasite chez des bananiers sensibles et résistants inoculés par *Cercospora fijiensis* (*Mycosphaerella fijiensis*) responsable de la maladie des raies noires. *Canadian Journal of Botany* 73: 1328-1337.
- Bradford, M.M 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding. *Anal. Biochem* 72: 248-254.
- Bol, J.F, HJM Linthorst and BJC Cornelissen 1990.** Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infectum. *Annual Review of Phytopathology* 28:113-138.
- Boller, T. 1987.** Hydrolytic enzymes in plant diseases resistance. In: Kosuge T and EW Nester (eds) *Plant Microbe-Interactions Vol 2* (pp. 385-413) MacMillan, New York, EEUU.
- De Wit, PJGM., Hofman, E., Velthuis GCM and J. Kuc 1985.** Isolation and characterization of an elicitor of necrosis isolated from intercellular fluids of compatible interactions of *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) and tomato. *Plant Physiol* 77: 642-647.

- De Wit, PJGM and G. Spikman 1982.** Evidence for the occurrence of race and cultivar-specific elicitors of necrosis in intercellular fluids of compatible interactions of *Cladosporium fulvum* and tomato. *Physiol Plant Pathol.* 21: 1-11.
- FAO 2001.** Production Yearbook. FAO Statistics Series , Rome, Italy.
- Farmer, EE and CA Ryan 1990.** Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves. *PNAS* 87: 7713-7716.
- Ferraris, L., Abbattista Gentile, I and A. Matta 1987.** Activation of glycosidases as a consequence of infection stress in Fusarium wilt of tomato. *J. Phytopathol.* 118: 317-325.
- Heil, M, B. Fiala, T. Boller and KE Linsenmair 1999.** Reduced chitinase activities in ant plants of the genus *Macaranga*. *Natur-wissenschaften* 86: 146-149.
- Inbar M, H. Doostdar, GL Leibe and RT Mayer 1999.** The role of plant rapidly induced responses in asymmetric inter-specific interactions among insect herbivores. *J. Chem Ecol* 25: 1961-1979.
- Kombrink, E and E. Schmelzer 2001.** The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *European Journal of Plant Pathology* 107: 69-78.
- Kuc, J. 2001.** Concepts and direction of induced systemic resistance in plants its application. *European Journal of Plant Pathology* 107: 7-12.
- Kuc, J. 2002a.** A historical development of induced resistance: biological and molecular basis. En: Riveros AS, Pocasangre LE y FE. Rosales (eds). *Memorias del Taller Internacional Inducción de Resistencia y Uso de tecnologías limpias para el manejo de plagas en plantas - Agosto 27 al 30, Turrialba, Costa Rica.*
- Mauch, F., Mauch-Mani, B and T. Boller 1988.** Antifungal hydrolases in Pea tissue. II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and b-1,3-glucanasa. *Plant Physiol* 88: 936-942.
- Mayer, RT, TG McCollum, RE McDonald, JE Polston and H Doostdar. 1996.** *Bemisia* feeding induces pathogenesis-related proteins in tomato. In Gerling D and Mayer RT (eds.) *Bemisia* 1995: Taxonomy, biology, damage control and management (Pages 179-188) Intercept Ltd., Andover, Hants, UK.
- Nelson, N. 1944.** A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem* 153: 375-380.
- Pegg, GF and DH Young 1982.** Purification and characterization of chitinase enzymes from healthy and *Verticillium albo-atrum*-infected tomato plants. *Physiol Plant Pathol.* 21: 389-409.
- Ray, H., Douches, D and R. Hammerschmidt 1998.** Transformation of potato with cucumber peroxidase: expression and disease response. *Physiological and Molecular Plant Pathology*.53: 93-103.

- Riveros, A.S. 1995.** Etude d'éliciteurs associés à la résistance du cultivar de bananier Yangambi Km 5 à *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Thèse de Docteur en Sciences Agronomiques, Faculté Universitaire des Sciences Agronomiques de Gembloux, Gembloux, Belgique. Resúmen en: Musarama Junio 1997 Vol. 10 (1) 19.
- Riveros, A.S y Ph. Lepoivre 1998.** Alternativas bioquímicas para el control indirecto de Sigatoka en *Musáceas*. In: Resúmenes XIII Reunión ACORBAT Pages 436- 447. Guayaquil, Ecuador.
- Riveros, A.S 2001.** Moléculas activadoras de la resistencia inducida, incorporadas en programas de Agricultura Sostenible. Revista Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 61:4-11
- Riveros, A.S 2002a.** Método para optimizar la obtención de proteína total e intercelular a partir de tejido foliar de *Musáceas*. En: Rosales FE y LE Pocasangre (eds). Oferta tecnológica de banano y plátano para América Latina y el Caribe (pp 9-11), Turrialba, Costa Rica.
- Sallé G., Pichard V et X. Mourichon 1989.** Cytological study of the interaction between *Mycosphaerella fijiensis* Morelet and three cultivars of *Musa* presenting different levels of resistance. In: Stover RH and RA Fullerton (eds) Sigatoka leaf spot disease of bananas. (pp. 180-190) INIBAP Montpellier, France.
- Somogyi, M 1952.** Notes on sugar determination. J. Biol. Chem. 195: 19-23.
- Stakman, EC. 1915.** Relation between Puccinia graminis and plants highly resistant to its attack. J. Agric. Res 4: 193-199.
- Sutherland, MW and BJ Deverall 1990.** The ubiquity of non-specific eliciting activity in intercellular washing fluids from rust-infected wheat leaves. Plant Pathol 39: 50-57.
- Tuzun, S. 2001.** The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. European J. Plant Pathol 107:85-93.
- Van Loon, LC and EA van Strien. 1999.** The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. Physiol Molec Plant Pathol 55: 85-97.
- Wubben, JP., Eijkelboom, CA and PJGM De Wit 1993.** Accumulation of pathogenesis-related proteins in the epidermis of tomato leaves infected by *Cladosporium fulvum*. Neth. J. Pl. Path. 99: 231-239.
- Yun, D, Bressan R.A and P Hasegawa. 1997.** Plant antifungal proteins. Horticultural Review 14: 39-87.

# SOIL MICROORGANISMS AND PLANT GROWTH REGULATORS FOR CROP STRESS MANAGEMENT

Rubén A. Ortiz V.  
*Agrosoil Consulting International*  
Apdo. 231-3011, Heredia, Costa Rica  
e-mail: [agrosoil@racsa.co.cr](mailto:agrosoil@racsa.co.cr)

**CATIE**



## ABSTRACT

Minimizing and/or avoiding the effect of stress factors on crop production are very important to sustain modern agriculture. Crop plants need to be stimulated and protected against biotic and abiotic stress factors, including pathogens and herbivores. Crop protection must be carried out with the minimum input of chemicals that may negatively affect the environment, animal, and human health. Plant growth regulators (PGRs) and soil microorganisms – related or derived products are now a viable option to reduce stress impact and increase crop productivity. A brief-general review of the role of microorganisms and PGRs in modern crop production and some of their relationships to induced resistance are presented in this paper.

## 1. INTRODUCTION

Biotic and abiotic stresses are prevalent in nature and have an important role on plant growth and development. Crop production can be substantially diminished by stress factors. Plant responses to stress factors can be part of the mechanisms that allow the plant to overcome stress. Mechanisms that allow stress survival are called resistance mechanisms and can help an organism to withstand or tolerate stress.

Recent advances had demonstrated that the mechanisms of expression of plant defense when attacked by disease causing pathogens (a biotic stress) indicate that it is possible to artificially stimulate the natural defense mechanisms (Bokshi and Jobling, 2000). The term Induced Resistance refers to a state of enhanced defensive capacity developed by a plant when appropriately stimulated (Sticher, 1997; Van Loon, Bakker, and Pieterse, 1998).

Soil microorganisms and crop growth regulators play an important role in providing protection to plants against pathogens. Some of them are currently used as "plant biostimulators". A general overview of the functions of soil microorganisms and crop growth regulators on induced resistance and crop stress relief will be described in this paper.

## 2. SOIL MICROORGANISMS: THE HARD WORKERS

Soil microorganisms can be used to enhance and optimize crop yield and quality. Nutrient cycling involves the activity of microorganisms, plants, and animals. Soil microorganisms are the most important components in organic matter decomposition and this is a critical component of the cycle. There are many types of microorganisms participating in this process. They perform the functions of putrefaction, fermentation, and synthesis (Higa and Parr, 1994). These three processes are very important in microorganism's activities.

Decomposer microorganisms carry out fermentation and lead to the transformation of complex organic molecules into simple organic compounds and organic matter mineralization. Putrefaction, in contrast, is the process by which heterotrophic microorganisms decompose proteins anaerobically yielding metabolites that can eventually be harmful to plants and animals. The synthesis refers to the capacity of certain microorganisms to fix atmospheric nitrogen and/or carbon dioxide (Higa and Parr, 1994).

There are both beneficial and harmful microorganisms in the soil. We are mostly interested in the beneficial (those that favor plant growth) and their influence on helping to reduce the effect of harmful microorganisms (those that induce plant diseases and adverse plant growth and health).

Some of the beneficial functions of soil microorganisms and their role on helping to control pathogens and pest attacks are described below:

TREATMENTS	BACTERIAS (UFC/g x 10 <sup>6</sup> )				ACTINOMYCETES (UFC/g x 10 <sup>6</sup> )				YEAST AND FUNGUS (UFC/g x 10 <sup>6</sup> )			
	15 DAT	%Inc	45 DAT	% Inc	15 DAT	%Inc	45 DAT	% Inc	15 DAT	%Inc	45 DAT	% Inc
Symbex + fresh pulp	2,1	108,0	1,2	-32,7	7,1	791	5,1	264,0	2,34	31,5	0,9	20,0
Symbex + pulp 22 days	2,3	127,0	6,8	277,8	1,2	154	1,3	-7,2	6,00	237,0	1,4	86,7
Symbex + pulp 15 days	1,7	166,0	2,6	44,4	8,0	900	2,9	107,0	4,75	167,0	0,8	8,0
Control (fresh pulp)	1,03		1,80		0,80		1,40		1,78		0,75	

**Table 1.** Soil microbial population variation as affected by different Symbex treatments in Costa Rica. June-August, 2001.

% Inc : Percent increment. DAT : days after treatment.

- Fixation of atmospheric nitrogen: better plant nutrition, especially nitrogen.
- Decomposition of organic matter and crop residues: nutrient cycling (nitrogen, phosphorus, sulfur) and soil fertility improvement; production of simple organic molecules for plant uptake.
- Improve of soil structure by the intertwining of the filamentous growth and the sticky substances (polysaccharides) produced by some microorganisms: better soil aeration (improved drainage) and water retention.
- Solubilization (dissolving) and/or mineralization of organic forms: making minerals such as phosphorus more available for plant uptake.
- Degradation of toxicants and complexation of heavy metals: reduced risk of limiting plant nutrient uptake and cleaning of surrounding environment.

Some soil microorganisms are critical in providing protection to the plant against pathogens. There are various ways by which the microorganisms are capable to provide this protection including the following:

- Suppression of soil-borne pathogens
- Production of enzymes, antibiotics, and other compounds that prevent the pathogens growth
- Competition for nutrients between pathogens and beneficial microorganisms
- Induction of plant resistance (Madigan, Martinko, and Parker, 1999)

<sup>1</sup>Disclaimer: Products commercial names are only used to describe the corresponding product. Agrosoil Consulting International is not recommending any particular commercial product

Most microbial activity related to plants occurs in the rhizosphere, the region surrounding the roots. Organic compounds stimulating heterotrophic microbes are excreted through the roots.

Soil quality, soil health, and crops yield and quality can be improved by the application of effective microorganisms to the soil/plant ecosystem. Effective microorganisms consist of "mixed cultures of beneficial and naturally-occurring microorganisms that can be applied as inoculants to increase the microbial diversity of soils and plants" (Higa, 1991). There are some effective microorganisms commercial products currently being used in crop production.

A very impressive product commercially called as a "microbial enzyme" and metabolic activator developed by fermentation of several microbes plus micronutrients named Symbex (AgroK Corporation, Minneapolis MN) has shown results of increasing native beneficial microorganisms populations. As an example, a study conducted by Cubero, Duarte, and Ortiz (2002) in Costa Rica carried out a trial applying Symbex<sup>1</sup> to orange pulp residues (after industrial juice extraction). The pulp was distributed in bands along the tree drop. The following treatments were used:

Treatment 1: Fresh pulp + Symbex (2.5 l/ha)

Treatment 2: pulp after 15 days of field exposure + Symbex (2.5 l/ha)

Treatment 3: pulp after 22 days of field exposure + Symbex (2.5 l/ha)

Treatment 4: Control, soil + fresh pulp

Soil microorganisms population laboratory counting was carried out 15 and 45 days after treatment (DAT). All treatments except Symbex + fresh pulp 45 DAT showed a substantial percent increment (44.4-227.8) in bacteria population as compared to the control treatment (table 1). Similar results were found for fungus population percent increment (8-237) (table 1).

All treatments except Symbex + pulp 22 days 45 DAT obtained high actinomycetes population as compared to the control (Table 1). Symbex + pulp 22 days DAT tended to reach the highest bacteria and fungus population growth. Citrus pulp almost totally decomposed and incorporated into the soil after 45 days. These results indicated that applying commercial microorganisms - growth improvement products could substantially increase soil beneficial microorganisms populations. This may definitely have a positive effect on plant resistance induction. Systemic resistance may also be induced by rhizosphere bacteria (van Loon, Bakker, and Pieterse, 1998) and organic matter inputs, such as plant residues, manure, and composed organic wastes (Vallad et al, 2000)

### **3. CROP GROWTH REGULATORS. THE PLANT STRESS RELIEVERS**

Light, water, temperature, nutrients, and plant hormones or plant growth regulators are very important factors in plant growth and development. A plant hormone is a substance produced in one part of a plant and transported to another where it is active in minute quantities (Salisbury and Ross, 1992). When a substance synthesized outside of a plant shows hormone/like activity, it is named a plant growth regulator (PGR) (Salisbury and Ross, 1992). By definition PGRs are naturally occurring compounds present and acting in minute amounts that help regulate plant growth and development; may act singly or in consort with other PGRs or other compounds (sugars, amino acids, enzymes, etc) (Arteca 1996; Salisbury and Ross, 1992).



There are five major categories of plant hormones traditionally recognized. These are the following: auxins, gibberellins, cytokinins, abscisic acid and ethylene. New families of crop regulators as the brassinosteroids, jasmonic acid, and more recently the salicylic acid are being recognized as PGRs or executing PGRs functions.

### **3.1. Classes and Functions of PGRs**

The classes and main functions of different PGRs from their use in agriculture perspective, rather than their physiological roles in plants and some of their possible interactions with resistance induction and relief of crop stress are described below.

#### **3.1.1. Cytokinins**

These hormones are associated to cell division and cell expansion in plants. There are natural cytokinins as zeatin and artificial as 6-benzyladenine. Cytokinins are present in roots, fruits, germinating seeds, and vascular sap. The following are some of its uses in agriculture:

- increases size of grape berries, bananas, plantains, kiwi-fruit, tomatoes, peppers, apples and other fruits, synergistic effects with gibberellins have been found.
- enlarge and improve apple fruit shape
- promote proliferation of apical bud development in ornamental and flower crops
- reduce rosetting growth due to cold weather or water stress in bananas and plantains
- promotes bud formation on stems, leaf cuttings and cultured tissues in a variety of crops
- improves growth of cereal grains (e.g. rice)
- promotes callus growth in tissue culture
- delay leaf senescence

(Arteca 1996; Chock et al 2000; Orozco, Ortiz, and Soto, 2001; Ortiz, 2000a; Ortiz, 2000b; Ortiz 2000c, Segura and Ortiz, 1998; Salisbury and Ross, 1992)

Cytokinins are becoming more and more popular for commercial use as stress relievers in a wide variety of crops.

#### **3.1.2. Gibberellins**

A wide variety of uses in agriculture are associated to gibberellins (GAs). Some of them are the following:

- promotion of germination in some dormant seeds and stimulate seedlings growth in citrus, apples, and peach
- mobilization of stored nutrients in seeds prior to germination
- flowering induction
- increase fruit size in apples
- reduce rosetting in different crops (e.g. bananas)
- promote elongation of stems in C4 grasses as sugarcane and bananas during cold weather
- stimulates elongation of floral stems and promotes better fruit size in grapes
- improves fruit size and shape / with cytokinins (e.g. bananas, apples)
- improves growth of cereal grains

(Arteca 1996; Chock et al 2000; Ortiz, 2000a; Orozco et al, 2001; Ortiz 2000c, Salisbury and Ross, 1992)

Plants respond very quickly to gibberellins application when affected by the negative effect of biotic or abiotic stress factors.

### **3.1.3. Auxins**

Auxins – affect cell division, elongation, differentiation and fruit development. The most common auxin is indolacetic acid (IAA). Their use in agriculture includes the following:

- rooting of cut stems and plant propagation
- control abscission by promoting thinning
- prevent pre/harvest drops
- stimulate abscission for harvest
- promotes callus formation in tissue culture plants
- promotes flowering and increase fruit size in pineapples

(Ortiz, 2000a; Arteca 1996; Salisbury and Ross, 1992)

Auxins play a very important role in crops, which require transplanting and are widely used as "rooting hormones" in vegetative plant propagation. They help small cuts and seedling to overcome cut and transplant stress.

### **3.1.4. Ethylene**

A powerful regulator of ripening and senescence. Widely used commercially to ripen fruits (bananas, plantains, citrus). Some uses in agriculture are as follows:

- used to force fruiting and field-ripen pineapple
- promotes flowering in pineapple, other bromeliads, and mango
- hastens fruit ripening (bananas, pineapple, tomatoes, oranges) and abscission
- ethephon - degrades to produce ethylene (gas) stimulates rubber trees latex flow
- promote female flowering for seed production in cucurbits

(Arteca 1996; Salisbury and Ross, 1992; Ortiz, 2000a)

Production of ethylene as a response to stresses as drought and wind have been related to Systemic acquired Resistance (SAR) induction.

### **3.1.5. Abscisic Acid (ABA)**

Although the role of abscission is implied by the name, its role in promoting abscission and or senescence is less accepted for most plant systems. Its major functions are related to the following:

- regulation of stomata closure – role not well defined, produced in roots and accumulates in leaf tissues when plants suffer water stress
- regulate dormancy in some seeds

(Arteca 1996; Salisbury and Ross, 1992)

Abscisic acid has been related to the transduction pathway to jasmonic acid. Production of ABA as a response to stresses as drought and wind have been related to SAR induction.

### **3.1.6. Other Plant Growth Regulators**

#### **3.1.6.1. Brassinosteroids**

These compounds are named after the first one identified, brassinolide, which was found in the Brassicaceae family in mustard pollen. These occur throughout all tissues, and their absence results in abnormal plant growth and development. They play important roles in multiple plant developmental processes. Some of their functions include the following:

- stimulation of stem elongation
- inhibition of root growth and development
- promotion of stem elongation and increase tissue sensitivity to auxin
- stimulation of ethylene biosynthesis and epinasty

(Arteca 1996; Salisbury and Ross, 1992, Westbridge Research Group, 1998)

Brassinosteroids use has been reported yielding enhanced resistance of tobacco, cucumber, and tomato to viral and fungal pathogens (Roth, Friebe, and Schnabl, 2000)

#### **3.1.6.2. Jasmonic Acid (Jasmonates)**

Jasmonate and its methyl ester represent Jasmonates. First isolated from jasmine plants. Jasmonates have a number of functions in plants such as the following:

- slow plant growth
- inhibition of several process such as growth and germination
- promotion of abscission, senescence, fruit formation, fruit ripening, and pigment formation
- promotes stomata opening and tendril coiling
- promote plant defense by inducing proteinase synthesis

(Arteca 1996; Salisbury and Ross, 1992; Sticher et al, 1997, Westbridge Research Group, 1998)

Jasmonic acid and its methyl ester are now well established as signals in plant defense responses. It is also related to tuber formation and controls both storage of carbohydrates and plant defense responses. They play an important role in Induced Systemic Resistance (ISR) in plants(Sticher et al, 1997).

#### **3.1.6.3. Salicylates**

Recognized by the functioning of the salicylic acid (synthesized from the amino acid phenylalanine) as promoter of resistance to some plant pathogens. Some of its most important functions in plants are the following:

- participate in signal transduction pathway of SAR and Local Acquired Resistance (LAR) of plants.
- stimulates plant pathogenesis protein production
- enhance longevity of flowers and inhibit ethylene biosynthesis
- inhibit seed germination
- blocks wound response
- reverses the effects of ABA

(Arteca 1996; Salisbury and Ross, 1992)

Salicylic acid is one of the most important PGRs in promoting resistance induction in plants.

#### **3.1.6.4. Oligosacharins**

Not well defined as a CGR yet. Few functions known but they are involved in pathogen and herbivore defense, as well as regulation of growth, cell differentiation, and flower development. (Arteca 1996)

In summary, several different agents propagate stress-related signals. Buchanan, Gruissem, and Jones (2000) indicated that in some cases, these signal transduction events involves at least one of the five traditional families of plant hormones: abscisic acid, auxins, cytokinins, ethylene, and gibberellins. Also, calcium is related as a second messenger in many stress responses. There is now evidence that both the traditional and new families of PGR's are involved in signal transduction events and other processes related to biotic and abiotic plant stress factors.

#### **4. CONCLUSIONS**

Plants are constantly under the influence of biotic and abiotic factors, which may cause stress. They suffer pathogens and pest attack in the environment and in most cases launch successful defense mechanisms to prevent disease and stress negative effects. A variety of commercial products are now available to help crops better tolerate plant stress and induce resistance to subsequent infections by plant pathogens when applied exogenously to plants and/or soil. Some of these products contain microorganisms, components of microorganisms or plants and other have been chemically developed. Thus, these are very important options to obtain sustainable yields and help to accomplish durable crop protection alternatives for the currently used chemical control measures, which often have unwanted side effects.

Plant growth regulators and soil microorganisms – related or derived products are now more and more available and affordable to growers around world.

There may be side effects on certain growth or yield characteristics from some of these compounds (products). When planning on commercial application of PGRs, it is critical to take into account the type of crop, stage of development, environmental conditions, the type of PGR and concentration, and the presence of other hormones and related products in the agro ecosystem (Westbridge Research Group, 1998).

Soil and PGRs ("hard workers and stress relievers") are real viable options in modern crop production. However, research in a broader variety of crops is needed to better understand and utilize its potential to stimulate plant growth, reduce crop stress and increase crop productivity.

#### **5. REFERENCES**

- Arteca, R. (1996).** Plant Growth Substances: Principles and Applications. New York: Chapman & Hall.
- Bokshi, A. and J. Jobling. 2000.** Enhancing the natural disease resistance of potatoes. Fruit and vegetables. Melbourne, Australia 11(6):46.

- Buchanan B, W. Gruijsem, and R. Jones. 2000.** Biochemistry and molecular biology of plants. American society of plant biologist's publications.
- Chock, M., C. Orellana, J. Lainfiesta, and R.A. Ortiz. 2000.** Crop growth regulators for stress management in bananas. Annual Meetings Abstracts: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America. Minneapolis, MN., U.S.A. p. 117.
- Cubero H, A. Duarte, and R.A. Ortiz. 2001.** Efecto de la aplicación de Symbex a pulpa de naranja (*Citrus sinensis*) en diferentes estados de descomposición. Manuscrito. Upala, Costa Rica. 17p.
- Higa T. 1991.** Effective microorganisms: A biotechnology for mankind. P 8-14. In J.F. Parr, S.B. Hornick, and C.E. Whitman (eds.) Proceedings of the first international conference on Kyusei nature farming. U.S. Department of Agriculture, Washington, D.C., USA.
- Higa T. and J.F. Parr. 1994.** Beneficial and effective microorganisms for a sustainable agriculture and environment. International nature farming research center. Atami, Japan. 20p.
- Madigan M.T., J. Martinko, and J. Parker. 1999.** Biology of microorganisms. Eight edition. Prentice Hall, Inc. U.S.A.
- Orozco, C., M. Soto, R.A. Ortiz, and G. Maturana. 2001.** Gibberellins effect on banana crop stress control in Costa Rica. Charlotte, NC., U.S.A.
- Orozco C., R.A. Ortiz, and M. Soto. 2001.** Cytokinins effect on banana crop stress control in Costa Rica. Charlotte, NC., U.S.A
- Ortiz, R.A. 2000a.** Presente y futuro del uso de reguladores de crecimiento en el cultivo de banano (*Musa spp*). XIV Reunión de la Asociación para la Cooperación en Investigación de Banano en el Caribe y en América Tropical. San Juan, Puerto Rico.
- Ortiz, R.A. 2000b.** Modern banana technology in the tropics. Annual Meetings Abstracts: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America. Minneapolis, MN., U.S.A. p. 57.
- Ortiz, R.A. 2000c.** Use of biostimulators in banana nutrition. Annual Meetings Abstracts: American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, and Soil Science Society of America. Minneapolis, MN., U.S.A. p. 274.
- Roth U, A. Friebe, and H. Schnabl. 2000.** Resistance induction in plants by a brassinosteroid-containing extract of *Lycchnis viscaria* L.
- Salisbury, F. B., and C.W. Ross. (1992).** Plant Physiology. Belmont, CA: Wadsworth. pp. 357-407, 531-548.

- Segura, A. and R.A. Ortiz. 1998.** Cytokinins application in banana production. 16th International Conference on Plant Growth Substances. Makuhari Messe, Chiba. Japan. P. 163.
- Sticher, L. et al. 1997.** Systemic acquired resistance. Annual review of phytopathology. 35:235-270.
- University of Hawaii. 2000.** Undergraduate courses notes. <http://www2.ctahr.hawaii.edu/tpps/academics/undergraduate/courses/tpps200/growthdevel.htm>.
- Vallad, G.E., A.G. Stone, R.M. Goodman, W.R. Stevenson, and L.R. Cooperband. 2000.** Paper mill sludge and compost effects on disease incidences in a vegetable rotation. University of Wisconsin – Madison. [alfi.soils.usc.edu](http://alfi.soils.usc.edu)
- Van Loon L.C., P.A. Bakker, and C.M. J. Pierce. 1998.** Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annu. Rev. Phytopathol. 36:453-83.
- Westbridge Research Group. 1998.** Plant growth regulators and plant hormones. Technical bulletin. CA, U.S.A. p. 1-2.

# MEJORAMIENTO BIOLÓGICO DE VITROPLANTAS DE BANANO MEDIANTE LA UTILIZACIÓN DE HONGOS ENDOFITICOS PARA EL CONTROL DEL NEMATODO BARRENADOR (*RADOPHOLUS SIMILIS*)

Luis Pocasangre

Laboratorio de Nematología,  
Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE)  
Turrialba, 7170, Costa Rica  
e-mail: Lpoca@catie.ac.cr

**CATIE**



## RESUMEN

El control convencional de nematodos en plantaciones comerciales de banano y plátano, consiste en dos a tres aplicaciones de nematocidas por ciclo del cultivo. Este método de control es poco eficiente y altamente costoso. Actualmente existe interés por buscar alternativas de control de nematodos que sean menos contaminantes del ambiente y de menor costo para el productor. El presente trabajo plantea una nueva metodología de manejo de nematodos que consiste en el mejoramiento de sanidad de la planta mediante la utilización de hongos endofíticos mutualista. Resultados de bioensayos en condiciones de invernadero demuestran que vitroplantas de banano protegidas con hongos endofíticos presentan menores poblaciones de *Radopholus similis* en el sistema radical y a su vez tienen mayor crecimiento foliar y radical que plantas no protegidas. El potencial de la implementación de esta metodología en un sistema de producción comercial, mediante la protección temprana de vitroplantas es discutida en el presente trabajo.

## INTRODUCCION

Esta completamente establecido que los nematodos fitoparasitos son la plaga más importante que ataca el sistema radical del cultivo de banano y plátano en los trópicos y subtropicos (Gowen y Quénéhervé, 1990; Bridge, 1993; Jeger *et al.*, 1996; Fogian y Gowen, 1997). El nematodo barrenador *Radopholus similis* es el nematodo más destructivo en las zonas productoras de Centroamérica y el Caribe (Tarté *et al.* 1981; Pinochet, 1986 ). Perdidas económicas que oscilan entre 30 a 50 % han sido reportadas en Costa Rica y Panamá (Davide, 1996).

Estudios sobre las interacciones de los nematodos y la microflora benéfica que colonizan las raíces del banano y el plátano ha sido poco estudiada. En la rizosfera cohabitan poblaciones de hongos y bacteria que condicionan la dinámica de poblaciones de los nematodos en el sistema radical (Sikora, 1992). Hongos que colonizan los tejidos y órganos internos de las raíces de una planta sin causar ningún síntoma o alteración aparente se denominan hongos endofíticos (Carroll, 1990; Boddy y Griffith, 1989; Yates, *et al.*, 1997). Cuando la colonización de estos tejidos confiere una protección a la planta contra el ataque de agentes bióticos y abióticos se denominan hongos endofíticos mutualistas (Clay, 1988; Carroll, 1990; Latch, 1993). La presencia y aislamiento de hongos endofítico en plantas de banano ha sido reportado por varios

autores en varios países (Speijer, 1993; Amin, 1994; Schuster *et al.*, 1995; Griesbach, 1999; Pocasangre *et al.*, 2000 ).

Actualmente, la mayoría de las plantaciones comerciales de banano están siendo sembradas con plantas provenientes de cultivo de tejidos. Sin embargo, este material de siembra es mas susceptible que los cormos al ataque de nematodos y al Mal de Panamá causado por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (De Waele *et al.* 1998; Smith *et al.*, 1988). Posiblemente una de las razones que explican la mayor susceptibilidad de las vitroplantas se debe al hecho que han sido propagadas en condiciones asépticas en el laboratorio, por lo tanto están libres de hongos endofíticos que son responsables de diferentes niveles de biocontrol en los cormos. Consecuente el propósito de este trabajo es presentar una metodología practica de mejoramiento de la resistencia de las vitroplantas al ataque de patógenos mediante la protección temprana de vitroplantas con hongos endofíticos biocontroladores de nematodos y que a su vez promueven el crecimiento de las vitroplantas.

## MATERIALES Y METODOS

### Aislamiento de hongos endofíticos

El método de aislamiento consistió en el protocolo de desinfección superficial de tejidos de raíces y cormos descrito por Pocasangre *et al.* 2000. Segmentos de aproximadamente 1 cm de longitud de tejidos internos de raíces y cormos fueron sumergidos en una solución a 15 % de hipoclorito de sodio por 5 minutos y posteriormente los segmentos fueron cultivados en PDA 10%. Tres días después del cultivo, crecimientos de micelio de los hongos endofíticos fueron subcultivados en PDA 100% para lograr la purificación de los aislados (Fig. 1).



Figura 1. Protocolo de aislamiento de hongos

### Poblaciones de hongos endofíticos

Los hongos endofíticos utilizados en la presente investigación corresponden a tres poblaciones: una población de Uganda, una población de Centroamérica y una población proveniente de suelos supresivos a nematodos de la finca Maya, Costa Atlántica de Guatemala.

### Inoculación de vitroplantas con hongos endofíticos

Vitroplantas del cultivar Gran Enano (AAA) de seis semanas de crecimiento en invernadero fueron inoculadas con hongos endofíticos para determinar la actividad antagonista de los biocontroladores sobre la tasa de reproducción del *R. similis* en el sistema radical. La inoculación se realizó sumergiendo el sistema radical de las vitroplantas en una suspensión de esporas del hongo de  $1.2 \times 10^6$  cfu/ ml) por 5



minutos. Posteriormente las plantas fueron sembradas en suelo estéril en maceteras plásticas de 1 litro de capacidad. Dos semanas posterior a la inoculación con el hongo fueron inoculadas con 500 nematodos por planta. La inoculación del nematodo se realizó con 5 ml de una solución calibrada de *R. similis* que se aplicó en tres agujeros en la base de la vitroplanta. La población final del nematodo en el sistema radical se realizó 3 meses después de la aplicación del nematodo (Fig. 2.).



Figura 2. Protocolo de protección de vitroplantas con hongos endofíticos para el control biológico de *R. similis*

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Población de hongos endofíticos de Africa

Plantas protegidas con todos los aislados endofíticos produjeron una reducción en la población final de *R. similis* en el sistema radical en comparación con plantas no protegidas. El mejor biocontrolador fue el aislado A1, el cual redujo drásticamente la población de *R. similis* hasta 77% (Tabla 1). Resultados similares fueron reportados por (Pocasangre, 2000), quien encontró que el aislado A1 reduce la población de *R. similis* hasta en 72% y a su vez aumenta el crecimiento radical de vitroplantas tratadas. Adicionalmente, Detert (1996) encontró que el aislado endofítico A1 también promueve el crecimiento radical en el cultivar Gran Enano (AAA). Este efecto antagonista sobre *R. similis*, así como su efecto sobre la promoción de crecimiento evidencian el potencial del uso de hongos endofíticos en sistemas de micropropagación con el objeto de proteger las plantas antes de ser transplantadas en el campo definitivo.

Tabla 1. Efecto de cinco aislados endofíticos sobre la población final de *Radopholus similis* en el sistema radical de vitroplantas del cultivar Gran Enano (AAA).

Endofito	Nematodos en sistema radical	Reducción número de nematodos	Peso radical (g)	Peso foliar (g)
Control	6067 a		17.33 b	36.07 b
III 5i 4-2	Fusarium 5907 a	(-2.6%)	24.14 ab	44.13 b
III 1 a 1	Fusarium 5293 ab	(-13%)	23.80 ab	50.60 ab
III 4 Wi-2	Fusarium 4813 ab	(-21%)	24.47 ab	60.00 a
V 4 W5	Fusarium 4373 b	(-28%)	28.60 a	58.17 a
A1*	Fusarium 1373 c	(-77%)	25.37 ab	45.46 b

### Población de hongos endofíticos de Centroamérica

Los resultados del screening de 28 aislados endofíticos demuestran que existen diferentes grados de actividad antagonista sobre *R. similis* entre los aislados evaluados. El rango de reducción de la población final varió desde 0 hasta 90% (Tabla 2.). Tres aislados endofíticos (11%) produjeron una reducción en la población final de *R. similis* superior al 90%. Estudios posteriores con estos hongos endofíticos elite ratificaron la consistencia del biocontrol; encontrándose reducciones en la población final de *R. similis* en el sistema radical hasta de 90% (Tabla 3). Pocasangre (2000) encontró

**Tabla 2.** Clases de actividad antagonista de 28 aislados endofíticos sobre la población final de *Radopholus similis* en el sistema radical de vitroplantas del cultivar Gran Enano (AAA).

Clases de actividad (%)	Número de aislados	Número de aislados
No efecto	2	7
<30%	7	25
30-50%	3	11
50-70%	5	18
71-90%	8	28
>90%	3	11
Total	28	100

**Tabla 3.** Efecto de seis aislados endofíticos sobre la población final de *Radopholus similis* en el sistema radical de vitroplantas del cultivar Gran Enano (AAA).

Código del aislado	Género	Nematodos en sistema radical	Reducción número de nematodos	Peso radical (g)
Control	Control	1566 a		7.54 ns
A 1	<i>F. oxysporum</i>	619 b	(-60%)	9.48 ns
H-19	<i>Fusarium spp.</i>	422 bc	(-73%)	9.44 ns
V5W2	<i>F. oxysporum</i>	363 cd	(-77%)	9.84 ns
H-20,	<i>Fusarium spp.</i>	222 de	(-86%)	9.27 ns
C-13	<i>Fusarium spp.</i>	181 e	(-88%)	9.53 ns
H-26	<i>Fusarium spp.</i>	156 e	(-90%)	9.29 ns

**Tabla 4.** Efecto de seis aislados endofíticos sobre el crecimiento del sistema radical y foliar de vitroplantas del cultivar Gran Enano (AAA).

Endofito	Peso foliar (g)	Peso radical (g)	Longitud radical (m)
C-13	17.53 a	9.77 a	15.71 bcd
H-26	16.02 ab	8.67 abc	22.54 a
V5W2	15.02 abc	7.07 dc	11.78 cde
A1 *	15.01 abc	9.10 ab	19.85 ab
H-19	14.17 bc	7.51 bcd	17.67 abc
H-20	14.01 bc	7.55 bcd	10.87 de
Control	12.33 c	6.44 d	8.42 e

que esta alta actividad antagonista, se debe a que el hongo endofítico reduce drásticamente la penetración del nematodo en el sistema radical. Adicionalmente, Niere (2001) encontró que el biocontrol de hongos endofíticos sobre *R. similis* en banano se debe a una reducción significativa en el número de hembras del nematodo en el sistema radical. Sikora (1998) considera que parte del biocontrol de los hongos endofíticos se debe al mejoramiento de la sanidad de la planta, la cual podría estar relacionada con el fenómeno de inducción de resistencia.

El efecto sobre el crecimiento radical y foliar de plantas protegidas con hongos endofíticos en ausencia de nematodos fue altamente significativo en comparación con plantas testigo (Tabla 4). Reissinger (1995) encontró que plantas de Gran Enano protegidas con hongos endofíticos presentaban más de 30% de volumen radical que plantas testigo. Este efecto promotor de crecimiento sugiere que los aislados endofíticos favorecen la absorción de nutrientes en vitroplantas protegidas.

### **Población de hongos endofíticos de suelos supresivos de Guatemala**

Los resultados demuestran que vitroplantas protegidas con todos los aislados endofíticos presentaron menores densidades poblacional de *R. similis* en el sistema radical que vitroplantas no protegidas. El rango de reducción de la población del nematodo vario entre 21 y 83 % (Tabla 5). Pruebas de parasitismo realizados con los mejores aislados endofíticos (M25, M40, M41 y M45) demostraron que tanto

*Fusarium* y *Trichoderma* son capaces de parasitar larvas de *R. similis* en 24 horas de cocultivo, lo cual podría ser uno de los principales mecanismos de control de estos aislados (Pocasangre *et al*, datos no publicados).

Por otro lado, plantas protegidas con aislados endofíticos presentaron pesos superiores del sistema radical y foliar que plantas no protegidas. Este efecto de promoción de crecimiento o mejoramiento de la sanidad de la planta podría estar relacionado con el fenómeno de inducción de resistencia. Estudios tendientes a determinar y caracterizar este fenómeno deben de ser realizados.

**Tabla 5.** Efecto de 12 aislado endofitos sobre la población final de *Radopholus similis* en el sistema radical de vitroplantas del cultivar Gran Enano (AAA).

Treatmento	Hongo	Código	Nematodos	Reducción número de nematodos	Peso radical	Peso foliar
Testigo			18,694 a		8.29 b	19.95 bc
T2	Fusarium	M50	14,707 a	(-21%)	10.77 ab	17.90 c
T3	Fusarium	M22	14,025 ab	(-25%)	11.28 ab	19.94 bc
T1	Fusarium	M30	12,931 ab	(-31%)	13.34 ab	19.12 bc
T4	Fusarium	M10	11,171 abc	(-40%)	10.29 ab	22.73 abc
T10	Trichoderma	M20	7,890 bcd	(-58%)	14.47 a	28.25 a
T9	Fusarium	M49	7417 dc	(-60%)	14.20 a	26.28 ab
T7	Fusarium	M6	6764 dc	(-64%)	10.28 ab	25.37 ab
T8	Fusarium	M12	6601 dc	(-65%)	12.39 a	25.23 ab
T5	Fusarium	M40	5,505 de	(-71%)	13.54 ab	27.47 ab
T11	Trichoderma	M45	4,856 de	(-74%)	14.81 a	27.64 ab
T6	Fusarium	M25	4,793 de	(-74%)	14.11 a	28.30 a
T12	Trichoderma	M41	3,271 e	(-83%)	13.99 a	24.87 ab
TA					12.59 ab	26.49 ab

Peso radical: el peso fresco del sistema radical al momento de la evaluación

Peso foliar: comprende el peso del cormo,seudotallo y hojas de las plantas

Para todas las variables: letras iguales en la misma columna no existe diferencia significativa de acuerdo a Tukey (P <0.05).

## CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo demuestran que vitroplantas protegidas con aislados endofíticos reducen significativamente la población final de *R. similis* en el sistema radical en comparación con plantas no protegidas. Por otra parte, los aislados endofíticos tienen un efecto positivo en la promoción de crecimiento de las vitroplantas, lo cual representa un beneficio adicional de los biocontroladores.

Finalmente, la metodología de manejo de nematodos descrita aquí, representa una nueva alternativa de manejo de *R. similis* basada en el mejoramiento de la sanidad de l material de siembra: vitroplantas, retoños o cormos. Adicionalmente esta metodología puede ser aplicada fácilmente en un sistema de cultivo comercial de banano y plátano. Sin embargo estudios en condiciones de campo son necesaria para conocer la durabilidad de la protección de la plantas al ataque de nematodos, así como su efecto sobre el crecimiento de la planta.

## REFERENCIAS

- Amin, N. 1994.** Untersuchungen über die Bedeutung endophytischer Pilze für die biologische Bekämpfung des wandernden Endoparasiten *Radopholus similis* (Cobb) Thorne an Bananen. Ph.D. Thesis, University of Bonn, 112 pp.
- Boddy, L. y G.S. Griffith 1989.** Role of endophytes and latent invasion in the development of decay communities in sapwood of angiospermous trees. *Sydowia* 41: 41-73.
- Bridge, J. 1993.** Worldwide distribution of the major nematode parasites of banana and plantain. In biological and integrated control of highland banana and plantain pest and diseases. (Eds. By C.S. Gold and B. Gemmill). Cotonou, Benin. Pp:185-198.
- Carroll, G.C. 1990.** Fungal endophytes in vascular plants: Mycological research opportunities in Japan. *Trans. Mycol. Soc. Japan*, 31:103-116.
- Clay, K. 1988.** Fungal endophytes of grasses: A defensive mutualism between plant and fungi. *Ecology*, 69: 2-9.
- Davide, R.G. 1996.** Overview of nematodes as a limiting factor in *Musa* production. In : New frontiers in resistance breeding for nematode, *Fusarium* and Sigatoka. Eds. Frison, E.A.; Horry, J.P.; De Waele, D. INIBAP, Montpellier France., pp. 27-31.
- Detert, M. E. 1996.** Untersuchungen zu Applikationsverfahren für endophytische Pilze zur biologischen Bekämpfung von *Radopholus similis* (Cobb) Thorne an Bananen. Diplomarbeit, University of Bonn. 101 p.
- Fogain, R. y Gowen, S.R. 1997.** Damage to roots of *Musa* cultivars by *Radopholus similis* with and without protection of nematicides. *Nematropica*, 27 (1): 27-32.
- Gowen, S. y Quénehervé, P. 1990.** Nematode parasite of banana, plantain and abaca. In plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Eds. Luc, M., Sikora, R.A. and Bridge, J. CAB International. 431-460.
- Griesbach, M., Gold, C.S., Speijer, P.R., Schuster, R-P. y Sikora, R.A. 1999.** A new strategy for biological control of the banana weevil (*Cosmopolites sordidus* Germar) in East Africa. In *Fruit Production in the Tropics and Subtropics*, Bonn, Germany. (Abstracts) pp 27
- Hallmann, J. y Sikora, R.A. 1995.** Influence of *Fusarium oxysporum*, a mutualistic fungal endophyte, on *Meloidogyne incognita* infection of tomato. *Journal of Plant Disease and Protection*, 101(5):475-481.
- Jeger, M.J. Waller, J.M. Johanson. A y Gowen, S.R. 1996.** Monitoring in banana pest management. *Crop Protection*, 15 ( 4): 391-397.

- Latch, G.C.M. 1993.** Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts. Biotic stress tolerance imparted to grasses by endophytes. *Agriculture, Ecosystems and Environments*, 44:143-156.
- Niere, B.I. 2001.** Significance of non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* Schlecht.: Fries for the biological control of the burrowing nematode *Radopholus similis* (Cobb) Thorne on tissue cultured banana. Ph. D. Tesis. Universidad de Bonn., Alemania 118 p.
- Pinochet, J. 1986.** A note on nematode control practice on bananas in Central America. *Nematropica*, 16 (2):197-203.
- Pocasangre, L., Sikora, R.A., Villch, V. y Schuster, R-P. 2000.** Survey of banana endophytic fungi from Central America and screening for biological control of *Radopholus similis*. *Acta Horticulturae*, 531: 283-289..
- Pocasangre, L. 2000.** Biological enhancement of banana tissue culture plantlets with endophytic fungi for the control of the burrowing nematode *Radopholus similis* and the Panama disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*). Ph. D. Tesis. Universidad de Bonn, Alemania. 95 p.
- Reilssinger, A. 1995.** Untersuchungen zur Wirkung endophytischer Pilze aus Bananenwurzeln auf *Radopholus similis*. Diplomarbeit, University of Bonn. 76 p.
- Schuster, R.-P., Sikora, R.A y Amin, N. 1995.** Potential of endophytic fungi for the biological control of plant parasitic nematodes. *Med. Fac. Landbouww. University of Gent*, 60/ 3b. 1947-1952.
- Sikora, R.A. 1992.** Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for biological control of plant parasitic nematodes. *Annu. Rev. Phytopathology*, 30:245-270.
- Sikora, R.A. y Schuster, R. P. 1998.** Novel approaches to nematode IPM. *In. Mobilizing IPM Sustainable Banana Production in Africa*. Eds. Frison, E.A.; Gold, C. S; Karamura, E. B. and Sikora, R.A.. INIBAP, Montpellier, France, pp. 127-136.
- Speijer, P.R. 1993.** Interrelationships between *Pratylenchus goodeyi* Sher y Allen of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Schl. Emd. Syd. y Hans. In roots of two banana cultivars. Ph. D. Thesis, University of Bonn, 200 pp.
- Tarté, R. Pinochet, J.C., Gabrielli, C. y Ventura, O. 1981.** Differences in population increase, host preferences and frequency of morphological variants among isolates of the banana Race of *Radopholus similis*. *Nematropica*, 11: 43-52.
- Yates, I.E., Bacon, C.W. y Hinton, D.M. 1997.** Effects of endophytic infection by *Fusarium moniliforme* on corn growth and cellular morphology. *Plant Diseases* 81:723-728.

# USO POTENCIAL DE HONGOS MICORRÍVICOS PARA EL CONTROL DE PATÓGENOS DE RAÍZ

M.C. Jaízme-Vega y A. S. Rodríguez-Romero  
Departamento de Protección Vegetal, ICIA, Apdo. 38200,  
La Laguna, Tenerife, Islas Canarias  
e-mail: mcjaizme@icia.es

CATIE



## 1. INTRODUCCION

Las micorrizas arbusculares (MA), simbiosis mutualística entre los hongos formadores de MA y la casi mayoría de las plantas presentes en los ecosistemas terrestres, constituyen la asociación simbiótica más generalizada. Se pueden encontrar en casi todos los sistemas ecológicos, desde comunidades con alta densidad de especies a sistemas agrícolas con prácticas culturales sostenibles.

En una relación 'planta-hongo MA' bien establecida, se pueden distinguir dos fases diferentes de desarrollos del hongo: una interna, formada por el micelio fúngico colonizando biotroficamente la corteza de la raíz, en íntima asociación con las células radicales (micelio interno) y una externa formada por el micelio extramatricial del hongo a través del suelo (micelio externo). Este micelio ayuda a la planta a adquirir nutrientes minerales del suelo, actuando como un puente que conecta la planta con el suelo, interactuando con los componentes del suelo y con la población microbiana rizosférica (Barea et al. 1997).

Las dos fases del hongo MA muestran importantes diferencias a nivel metabólico y fisiológico. Estas consideraciones son importantes para intentar determinar el papel de las micorrizas como protectoras de las plantas frente al ataque de patógenos de suelo. Este rol se deriva tanto de su actuación como raíces modificadas, como de su actividad como microorganismo capaz de interactuar con otros microorganismos del suelo y alterar la población microbiana de la rizosfera (Azcón-Aguilar et al. 2001).

## 2. Papel de las micorrizas en el sistema planta-patógeno

La mayoría de las publicaciones sobre este tema, destacan la capacidad de las micorrizas para reducir los daños producidos por los patógenos de suelo. Los estudios realizados se han orientado en su mayoría a patógenos de origen fúngico causantes de podredumbres de raíz y daños vasculares (*Phytophthora*, *Aphanomyces*, *Fusarium*, *Verticillium*, *Sclerotium*) (Hooker et al. 1994; Azcón-Aguilar y Barea 1996) y nematodos patógenos que causan agallas y lesiones en las raíces (*Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Radopholus*) (Pinochet et al. 1996; Jaízme-Vega et al. 1997; Jaízme-Vega y Pinochet 1997). Son escasos los estudios sobre las micorrizas y las bacterias patógenas, aunque los pocos datos que existen muestran una protección micorrícica frente a *Erwinia carotovora* y *Pseudomonas syringae* en tomate (García-Garrido y Ocampo, 1988 y 1989). A pesar de los datos publicados, donde se muestra un efecto protector de la

micorriza en diferentes hospedadores y frente a patógenos de diferente naturaleza, no se puede generalizar ni extrapolar esta información, ya que para cada caso existen una serie de factores cuya alteración no garantizaría el balance final. Esto es consecuencia, además, del conocimiento parcial de los mecanismos relacionados con el efecto protector de las micorrizas. En cualquier sistema complejo en el cual estudiásemos la interacción planta-hongo MA-microorganismos patógeno, hemos de considerar una serie de factores que contribuyen a la expresión final de control de los hongos MA sobre el patógeno, entre dichos factores están: tipo de aislado de hongo MA, virulencia y cantidad de inóculo del patógeno, planta hospedadora, sustrato de cultivo, condiciones ambientales.

En general, se acepta que solo una micorrización extensamente desarrollada y previa al ataque del patógeno, es capaz de incrementar la resistencia/tolerancia y compensar, por lo tanto, los daños causados a la planta (Cordier *et al.* 1996 y Slezack *et al.* 2000). Sin embargo, en otros trabajos donde se comparaba la efectividad de varios aislados de micorriza frente a un ataque de nematodos, no se encontró relación entre la extensión de la colonización y la protección (Pinochet *et al.* 1996). En otros estudios realizados con plataneras micorrizadas y *Meloidogyne*, se comprobó que después de un largo periodo de convivencia en la raíz, la reproducción del nematodo se ve negativamente afectada, mientras la colonización micorrizica permanece inalterable (Jaizme-Vega *et al.* 1997).

Los mecanismos responsables de la reducción de nematodos mediante la simbiosis son hasta ahora desconocidos, pero podrían relacionarse con cambios fisiológicos en la raíz que la hacen desfavorable como fuente de alimentación para los nematodos o una simple competición por el espacio (Hussey y Roncadori 1982).

### **3. Mecanismos relacionados con la protección frente a patógenos**

La protección que las micorrizas confieren a las plantas frente a un ataque de patógenos es probablemente punto de la interacción de varios mecanismos. Algunos de estos son:

#### **Mejora de la nutrición y compensación de daños**

Tanto un incremento en el estatus nutricional como un aumento en la biomasa radical pueden compensar los daños producidos por patógenos de suelo en los tejidos radicales, reduciendo por lo tanto, los síntomas. Este mecanismo puede explicar el éxito de la interacción platanera-*Glomus intraradices* y *Glomus spp.-Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (Jaizme-Vega *et al.* 1997) sin descartar por ello la existencia de otros mecanismos específicos.

#### **Competencia por productos de la fotosíntesis y lugares de colonización**

Ambos microorganismos (simbiótico y patógeno) dependen de los fotosintatos para su desarrollo, por lo tanto, una situación de competencia puede ser la causa de una depresión del patógeno en plantas micorrizadas. En el caso concreto de los nematodos, se ha sugerido que necesitan nutrientes del hospedador para su reproducción y desarrollo (Smith 1988). Hasta el momento, esta posibilidad tiene solo rango de hipótesis, ya que no se han registrado evidencias claras al respecto.

Sí que las hay en el supuesto de una competición por el nicho ecológico, ya que hay estudios (Cordier *et al.* 1996 y 1998) en los que se comprueba la no-colonización por un patógeno de origen fúngico, de aquellas células en cuyo interior se hubiera desarrollado un arbúsculo del hongo MA.

### **Cambios en la anatomía y arquitectura radical**

Está comprobado que los hongos formadores de micorrizas producen cambios en la morfología y topología del sistema radical (Berta *et al.*, 1995) y que estas transformaciones son perceptibles en el caso concreto de la platanera, y consisten en una reducción de la longitud media de las raíces adventicias y un mayor número de raíces de primer y segundo orden, con el consecuente aumento de la ramificación (Jaizme-Vega *et al.* 1995).

A nivel estrictamente morfológico, Dehne (1982) demostró un incremento en la lignificación de las células de la endodermis de raíces de tomate y pepino micorrizadas, admitiendo la posibilidad que dicha respuesta redujera el ataque de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

### **Cambios microbianos de la rizosfera**

Una micorrización activa modifica los exudados radicales y el pH del suelo (Bago y Azcón-Aguilar 1997). Como consecuencia se produce una selección de microorganismos rizosféricos en las raíces de las plantas micorrizadas (Linderman y Paulitz 1990). Estos microorganismos pueden exhibir una actividad antagonista contra los patógenos de suelo, protegiendo indirectamente a la planta hospedadora (Filion *et al.* 1999).

En estudios realizados en condiciones axénicas en ausencia de la raíz, se observó un efecto directo del hongo MA sobre el crecimiento de (St-Arnaud *et al.* 1995).

Por otro lado, microorganismos rizosféricos tales como las bacterias promotoras del crecimiento (PGPRs) con demostrado carácter antifúngico frente a hongos patógenos no ejercen efecto negativo, o incluso, estimulan la colonización micorrícica (Barea *et al.* 1998; Jaizme-Vega *et al.* 2000).

### **Cambios en los constituyentes químicos de los tejidos vegetales**

Se han registrado cambios fisiológicos relacionados con la presencia de patógenos de suelo en raíces micorrizadas. Dehne *et al.* (1978) demostró un incremento en las concentraciones de quitinasas y una acumulación de arginina en raíces supresoras de *Thielaviopsis*.

Más recientemente, Morandi *et al.* (1984) relacionó un incremento de isoflavonoides con una determinada resistencia a nematodos en raíces de soja.

Los hongos MA producen elicitores capaces de inducir respuestas de defensa en las plantas, como lo demuestra la resistencia inducida por hongos MA en plantas no micotróficas o líneas mutantes incapaces de establecer la simbiosis (Gollote *et al.* 1993).

La información más actual apunta hacia la obtención de un cierto nivel de bioprotección mediante la actuación previa de las respuestas defensivas de la planta. Se han relacionado con esto ciertas enzimas quitinolíticas (Slezack *et al.* 2000) y  $\beta$ -1-3-glucanólíticas (Pozo *et al.* 1999).

A pesar de estos avances, queda aún mucho por demostrar, ya que la mayoría de estas determinaciones han sido realizadas en condiciones axénicas.



#### **4. Aplicaciones de las micorrizas en protección vegetal**

Considerando que la mayoría de la información en este tema se ha obtenido bajo condiciones de laboratorio y experimentales, es necesario evaluar las posibilidades de incluir la tecnología de las micorrizas como una estrategia de control biológico en sistemas de producción vegetal. Este propósito cuenta con la dificultad de que el número de variables a considerar, trabajando a escala comercial, desvirtúa totalmente los resultados previos.

Por lo tanto, creemos necesario generar una serie de informaciones en condiciones reales de cultivo, objetivo que se puede lograr mediante estudios de las relaciones "hongo MA-patógeno-cultivo-condiciones ambientales". En este aspecto, no se dispone de mucha documentación (Azcón-Aguilar et al. 2001), y serían necesarios trabajos coordinados entre patólogos y "micorrizólogos".

Se ha demostrado para sistemas hortícolas y frutícolas de interés comercial, platanera-*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense-Glomus mosseae* (Jaizme-Vega y Rodríguez-Romero 2001), platanera-*Pratylenchus goodeyi-Glomus manihotis* (Jaizme-Vega y Rodríguez-Romero 2001), papaya-*Meloidogyne incognita-Glomus mosseae* y *Glomus manihotis* (Jaizme-Vega et al. 2000) y tomate-*Meloidogyne incognita-Glomus mosseae* y *Glomus manihotis* (Jaizme-Vega et al. 2001), los efectos protectores de una micorrización temprana, previa al ataque del patógeno, sobre el desarrollo del cultivo en condiciones muy cercanas a las empleadas en los sistemas de producción vegetal. La misma eficacia ha sido demostrada incluso en suelos infectados de replante (Utkhedde y Smith 2000; Calvet et al. 2000).

Ante la tendencia mundial de limitar el empleo de productos químicos de síntesis y evitar el impacto ambiental que su uso produce en agricultura intensiva, surge la necesidad de arbitrar alternativas de control basadas en estrategias sostenibles o respetuosas con el medio. Algunas de estas propuestas podrían estar basadas en la combinación de micorrizas y prácticas no-químicas, como son la aplicación de antagonistas microbianos, solarización, etc.

A modo de conclusión, podemos decir que a pesar de lo expuesto, la explotación racional de estos hongos MA en la protección de los cultivos, necesita más progresos en cuanto a la investigación de los mecanismos de acción y el desarrollo de tecnologías para la aplicación de inóculos eficientes. Combinar ambas estrategias, básicas y aplicadas, puede ser la base para futura aplicación masiva de estos inóculos en sistemas basados en prácticas sostenibles.

## 5. Referencias bibliográficas

- AZCÓN-AGUILAR, C. y BAREA, J.M. 1996.** Arbuscular mycorrhizas and biological control of soil-borne plant pathogens. An overview of the mechanisms involved. *Mycorrhiza* 6:457-464.
- AZCÓN-AGUILAR, C., JAIZME-VEGA, M.C. y CALVET, C. 2001.** The contribution of arbuscular mycorrhizal fungi to the biological control of soilborne plant pathogens. In: "Mycorrhiza technology: From Genes to Bioproducts-Achievements and Hurdles in Arbuscular Mycorrhizal Research". Ed: Hannes Schüepp. Life Sciences Editorial Department, Birkhäuser Verlag AG, Basel, Switzerland.
- BAGO, B. y AZCÓN-AGUILAR, C. 1997.** Changes in the rhizospheric pH induced by arbuscular mycorrhiza formation in onion (*Allium cepa* L.). *Z Pflanzenernähr Bodenk* 160:333-339.
- BAREA, J.M., AZCÓN-AGUILAR, C. y AZCÓN, R. 1997.** Interactions between mycorrhizal fungi and rhizosphere microorganisms within the context of sustainable soil-plant systems. In: Gange AC, Brown VK (eds) *Multitrophic interactions in terrestrial systems*. Blackwell Science, Oxford, pp 65-77.
- BAREA, J.M., ANDRADE, G., BIANCIOTTO, V., DOWLING, D., LOHRKE, S., BONFANTE, P., O'GARA, F. y AZCÓN-AGUILAR, C. 1998.** Impact on arbuscular mycorrhiza formation of *Pseudomonas* strains used as inoculants for the biocontrol of soil-borne plant fungal pathogens. *Applied Environmental Microbiology* 64:2304-2307.
- BERTA, G., TROTTA, A., FUSCONI, A., HOOKER, J.E., MUNRO, M., ATKINSON, D., GIOVANNETTI, M., MORINI, S., FORTUNA, P., TISSERANT, B., GIANINAZZI-PEARSON, V. y GIANINAZZI, S. 1995.** Arbuscular mycorrhizal induced changes to plant growth and root system morphology in *Prunus cerasifera*. *Tree Physiology* 15: 281-293.
- CALVET, C., PINOCHET, J., HERNÁNDEZ-DORREGO, A., ESTAÚN, V. y CAMPRUBÍ, A. 2000.** Field microplot performance of the peach-almond hybrid GF-677 after inoculation with arbuscular mycorrhizal fungi in a replant soil infested with root-knot nematodes. *Mycorrhiza* 10: 295-300.
- CORDIER, C., GIANINAZZI, S. y GIANINAZZI-PEARSON, V. 1996.** Colonisation patterns of root tissues by *Phytophthora nicotianae* var *parasitica* related to reduced disease in mycorrhizal tomato. *Plant Soil* 185:223-232.
- CORDIER, C., POZO, M.J., BAREA, J.M., GIANINAZZI, S. y GIANINAZZI-PEARSON, V. 1998.** Cell defense responses associated with localized and systemic resistance to *Phytophthora parasitica* induced in tomato by an arbuscular-mycorrhizal fungus. *Molecular Plant-Microbe Interaction* 11:1017-1028.
- DEHNE, H.W., SCHONBECK, F. y BALTRUSCHAT, H. 1978.** Untersuchungen zum Einfluss der endotrophen Mycorrhiza auf Pflanzenkrankheiten. 3. Chitinase-aktivität und Ornithinzyklus. (The influence of endotrophic mycorrhiza on plant diseases. 3. Chitinase-activity and ornithine-cycle). *Z. Pflanzenernähr Bodenk* 85:666-678.

- DEHNE, H. W. 1982.** Interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi and plant pathogens. *Phytopathology* 72:1115-1119.
- FILION, M., ST-ARNAUD, M. y FORTIN, J.A. 1999.** Direct interaction between the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus intraradices* and different rhizosphere microorganisms. *New Phytologist* 141:525-533.
- GARCÍA-GARRIDO, J.M. y OCAMPO, J.A. 1988.** Interaction between *Glomus mosseae* and *Erwinia carotovora* and its effects on the growth of tomato plants. *New Phytologist* 110:551-555.
- GARCÍA-GARRIDO, J.M. y OCAMPO, J.A. 1989.** Effect of VA mycorrhizal infection of tomato on damage caused by *Pseudomonas syringae*. *Soil Biology and Biochemistry* 21:165-167.
- GOLLOTTE, A., GIANINAZZI-PEARSON, V., GIOVANNETTI, M., SBRANA, C., AVIO, L. y GIANINAZZI, S. 1993.** Cellular localization and cytochemical probing of resistance reactions to arbuscular mycorrhizal fungi in a 'locus A' myc- mutant of *Pisum sativum* L. *Planta* 191:112-122.
- HOOKE, J.E., JAIZME-VEGA, M. y ATKINSON, D. 1994.** Biocontrol of plant pathogens using arbuscular mycorrhizal fungi. In Gianinazzi S, Schüepp H (eds) *Impact of Arbuscular Mycorrhizas on Sustainable Agriculture and Natural Ecosystems*. ALS, Birkhäuser Verlag, Basel, pp 191-200.
- HUSSEY, R.S. y RONCADORI, R.W. 1982.** Vesicular-arbuscular mycorrhizae may limit nematode activity and improve plant growth. *Plant Disease Report*. 66:9-14.
- JAIZME-VEGA, M.C., BERTA, G. y GIANINAZZI, S. 1995.** Effect of *Glomus intraradices* on root system morphology of micropropagated banana plants. COST Meeting, Dijon. 17-18 February.
- JAIZME-VEGA, M.C. y PINOCHET, J. 1997.** Growth response of banana to three mycorrhizal fungi in *Pratylenchus goodeyi* infested soil. *Nematropica* 27:69-76.
- JAIZME-VEGA, M.C., TENOURY, P., PINOCHET, J. y JAUMOT, M. 1997.** Interactions between the root-knot nematode *Meloidogyne incognita* and *Glomus mosseae* in banana. *Plant and Soil* 196:27-35.
- JAIZME-VEGA, M.C., SOSA HERNANDEZ, B. y HERNANDEZ HERNANDEZ, J.M. 1997.** Interaction of arbuscular mycorrhizal fungi and the soil pathogen *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* on the first stages of micropropagated Grande Naine banana. *Acta Horticulturae* N° 490 Proceeding of the First International Symposium on Banana in the Subtropics. Ed. V. Galán Saucó, ISHS.: 285-295.
- JAIZME-VEGA, M.C., BARROSO, L., RODRIGUEZ, A.S. y TENOURY, P. 2000.** Resultado de la interacción de hongos formadores de micorrizas y rizobacterias sobre la reproducción de *Meloidogyne incognita* en papaya. Resúmenes del X Congreso de la S.E.F. Valencia, 3-6 Octubre 2000.

per hectare basis when compared to field crops, whether they are produced in the field, or in protected cultivation systems.

The cost of production that ultimately leads to the need for high returns, is driven by : irrigation systems, plastic, fertilizer, as well as, labour, storage and transport costs. These factors are expensive in developed economies verses in developing economies where input costs especially labour tend to be low. The cost of production is raised due to the need for pesticides to treat the soil for nematode and disease control. In many areas of the world, pesticides for soil disinfestation are an absolute necessity, if one is to make a profit. This can be the case in both developed and in less developed economies depending on the markets targeted e. g. local versus export.

In most modern production systems, horticultural crop yield is greatly affected by the presence of soil-borne nematodes and diseases and to a lesser extent by insects and weeds. Pesticides have, in many instances, successfully kept growers affected by these problems in business. They have allowed growers to maintain acceptable market prices for over 40 years, often under heavy pest and disease pressure.

*Fumigation* and not *confusion* has been the mainstay of these producers and methyl bromide (Mbr) has been the "superman" of the product line worldwide. Mbr controls simultaneously all soil-borne calamities affecting horticultural crops. It is highly effective, works quickly, and it allows almost immediate planting after treatment. This is why growers use it now and want to continue to use it in the future. Without Mbr, they will need to use three or more pesticides before planting, to obtain give an equal level of control with all the additional costs involved.

### **The Phase-Out of Methyl Bromide**

Mbr was added to the Montreal Protocol list of ozone depleting substances in 1992. If all goes according to plan, the fumigant will be phased out in 2005 in industrialized countries and in 2015 in non-industrialized or so called Article 5 countries.

Phase-out program for methyl bromide under the Montreal Protocol in 1997 (UNEP 1998).

<b>Developed countries</b>	<b>Developing countries</b>
• 25% reduction by 1999	• Freeze by 2002 at 1995-98 level
• 50% reduction by 2001	• Review of reduction in 2003
• 70% reduction by 2003	• 20% reduction by 2005
• Phase out by 2005 except critical exemptions	• Phase out by 2015 except critical exemptions

If all Mbr user countries follow the phase-out plan, then control of soil-borne pests and diseases in the horticultural crops listed must be accomplished by alternative IPM concepts. There is a strong lobby for "Critical Use Exceptions" designed to protect these growers.

### **Do we have alternative IPM technologies in place?**

Nematologists have developed alternative control technologies to offset the loss of Mbr for IPM. It should be noted that the term IPM is often associated with optimising pesticides use in management systems. It is not necessarily a bad term, but it is a term I feel is outmoded. A new term *Biological System Management (BSM)* emphasises manipulation of the biological entities interacting in a cropping system for control. It is in my opinion a term that better describes what many consumers want from agriculture today, pesticide free food. Biological system management has been defined as:

*Management based on an understanding of the epidemiology of the major pests and/or diseases in a cropping-system and integration of this knowledge with plant resistance, biological control and manipulation of developmental biology for effective control.*

Farmers and nematologists often working together have developed a wide range of alternative control measures that alone and in combination can lead to effective control of the very important and damaging root-knot nematode group. However, for an alternative to be acceptable it must be economically acceptable to the grower not the scientist.

### **Alternative technologies**

Existing and/or potential technologies that have been or are being developed for control of root-knot nematodes in horticultural crops are listed in the table below. A short description of their status and how I see future integration follows.

<b>Cultural control based techniques</b>	<b>Biocontrol based techniques</b>
Flooding Solarization	Pasteuria penetrans, obligate parasite
Systemic nematicides	Arbuscular mycorrhizae fungi
Alternative fumigants	Mutualistic endophytic fungi
Soil-less culture	Plant Health Promoting
Steam	Rhizobacteria
Soil cultivation	Induced resistance
Organic amendments	Trap crops
Biofumigation	Resistant cultivars
Antagonistic potential	Resistant root stocks
Rotation with non-hosts	Tolerance cultivars
	Tolerant root stocks
	Green manure crops

These techniques are, in my opinion, important even though in some cases field data and/or evaluation of costs have not been made. If Mbr is banned then such criteria are not all that relevant – they can become economical very quickly under such situations.

Nematologists have developed control technologies that vary from simple straight-techniques to complex management systems or what could be called *Mutually interacting technology packages*. These methodologies, however, cannot be used on a worldwide by everyone, due to effects on control of: climate, cropping system, temperature, soil type, labour costs etc. However they will work in specific locations. This is important to agriculture as a whole and to specific grower in particular.

### **Rotation and trap crops**

Rotation with non-host crops, antagonistic plants or resistant cultivars is of course an important methodology used to control nematodes. However, in horticultural production this is often not practiced due to the intensity of production that does not allow for the extended rotations needed for effective nematode control. Trap cropping has been used on a small scale to control root-knot in some crops in subsistence agriculture. Amaranthus and night-shade are leafy vegetables consumed fresh in many parts of Africa. The plants are often removed from the soil with the root system intact after about 4-5 weeks of growth. The roots are needed to convince consumers that the plants are young and not bitter. Root removal traps root-knot nematodes in the tissue before reproduction sets in. Trap cropping can be done with any susceptible crop if costs are not a limiting factor and needs to be looked at more closely.

### **Solarization**

Heating soil with plastic mulches has been shown to reduce soil-borne pathogens, weeds and root-knot nematodes in the upper horizons of the soil. However, it is limited to countries with high radiant energy. Heat penetration into deeper soil layers has been attained by heating the water with drip irrigation systems before application under the mulch. It might be more effective in crops with shallow root systems, promoted for example by drip-irrigation. This could increase effectiveness in that the root-knot inoculum would also be near the soil surface, exposing them to higher solarization temperatures. The cost of plastic is a limiting factor in some countries and therefore this technology is mainly used in developed economies or for export crops.

### **Organic amendments**

The use of organic residues as soil amendments has been shown to increase the antagonistic potential in the ecosystem. Population densities of predacious fungi, egg pathogens and other antagonists increase dramatically. The residues of specific plants also have been shown to be even more effective in reducing nematode populations. The mechanisms of control have not always been elucidated. In most cases, reduction in nematode number is due to the toxic effects of ammonium produced by microbial degradation processes. This activity is then followed by increases in biological control activity. Chitin amendments have also been shown to increase beneficial organisms and increase nematode control. More recently, highly refined commercial amendments have entered the market. They stimulate antagonists in the rhizosphere leading to reduced nematode infection. Organic amendments may not be effective alone, but need integration in BSM systems.

### **Green Manure**

The use of green manure crops for root-knot nematode control is a newly development. In some countries specific green manures are considered 'Enemy Plants' in other countries they are called 'Antagonistic Plants'. The most famous of the Antagonistic plants is probably marigold, *Tagetes* spp., followed by Sunn Hemp, *Crotalaria* spp. Both plants are used in a number of countries for nematode control, but until recently on a small scale. In Myanmar (Burma), however, Sunn Hemp is grown over large areas before the upcoming legume or vegetable crop. It is then ploughed into the soil to increase fertility that also leads to a reduction in nematodes and soil-borne diseases (Sikora, unpublished). Green manures are usually not in themselves toxic to nematodes. Control of nematodes after incorporation is due to stimulation of microbial activity and thereby the production of toxic metabolites as mentioned above for organic amendments. Of course the organic matter supplies a nutrient bases for

microorganisms that make-up the antagonistic potential leading to nematode biocontrol. Other crops used in this manner are velvet bean and various grasses.

### **Bio-fumigation**

A mutually interacting technology package is the combination of organic matter amendments or green manure crops with plastic mulch solarization technology. This package can produce high levels of nematode control under tropical and subtropical climatic conditions. A three-prong mechanism acts to reduce the nematode population:

- (1) growing a resistant or toxic green manure crop that kills nematodes
- (2) biomass incorporation thereafter to stimulate microbial production of nematicidal ammonium and
- (3) stimulation of the antagonistic potential in the soil over time

Solarization increases the speed of degradation by elevating soil temperature and stimulating composting activity. High temperatures alone can be lethal to nematodes. This approach is now being used successfully in Morocco and could replace Mbr for root-knot control in some situations. Species of *Tagetes* are used to produce organic matter for the control of root-knot nematodes in large-scale plastic house tomato production. The antagonistic plant is grown in the cropping beds after the vegetable production cycle. The plants are then incorporated into the soil and drip irrigation installed before covering with plastic mulch. The combination of high soil temperature, antagonistic crop, toxic metabolite production during composting and stimulation of antagonists leads to effective control.

### **Root removal, desiccation and supplemental irrigation**

The removal of galled roots that are ultimately destroyed will reduce the root-knot population drastically. This technique is, however, associated with high labour costs in some countries. Clean fallow and desiccation in semiarid climates, has been recommended. It is not always acceptable in horticultural situations where time is money. An attempt to control root-knot by supplemental irrigation to stimulate root-knot nematode hatch, followed by soil solarization or drying to induce nematode desiccation, has to my knowledge not be attempted and might be adaptable to some growing regions.

### **Flooding**

Extended inundation, common in many lowland rice production regions of the world, leads to effective nematode control. This is effectively used to produce tomato for canning in the Philippines where tomato is planted after paddy rice and is root-knot nematode free. The duration of flooding and maintenance of anaerobic conditions must be sufficiently long to insure death of the highly resilient eggs stage.

### **Resistant crops/tolerant crops**

It is axiomatic that when resistant cultivars exist that they should be used. However, only a limited number of genes for resistance to nematodes exist in horticultural crops. In some cases this resistance is not available in commercial cultivars, because it has not been bred into the crops by breeders who favour high yield characters in their breeding protocols. Furthermore, the Mi gene for resistance to root-knot in tomato, breaks down when soil temperatures exceed 28 C. This limits its use in some regions and seasons. The recent development of rape and mustard used as green manures with resistance to

root-knot nematodes, is a break-through for nematode control in some cropping systems. Tolerance to nematodes is poorly understood. There are only two exceptions that I know of, tolerance to cyst nematodes in sugar beet and potato.

### **Resistant and tolerant grafting of rootstocks**

The grafting root stocks from resistance plant species onto the shoots of commercial cultivars has been shown to reduce root-knot damage significantly on tomato and other crops. It will be an effective replacement technology for Mbr in many countries. Again soil temperatures exceeding 28C will lead to a shutdown in the Mi gene for resistance. Resistant tomato rootstocks also seem to differ in their effectiveness to some species of root-knot. Not to be forgotten is the existence of races of *Meloidogyne* that are able to break the Mi gene resistance. Tolerant rootstocks are also available that can be grafted onto vegetables, e.g. squash and cucumber. The larger root systems of these rootstocks compensate for nematode damage. Both of these are labour intensive procedure. However, they are being used in many develop countries and should be of major importance in developing economies.

### **Biological control**

This is one area where nematologist have made "major breakthroughs". There are a number of biological control agents in the pipeline that when incorporated into suitable BSM systems will add greatly to overall control. Most biocontrol agents need to be used in technology packages with other integrated approaches and not alone. The use of arbuscular mycorrhizal fungi, plant health promoting rhizobacteria or mutualistic endophytic fungi to protect plants from nematode attack have been developed. Their use in BSM as mutually interacting technology packages in integrated approaches will be important in future management strategies when Mbr is phased out.

### **Suppressive soils**

I and other nematologists are firm believers that suppressive soils are important in regulating plant parasitic nematodes. We have outlined the ways and means of doing this. Extremely important in the future will be the use of the obligate bacterial parasite, *Pasteuria penetrans* for root-knot control. This parasite can be introduced artificially on seedling or in drip-irrigation to establish a suppressive soil. Local production with government or cooperative support for initial production of inoculum followed by targeted spread of spores to farmers in seedling pot systems should be considered by all countries growing vegetables on sandy soils. A recent discovery may lead to production on a large scale that will add to its potential in establishing suppressive soils and as an alternative to Mbr.

### **Fumigants and systemic nematicides**

There are other fumigants on the market that can be used to control nematodes. However, none of them to my knowledge have the broad spectrum of activity of Mbr. The search for alternatives will go on. Most non-fumigant nematicides do not kill nematodes, but only inactivate them. Some are effective in reducing early root penetration. However, the nematode population is seldom if ever reduced at the end of the season. This leads to the need for repeated use. The combination of systemic nematicides with biological control agents has not be fully examined. They could, under certain circumstances, increase levels of biocontrol when used as a package. Research is needed to find new chemical modes-of-action that are more effective and environmentally safe. The phase-out of Mbr would be a stimulus to industry to look for alternatives.



## **The Future**

In summary, I am convinced that we have good alternatives to fumigant nematicides for nematode control. I believe many effective and are designed to give environmentally safe control if used in a Biological System Management approach.

Last but not least, if alternatives are going to work then scientists must remember the following!

**"The worm has to taste good to the fish not the Angler"**

**or**

**"An alternative nematode management system has to be palatable to the farmer not the scientist!"**

## **Acknowledgement**

This paper is a modified version of a published talk presented at the Gent International Symposium on Plant Protection held at the University of Gent, Belgium in 2002.

# THE PRACTICAL APPLICATION OF INDUCED RESISTANCE FOR DISEASE CONTROL NOW AND FOR THE FUTURE

**Joseph Kuc**

*Professor Emeritus, University of Kentucky  
5502 Lorna Street, Torrance,  
California 90503 - U.S.A.  
e-mail: JoeKuc@Aol.com*

**CATIE**



## **Introduction**

If we were to protect people against disease as we currently protect plants, we would spray them with toxic chemicals to prevent the entrance of pathogens and cross them to "wild species" to introduce genes for resistance. We would also add "foreign" genes from completely unrelated organisms by the techniques of molecular biology to make animals resistant. Antibiotics are widely and successfully used to control diseases caused by bacteria and mycoplasmas in animals, but they are used for less frequently to control such diseases in plants. Quarantines find use for the control of disease in both plants and animals. However, if quarantines are not effective, all diseased plants are often destroyed. This practice of destroying disease carriers is also utilized with some animals (mad cow and hoof and mouth disease in cattle), but certainly this would be inappropriate for humans.

Why are there differences between how we control disease in plants and animals? Firstly, I believe most of us would concede that a human life is worth more, at least to us, than that of a cucumber or even giant redwood. Though fungi are a major cause of plant disease, they are not major pathogens for animals. Fungi penetrate plants directly through the cuticle, stomata or wounds. Wounds, stomata and insect carriers are the principle means by which bacteria, mycoplasmas and viruses enter plants. Though wounds are also a portal of entry of infectious agents in humans, most pathogens enter through the food we eat, the water we drink, the air we breathe and via insect carriers. The major pathogens in animals are viruses, bacteria and mycoplasmas. The basic foundation for disease resistance in animals is the highly versatile, flexible and effective internal, multicomponent immune system. The highly specific antibody-antigen interaction is one component of this system. This interaction in animals is highly specific for its induction and for the pathogen or foreign entity it is active against. The major protection against disease (preventative) in animals, aside from sanitation is immunization.

Disease resistance in plants as in animals is multicomponent (Kuc, 1982, 1995 ab, 1997, 2001, Lusson and Kuc, 1999). In general, the timing and magnitude of the response, and not the presence or absence of genes for the resistance mechanisms, determine resistance in plants and animals. Induced systemic resistance (ISR) in plants has some similarities and differences from immunization in animals. Both are multicomponent but ISR is nonspecific both for the inducer and spectrum of biological activity. Aspects of the immune system in animals are highly specific for both. Since

the genes for resistance mechanisms are generally present in plants susceptible and resistant to a disease, it is not surprising that ISR is effective in plants, and as expected, can be utilized for the practical control of disease.

### **Application of ISR**

The application of ISR for disease control can be divided into two major categories: ISR induced by microorganisms and ISR induced by chemicals. The latter includes ISR induced by microbial components and products. ISR was first clearly demonstrated in field experiments conducted in the 1970s by Kuc and coworkers (1982). They induced resistance to anthracnose in cucumber, watermelon and muskmelon by inoculating the first true leaf with spores of the causal agent, *Colletorichum lagenarium*, waiting until symptoms were well established on the leaf, and then transplanting into the field. Plants treated with water and untreated plants served as controls. After the transplants were established in the field, they were inoculated by spraying the foliage with a heavy spore suspension of *C. lagenarium*. Disease was markedly reduced on induced plants and yields were also increased since control plants either died or were severely stunted. Stunted plants were resistant to subsequent infection. In other experiments, the inducer leaves with symptoms were removed before transplanting without affecting protection against disease.

In further experiments in the field, tobacco was protected against blue mold, *Peronospora tabacina*, by restricted stem injection with spores of the pathogen (Tuzun et al., 1986; Tuzun and Kuc, 1991; Tuzun et al., 1992; Tuzun and Kloepper, 1995; Tuzun, 2001). ISR was effective against metalaxyl-tolerant and sensitive strains of the pathogen, and yields of tobacco were increased in field experiments. Experiments were conducted in Kentucky, Puerto Rico and Mexico. In addition,  $\beta$ -ionone and 3-n-butyl  $\beta$ -ionone sprayed on foliage also protected plants against blue mold in the field and greenhouse.

Gottstein and Kuc (1989) reported that compounds as simple as di and tripotassium phosphate protected cucumber against anthracnose in pilot field experiments and in the greenhouse. The spectrum of effectiveness of phosphate, and another simple compound, oxalate, was expanded to include fungi, bacteria and viruses (Mucharromah and Kuc 1991). The effectiveness of phosphates has been verified by numerous other reports of its application on the field including Reuveni et al. (1996), Reuveni and Reuveni (1998), Stromberg and Brishammar (1991), Manandhar et al. (1998).

Rhizobacteria have also been demonstrated to induce ISR in the field to protect against many diseases including bacterial wilt, *Erwinia tracheiphila*, and its vector the cucumber beetle (Zehnder et al., 2001). The application of ISR for insect control as well as disease control has been reviewed (Agrawal, Tuzun and Bent 1999 and Schmidt and Herber 2001). The first major commercialized chemical for ISR was benzo (1, 2, 3) thiadiazole -7- carbothioic acid 5-methyl ester (ASM). This compound has been marketed under the trade names Bion, Actigard and Boost (Oostendorf et al, 2001). ASM is effective against many diseases caused by fungi, bacteria or viruses. In wild-type plants, ISR elicited by ASM takes place without the accumulation of salicylic acid (SA). For a brief discussion of the role of SA in ISR see my earlier paper in this workshop.

SA has been reported to elicit ISR in field and greenhouse experiments but its effect is variable and it has not been commercialized. The major contribution of SA has been in furthering our understanding of aspects of ISR.

ASM is effective in monocots and dicots, but its persistence in dicots is much shorter than in monocots. ISR is induced by ASM in cereals, rice, tobacco, potato, tomato, vegetable, pome fruits, stone fruits, mango, citrus, grapes and banana (Oostendorf *et al.*, 2001). Reports are not available for the control of fungi, bacteria and viruses with all the plants listed, but it is interesting that ASM protects some plants against insects and nematodes.

Another more recent compound commercially available for control of disease and some insects is the protein Harpin. The protein is produced by *Erwinia amylovora*, the causal agent of fireblight, and is marketed under the trade name Messenger (Brasher, 2000). The mechanism by which Harpin elicits ISR is still unknown, but it is of fundamental interest to our understanding of ISR that the mode of action of a molecule as large as a protein is elucidated.

Induction of ISR with chemicals such as ASM and SA is not without complications and dangers. Increased susceptibility to some diseases and insects has been reported in field and greenhouse experiments (Bostock, 1999; Bostock *et al.*, 2001; Agrawal, Tuzun and Bent, 1999; Schmidt and Huber, 2001; Thaler *et al.*, 1999). The complications of using SA, and likely ASM, for disease control in the field are illustrated by a report by Quintanilla and Brishammar (1998). They studied ISR in potato to late blight and reported SA caused increased susceptibility in a susceptible cultivar, whereas it increased resistance in a cultivar with inbred resistance. Higher concentrations of SA elicited ISR in plants, when infected into seed potato tubers, whereas lower concentrations increased susceptibility.

### **Favorable and Unfavorable Aspects of ISR**

One question that is often asked when ISR is discussed is why ISR is not more widely commercialized? There are factors favorable and unfavorable for the development and use of ISR.

#### **Favorable factors include:**

1. Problems with the resistance of pathogens to classical pesticides.
2. The necessity to remove some pesticides from the market, the increased testing and cost of testing to meet requirements of regulatory agencies and the lack of substitutes for removed compounds.
3. Health and environmental problems, real and perceived, associated with pesticides and the increased popularity of 'organic crops' and 'sustainable agriculture.'
4. The inability of pesticides to effectively control some pathogens, e.g., virus and soilborne pathogens.
5. Classical pesticides may not be economically feasible for farmers in developing countries. In these countries the level of awareness for the safe and effective application of classical pesticides is low, thus creating dangers to human health and the environment.
6. Resistance of the public to genetically modified plants. In ISR, foreign genes are not introduced. The traditional genes for resistance in the plant are those that are expressed.
7. ISR has a broad spectrum and is effective for a long time.
8. Since many defenses are activated, ISR is less likely to develop resistance in pathogens.

### **Unfavorable factors include:**

1. Some plant pathologists still scoff at the applicability of ISR.
2. Only high profit, patented and complex inducers make the major markets. Who champions the simple non-patented compound?
3. Lack of sufficient information exchange and financial support for non mega-agribusiness-oriented scientists and a lack of adequate information flow to farmers and the public.
4. Unlike classical pesticides which directly kill or inhibit development of a pathogen, ISR depends upon the expression of genes for resistance in the plant. Therefore, ISR is more subject to physiological and environmental influences for effectiveness.
5. Public and farmer apprehension of new technologies.

### **The Future**

Priorities for research include investigations that should have and could have been completed years ago as well as those that require new information and technology for their initiation. Which of the putative defense compounds contribute to resistance? Is the timing of their appearance important? Is the synthesis of the compounds and timing of their appearance regulated differently? More attention should be given to individual plant-pathogen interactions, to determine which inducers and their doses, as well as which putative defense compounds and the timing of their appearance, are important. This is more important for ISR than for classical pesticides.

Do plants respond to the pathogen *per se* or to the stress (metabolic perturbation) caused by the pathogen or both? What is the translocated signal(s)? What causes synthesis or release of the signal(s)? Is it possible to develop plants with enhanced ISR through plant breeding? When breeding for resistance, are we also often breeding for enhanced ISR? What are the genetic and metabolic bases of the cascade of events associated with defense compounds, ISR and sensitization (priming)? The phenomenon of enhanced defense response to infection elicited by prior infection or treatment with an inducer is key to our understanding and the utilization of ISR. It is not the continual high expression of all putative defense compounds that explains most ISR. The similarity to memory is evident and an explanation may be found in the production of latent components in the mechanisms of protein synthesis which require a common infection-initiated substance for activation and/or enhancement. What are the molecular and practical significances of the non-specificity of the agents which elicit ISR?

Are the mechanisms for the different types of resistance (non-host, age-related, organ specific) the same or different and do they have components common to ISR? Can the genes for the different types of resistance be selectively expressed without detrimentally influencing plant development, e.g., express genes for age-related resistance without prematurely aging the plant?

What are the roles of oxidative stress, reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO) as defenses against disease and initiators of defense mechanisms? In mammals hydrogen peroxide and superoxide anion are the major microbicides produced by circulating phagocytic leukocytes. However, hydrogen peroxide and ROS may function alone or together with NO to enhance death of pathogens, as well as triggering transcriptional activation of plant defense genes and the hypersensitive response. Elevated levels of Ca<sup>2+</sup> can enhance NO synthase activity and perhaps this partially

explains the frequent association of calcium and calcium channels with resistance. Averyanow and colleagues (2000) reported that phenanthroline and phthalocyanine metal complexes induced systemic resistance to rice blast when applied to foliage or the soil. Both compounds produced ROS. In addition, metal complexes of phthalocyanine were effective when applied to rice seeds before sowing and the ISR lasted for at least one month in seedlings. The authors suggest that increased ROS generated by the inducer result in ISR, sensitization and the hypersensitive response.

Can defensins and protegrins be utilized effectively for ISR? Defensins and protegrins are antimicrobial peptides found in plants and animals ranging from insects to humans. They are part of an innate immune system which evolved before antibodies and lymphocytes. Since antimicrobial peptides are reported in plants, ISR may provide a mechanism to enhance production of the peptides in plants without the introduction of foreign genes.

Do DNA-binding proteins (zinc fingers) and cell-permeable polyamides have a role as agents for the selective expression of genes for ISR? Synthetic transcription factors have been developed which are designed proteins containing DNA-binding elements called zinc fingers. Similar structures are found in some natural transcription factors. Zinc fingers are independently folding domains of about 30 amino acid residues centered on a zinc ion. These proteins and synthetic polyamides can turn endogenous genes on and off in living cells in a very specific manner.

Does the progress made with Harpin indicate the presence of many similar proteins for ISR? The protein can be sprayed on plants before they are attacked by pathogens and it degrades so quickly that it cannot be detected within two hours of application. It is likely that Harpin is not the only protein with such a capability for ISR.

### **Conclusions**

Though resistance and susceptibility to pathogens are often specific and biochemicals determining this specificity have specific structures and receptors, non-specific agents and multiple signals and pathways for their transduction can also induce resistance to unrelated pathogens. This makes the possibility of finding additional effective agents for ISR and disease control highly promising.. The agents need not be patented, expensive or complex. Much more research is needed on the use of ISR agents to reduce dependence on chemical pesticides and enhance utilization of high-yielding plants that presently have a level of resistance that is inadequate for disease control under high pathogen pressure. ISR does not depend upon introducing genes into the plants, and it would not meet the resistance from the public engendered by genetically modified plants. ISR should be increasingly incorporated into IPM. Increased funding and information exchange is needed to better utilize and direct the rapidly emerging information concerning signals, receptors, signal transduction and gene expression for the control of plant disease.

## References

- Agrawal, A.; Tuzun, S.; Bent, E. (ed). 1999.** Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores. Amer Phytopathol. Soc. Press St. Paul.
- Averyanov, A.; Lapikova, V., Gaivornsky, L.; Lebrun, M. 2000.** Two step oxidative burst associated with induced resistance to rice blast. First International Symposium Induced Resistance to Plant Diseases Proceedings, Island of Corfu, Greece, May 22-27. Aabstract pp. 125-126.
- Bostock, R. 1999.** Signal conflicts and synergies in induced resistance to multiple attackers. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 55:99-109.
- Bostock, R.; Karban, R., Thaler, J., Weyman, P.; Gilchrist, D. 2001.** Signal interactions in induced resistance to pathogens and insect herbivores. *European J. Plant Pathol.* 107:103-111.
- Brasher, P. 2000.** Protein for replacing pesticides approved. *San Diego Union Tribune.* April 29 p. A7.
- Gottstein, H.; Kuc, J. 1989.** The induction of systemic resistance to anthracnose in cucumber by phosphates. *Phytopathology* 79:271-275.
- Kuc, J. 1982.** Induced immunity to plant disease. *Bioscience* 32:854-860.
- Kuc, J. 1995 a.** Phytoalexins, stress metabolism and disease resistance in plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* 33:275-297.
- Kuc, J. 1995 b.** Induced systemic resistance. An overview. In: Hammerschmidt, R. and Kuc, J. (ed). *Induced systemic Resistance to Disease in Plants* (pp. 169-175) Kluwer, Dordrecht.
- Kuc, J. 1997.** Molecular aspects of plant responses to pathogens. *Acta Physiologiae Plantarum* 19:551-559.
- Kuc, J. 2001.** Concepts and direction of induced systemic resistance in plants and its application. *European J. Plant Pathol* 107:7-12.
- Lusso, M.; Kuc, J. 1999.** Plant responses to pathogens. In: *Plant Responses to Environmental Stresses from Phytohormones to Genome Reorganization* (pp. 683-706). Marcel Dekker, NY.
- Manandhar, H.; Lyngs-Jorgensen, H.; Mathur, S.; Smedgaard-Peterson, V. 1998.** Resistance to rice blast induced by ferric chloride, dipotassium phosphate and salicylic acid. *Crop Prot.* 17:323-329.
- Mucharromak, E.; Kuc, J. 1991.** Oxalate and phosphates induce systemic resistance against disease caused by fungi, bacteria and viruses. *Cro Prot* 10:265-270.

- Oostendorp, M.; Kunz, W.; Dietrich, B.; Stanb, T. 2001.** Induced disease resistance in plants by chemicals European J. Plant Pathol 107:19-28.
- Quintanilla, P.; Brishammar, S. 1998.** Systemic induced resistance to late blight in potato by Saliylic acid and *Phytophthora cryptogea*. Potato Research 41:135-142.
- Reuveni, R.; Reuveni, M. 1998.** Foliar-fertilizer therapy, a concept in integrated pest management. Crop Prot 17:111-118.
- Reuveni, M.; Agapropov, V.; Reuveni, R. 1996.** Controlling powdery mildew caused by *Sphaerothecia fuliginea* in cucumber by foliar sprays of phosphate and potassium salts. Crop Prot 15:59-53.
- Schmidt, A.; Herber, J. 2001.** Proc. Conf. on Induced Resistance to Pathogens and Insects, Wageningen, The Netherlands.
- Stromberg, A.; Brishammar, S. 1991.** Induction of systemic resistance in potato (*Solanum tuberosum* L.) plants to late blight by local treatment with *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary, *Phytophthora cryptogea*. Pethyb / Laff, or potassium phosphate. Potato Research 34:219-225.
- Thaler, J.; Fidantsef, A.; Duffey, S.; Bostock, R. 1999.** Tradeoffs in plant defense against pathogens and herbivores: a field demonstration using chemical elicitors of induced resistance. J. Chem. Ecol. 25:1597-1601.
- Tuzun, S. 2001.** The relationship between pathogen-induced systemic resistance (ISR) and multigenic (horizontal) resistance in plants. European J. Plant Pathol 107:85-93.
- Tuzun, S.; Kuc, J. 1991.** Plant immunization an alternative approach to pesticides for control of plant diseases in the greenhouse and field. In: The Biological Control of Plant Disease FFTC Book Services No. 42 (pp. 30-40) FFTC, Taipei, Taiwan.
- Tuzun, S.; Kloepper, J. 1995.** Practical application and implementation of induced resistance. In: Hammerschmidt, R. and Kuc, J. (ed). Induced Systemic Resistance to Disease in Plants (pp. 152.168). Kluwer, Dordrecht.
- Tuzun, S., Nesmith, W.; Ferris, R.; Kuc, J. 1986.** Effects of stem injections with *Peronospora tabacina* on growth of tobacco and protection against blue mold in the field. Phytopathology 76:938-941.
- Tuzun, S.; Juarez, J.; Nesmith, W.; Kuc, J. 1992.** Induction of systemic resistance in tobacco against metalaxyl-tolerant strains of *Peronospora tabacina* and the natural occurrence of the phenomenon in Mexico. Phytopathology 82:425-429.
- Zehnder, G., Murphy, J.; Sikora, E.; Kloepper, J. 2001.** Application of rhizobacteria for induced resistance. European J. Plant Pathol 107:39-50.



# LA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA COMO HERRAMIENTA EN LA INVESTIGACIÓN FITOPATOLÓGICA: EFECTOS INDUCIDOS POR ACTIVADORES DE RESISTENCIA

Ethel Sánchez<sup>1</sup>, Omar Corrales<sup>2</sup> y Mayra Montiel<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas,  
Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.

e-mail: ethels@cariari.ucr.ac.cr y

<sup>2</sup>Syngenta LAN e-mail: omar.corrales@syngenta.com

**CATIE**



## Resumen

La microscopía electrónica ha permitido detectar agentes fitopatógenos como virus, viroides, fitoplasmas, bacterias, nematodos y hongos; además, de las alteraciones que provocan en las plantas infectadas. También, se puede estudiar los cambios morfológicos en plantas inducidos por algunos productos químicos. En este trabajo se analizan los efectos inducidos por el Acibenzolar-s-metil sobre plantas de banano. Las principales alteraciones observadas se presentan en tejidos foliares y raíz de plantas adultas. En las hojas las células del mesófilo en empalizada se distribuyen en forma desordenada. Las células de los haces vasculares y mesófilo esponjoso y en empalizada presentan cloroplastos con abundantes gránulos de almidón y glóbulos osmiofílicos, los granos se observan hinchados y en algunos casos necrosados. La vacuola de algunas células presenta varios glóbulos osmiofílicos de tamaño regular, en otras se presenta sólo un glóbulo osmiofílico de gran tamaño; también, al parecer el número de mitocondrias en estas células es mayor que el observado en los testigos no tratados. En los tejidos de la raíz se observa un aumento en el número de capas celulares y las paredes del periciclo, lo que provoca una disminución del ataque por nematodos. Estas alteraciones no se observaron en plantas controles a las que no se aplicó el químico.

## Introducción

La microscopía electrónica ha permitido detectar agentes fitopatógenos como virus, viroides, fitoplasmas, bacterias, nematodos y hongos; además, de las alteraciones que provocan en las plantas infectadas. Con la aplicación de esta tecnología ha sido posible realizar estudios como: descripción de la ultrestructura de los nódulos fijadores de nitrógeno en *Erythrina poeppigiana* (Ramírez & Flores 1994); estudios de las características externas de frutos de dos cultivares de cacao con diferente susceptibilidad a *Moniliophthora roreri* (Flores *et al.* 1994); estudios estructurales de penetración de *Aspergillus parasiticus* al cariósido de *Zea mays* (Córdoba Cedeno *et al.* 1994); identificación del virus del mosaico del maíz, un rhodovirus, en Costa Rica (Rivera & Pereira); detección de una bacteria Gram-negativa causante de la enfermedad conocida como "crespera en el cultivo de café (Vargas *et al.* 2002), detección de un virus en plantas de helecho con la enfermedad llamada "mongolismo" (Sánchez *et al.* 2002). Podrían mencionarse infinidad de trabajos realizados con microscopía electrónica y que sin estos equipos sería imposible realizar. También, se puede estudiar los cambios morfológicos en plantas inducidos por algunos productos químicos. En este trabajo se analizan los efectos inducidos por el Acibenzolar-s-metil sobre plantas de banano.

## **Materiales y métodos**

Se procesaron muestras de hojas y raíz de plantas control, muestras de hojas y raíz de plantas con síntomas iniciales y síntomas avanzados. Para microscopía electrónica de barrido se tomaron secciones de 5 mm<sup>2</sup>, se fijaron con glutaraldehído al 2.5% y paraformaldehído al 2% en amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4 (Karnovsky 1965). Se lavaron en el amortiguador, se pos fijaron con tetraóxido de osmio al 2%. Se lavaron con agua destilada y se deshidrataron en un gradiente de alcohol etílico (30-100%). Se lavaron 4 veces con alcohol terbutílico y se secaron por sublimación (Sublimador Eiko ID-2, Japón), se montaron sobre bases de aluminio de 15 mm de diámetro, utilizando cinta adhesiva de carbón de doble cara y se cubrieron con 30 nm de oro, utilizando un cobertor iónico (Eiko IB-3, Japón). Posteriormente se observaron con un microscopio electrónico de barrido S-570 (Hitachi, Japón) y las micrografías fueron tomadas utilizando película verichrome pan-120 (Kodak) y a un voltaje de aceleración de 15 KV.

Para microscopía electrónica de transmisión se tomaron muestras de la raíz y hojas de la planta control y de las zonas necrosadas de las raíces y hojas de plantas con síntomas iniciales y síntomas avanzados. Se seccionaron y fijaron con una mezcla de glutaraldehído al 2% y paraformaldehído al 2% en amortiguador de fosfato de sodio 0.1 M, pH 7.4. Posteriormente se lavaron con el amortiguador, se pos fijaron con tetraóxido de osmio al 2%, se lavaron con agua destilada y se deshidrataron en un gradiente ascendente de alcohol etílico (30-100%). Se infiltraron con resina Spurr y se polimerizaron a 70°C. Seguidamente las muestras polimerizadas fueron seccionadas, utilizando un ultramicrotomo (Reichert- ultracut, Austria). Los cortes de 70 nm de grosor fueron contrastados con acetato de uranilo e hidróxido de plomo y se observaron con un microscopio electrónico de transmisión H-7100 (Hitachi, Japón), utilizando un voltaje de aceleración de 100 KV y las micrografías se tomaron en placas de 8.2x11.8cm (Película para microscopía electrónica, Fuji, Japón).

## **Resultados**

Con microscopía de barrido la hoja de la planta control se observa anfiestomática, aunque en la superficie abaxial la cantidad de estomas es mayor que en la superficie adaxial. Los estomas están bien diferenciados y presentan una estructura celular normal, constituidos por el poro estomático, las dos células guardianas u oclusivas y las células subsidiarias, la unidad celular del estoma se observa bien diferenciada en el patrón epidérmico de la lámina. Se nota la distribución de la cera epicuticular en ambas superficies, pero en la abaxial se visualiza un patrón muy simétrico y diferente del que se observa en la superficie adaxial.

Con el microscopio de barrido el corte transversal la hoja de banano sana se observa la capa epicuticular, luego una capa de células epidérmicas pequeñas, continúa la hipodermis superior que está constituida por uno o dos estratos de células de mayor tamaño que las células de la epidermis. A continuación se observa el mesofilo diferenciado en parénquima en empalizada y parénquima esponjoso, el primero con dos o tres estratos de células alargadas, que al ser observadas con el microscopio electrónico de transmisión, se caracterizan por contener el mayor número de cloroplastos, que presentan estructura normal, algunos glóbulos osmiofílicos y pocos gránulos de almidón. Entre las células del mesofilo se encuentran también algunas células productoras de látex y además los haces vasculares formados por células de xilema que son células conductoras de agua y minerales y el floema encargado de

transportar sustancias alimenticias, estos haces se encuentran limitados hacia ambas superficies de la hoja por fibras esclerenquimáticas.

En la superficie abaxial, el mesofilo está sustituido por espacios aeríferos, en seguida encontramos la hipodermis inferior formada por un estrato celular, luego se observa una capa de células más alargada que constituye la capa epidérmica abaxial y por último se observa la cera epicuticular de esta superficie. Las raíces se observan de color blanquizco las jóvenes y las adultas presentan un color café amarillento, su diámetro oscila entre los 6 a 9 mm, algunas podrían tener un diámetro hasta de 11 mm y presenta raíces de primero, segundo y tercer orden.

En los cortes transversales de raíces control observados con el microscopio de barrido, se observaron los pelos absorbentes, la rizodermis, la corteza que presenta células parenquimáticas y gran cantidad de espacios de aire lisígenos de diferentes tamaños, el periciclo que es uniseriado, la endodermis que usualmente es uniseriada y contienen suberina y lignina en las paredes tangenciales y radiales (Bandas de Caspary), posteriormente se encuentra la médula o tejido central, donde se observan los vasos de xilema, grupos de células del floema y parénquima. En las plantas con síntomas iniciales, se notó que las hojas presentaron una textura más gruesa en la capa cuticular, con secciones cloróticas que presentaban un color café marrón. La raíz presentaba zonas necróticas de color negro. En las plantas con síntomas avanzados, las hojas presentaron mayor número de zonas cloróticas y un color marrón más oscuro y las raíces presentaron abundantes zonas necróticas de color negro.

En los cortes de hoja realizados para microscopia electrónica de transmisión los hallazgos más notorios fueron el aparente aumento en el número de mitocondrias, especialmente en las células de parénquima de los haces vasculares. Los cloroplastos de las células del parénquima en empalizada presentan una alteración en la estructura interna, se observa la ruptura y pérdida de los tilacoides debida a la presencia de gran cantidad de glóbulos osmiofílicos y de gránulos de almidón, en algunos casos. Estas alteraciones del cloroplasto se observaron con más frecuencia en células del parénquima en empalizada de hojas con daño más avanzado.

En las vacuolas y cloroplastos de las células del parénquima en empalizada y de hojas con daño inicial se observa la presencia de grandes glóbulos osmiofílicos muy densos. La presencia de estos glóbulos se hace más frecuente en el tejido de las hojas con daño avanzado, ocupando un espacio bastante importante de la célula.

En las secciones de hojas observadas con el microscopio electrónico de barrido se realizaron las siguientes observaciones: Alteración en el patrón celular epidérmico, existiendo un aumento en la capa epicuticular en la superficie adaxial y abaxial de las hojas con daño inicial. En las hojas que presentan daño avanzado se observó una disminución de la cantidad de cera epicuticular y disminuyó el grosor de la capa epicuticular en algunas áreas de la cutícula de ambas superficies de la hoja. Se observó una alteración en la distribución y disminución en el número de estomas conforme avanzó el daño, además el estoma fue perdiendo la morfología normal, ya que las células oclusivas y las células guarda se observaron menos diferenciadas.

En el interior de la hoja se observó una alteración y desorden en el crecimiento celular, hay un aparente aumento de las capas del parénquima en empalizada, la forma de las

células de la hipodermis superior se notó alterada. En algunos cortes, las células que corresponden al haz vascular se notaron como enormes vasos, pero no se observaron las perforaciones de las paredes; el floema no pudo identificarse. Los espacios aéreos se notaron bloqueados al estar invadidos por células de paredes frágiles y poco diferenciadas. Se apreció un deterioro del sistema vascular, hay alteraciones de los espacios aéreos y una irregularidad en la formación del parénquima en empalizada. Pero la hipodermis inferior mantiene su forma normal.

### **Observaciones**

Las muestras analizadas indican que estas hojas están perdiendo espacio para el intercambio gaseoso al disminuir el número de estomas en ambas superficies de la hoja y al alterarse la estructura morfológica normal del estoma. Además en las hojas con daño inicial se observa un engrosamiento de la capa epicuticular y al existir una mayor deposición de cera cuticular en algunos casos podría obstaculizarse la transpiración y el intercambio gaseoso a través del poro estomático, lo que dificulta la regulación de agua dentro de la planta y la respiración celular. Además al encontrarse bloqueados algunos de los espacios aéreos del mesofilo esponjoso, se reduce el espacio para atrapar el aire que la planta necesita para realizar las funciones vitales. La alteración y pérdida de tilacoides en los cloroplastos disminuye la tasa fotosintética, dejando a la planta sin uno de los procesos bioquímicos más elementales para la supervivencia. En algunos cortes se notó alteración en el sistema conductor: el xilema y el floema, por lo tanto, el transporte de agua, minerales y nutrientes a través de la hoja y la planta en general se ve alterado. Esto sugiere que los sistemas actúan en forma anormal.

El aparente aumento en el número de mitocondrias y la presencia de gran cantidad de glóbulos lipídicos indica un posible aumento en la actividad metabólica de la hoja.

### **Referencias**

- Córdoba-Cedeño, H., R. E. Zurcher & G. Bonilla-Salas. 1994.** Estudio estructural de penetración de *Aspergillus parasiticus* al cariósido de *Zea mays*. Rev. Biol. Trop., 42(Supl.2):51-58.
- Flores, D., J. J. Galindo & C. Ramírez. 1994.** Ultraestructure of cocoa fruits (*Theobroma cacao*) of cultivars with contrasting susceptibility to *Monilophthora rozeri*. Rev. Biol. Trop., 42(Supl.2):29-37.
- Karnovsky, M. J. 1965.** A formaldehyde-glutardehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. J. Cell Biol. 27: 137A.
- Ramírez, C. & D. Flores. 1994.** Structure of dinitrogen fixing nodules in *Erythrina poeppigiana*. Rev. Biol. Trop., 42(Supl.2):15-28.
- Rivera, C. & R. Pereira. 1994.** Identification of the corn mosaic virus, a rhabdovirus, in Costa Rica (SPA). Rev. Biol. Trop., 42(Supl.2):105-109.
- Sánchez, E., L. Moreira, A. Solórzano, H. Iwasawa & C. Rivera. 2002.** Hallazgo de una partícula viral en plantas de helecho hoja de cuero (*Rhynchospora adiantiformis*) con la enfermedad conocida como "Mongolismo". En preparación.
- Vargas-Cartagena, L., E. Sánchez, M. Vargas, A. Solórzano, F. Hernández, H. Iwasawa & E. Freer. 2002.** Rev. Biol. Trop. 50 (1). Aceptado 21-IX-2001.

# EL PAPEL DE LOS METABOLITOS SECUNDARIOS EN LA DEFENSA INDUCIDA DE PLANTAS

**Jorge Eduardo Loaiza**

Laboratorio de Productos Naturales, Escuela de Química

Universidad Nacional de Costa Rica

Heredia, Costa Rica

e-mail: [jloaiza@una.ac.cr](mailto:jloaiza@una.ac.cr)

**CATIE**



Se estima que de un 5 al 15% de las 250.000 a 500.000 especies de plantas conocidas han sido estudiadas por su actividad biológica y hay muy poca información sobre las plantas tropicales.

Las plantas desde el punto de vista adaptativo poseen la capacidad de responder al ataque de herbívoros o patógenos (hongos, bacterias, virus, nematodos), desencadenando mecanismos de defensa; procesos que han sido denominados de diferente manera: Inmunización, resistencia inducida (RI), término utilizado por entomólogos, resistencia sistémica inducida (RSI), y resistencia sistémica adquirida (RSA), términos utilizados por fitopatólogos. La RSI contra patógenos ha sido demostrada en más de 30 especies de plantas y la RI contra herbívoros ha sido demostrada en más de 100 especies de insectos (Karban y Kuc, 1999); en donde se han utilizado agentes bióticos y abióticos como inductores o elicitores a organismos patógenos y no patógenos, herbívoros, o sus productos, o un diverso grupo de compuestos orgánicos e inorgánicos. Entre otros, los principales mecanismos que se han estudiado son:

1. Acumulación de proteínas inhibitoras de proteinasas:  $\beta$ -1,3 glucanasas, Chitinasas (Green y Ryan, 1972).
2. Producción de metabolitos secundarios (Fitoquímicos) (Mann, 1986).
3. Producción de fitoalexinas (Ebel, 1986; Kuc, 1995).
4. Desencadenamiento de la respuesta hipersensitiva (Goodman y Novachy, 1994).
5. Sistemas enzimáticos involucrados en la trasmisión de impulsos y en la detoxificación: Polifenoloxidásas, peroxidásas.
6. Desencadenamiento de señales inductoras como la vía del ácido jasmónico, la vía del ácido salicílico, la síntesis del etileno, la activación del oxígeno, la fosforilación oxidativa, el flujo de iones, la fragmentación de la pared celular, la producción de ciertas hormonas (ácido abscísico), y la acumulación de calcio y lignina, entre otras (Agrawal *et al.* 1999; Macias *et al.* 1999).

La producción y función de los productos secundarios producidos por las plantas ha sido poco estudiada. Existe una amplia variación en la composición química de estos metabolitos secundarios, entre especies de plantas; y esta variación es el resultado de una presión de selección ocasionada por factores físicos y químicos de origen biótico y abiótico. Cada especie de planta ha ido coevolucionando con un gran número de especies, insectos, patógenos de plantas, microbios del suelo, nematodos, animales

superiores y otros organismos, lo cual ha provocado la producción de metabolitos secundarios específicos, con influencia de la interacción a favor de las planta. Por ejemplo, la síntesis de ciertas fitoalexinas ha evolucionado en respuesta a la presión de selección causada por patógenos particulares de cada planta. La presión de selección ha forzado la evolución de ciertas rutas bioquímicas para producir potentes metabolitos secundarios involucrados en el mecanismo de defensa.

Además, como resultado de esa evolución, ha habido una especialización de los mecanismos y estructuras, de las cuales, ciertas glándulas secretoras para localizar o secuestrar esos compuestos asociados con la defensa. El tejido o la localización celular del metabolito secundario puede ayudar a predecir su función y la potencial actividad biológica; sin embargo el conocimiento de la localización y su función en la naturaleza podrían ser usadas por el ser humano, en el desarrollo de eficientes procesos de extracción y el planeamiento en la producción de estos mediante síntesis.

Los metabolitos secundarios son moléculas de bajo peso molecular que por definición no son requeridos en procesos fisiológicos normales como crecimiento o desarrollo y los cuales tienden a tener una actividad más específica en ciertas especies, que los metabolitos primarios. Los metabolitos secundarios pueden ser producidos o almacenados en glándulas, ductos resiníferos, idioblastos y células especializadas (subepidérmicas). Dentro de los principales grupos de metabolitos secundarios que se han relacionado con el mecanismo de defensa en plantas se encuentran los fenoles y los fenilpropanoides. Los fenoles son caracterizados por tener un anillo aromático, a los cuales se unen grupos sustituyentes tipo hidroxilos.

La ruta biosintética por la cual se producen es la del ácido sikímico y la de los fenilpropanoides. Estos fitoquímicos son inducidos por condiciones de estrés, exceso de luz, luz ultravioleta, frío, deficiencias nutricionales y ataque por herbívoros o patógenos (Dixon y Pavia, 1995). Existen diversos estudios en donde se involucra la presencia de ciertos grupos fenólicos : ácidos fenólicos y conjugados (ácido clorogénico, y tyramanine conjugados), glicósidos fenólicos (salicartín, tremulacín), furanocumarinas (xanthotoxin, bergapten), cumarinas (scopoletina, oxapín), estilbenos (pinosylvíin), taninos (condensados e hidrolisables), ligninas y flavonoides (isoflavonoides) (Croteau *et al.* 2000; Cutler y Cutler, 1999). Dentro de esta gran variedad de compuestos, nuestro grupo de investigadores, ha estado analizando el efecto de isoflavonoides (pterocarpanos) en la raíz de *Gliricidia sepium*, leguminosa tropical, la cual sus extractos están siendo utilizados como inductores de resistencia contra diversas especies de hongos fitopatógenos. Igualmente, de *Echinacea purpurea* y *E. angustifolia* se han estudiado tres derivados del ácido caféico (ácido clorogénico, ácido cichórico) y un glicósido; así como otro grupo de metabolitos como son las alcaloides, como inductores de resistencia contra insectos y hongos.

## **Referencias bibliograficas**

- Agrawal, A.A Tuzun, S Bent, E. 1999.** Induced plant defenses against pathogens and herbivores. APS Press. The American Phytopathological Society.
- Croteau, R Kutchan, M.T Lewis, G.N. 2000.** Natural products (Secondary Metabolites). Biochemistry & Molecular Biology of Plants; B. Buchanan, W. Grissen, R. Jones, Eds. American Society of Plant Physiologist.
- Cutler, G.H Cutler, J. S. 1999.** Biologically Active Natural Products: Agrochemicals. CRC Press LLC.
- Dixon, R, A Pavla, N, L. 1995.** Stress-induced phenilpropanoid metabolism. The Plant Cell 7:1085-1097.
- Ebel, J. 1986.** Phytoalexin Synthesis: the biochemical análisis of the induction process. Annual Review of Phythopathology 24:235-264.
- Goodman, R, N y Novacky, A, J. 1994.** The hypersensitive reaction in plants to patogens. APS. Press, St. Paul, MN. Pp.244.
- Green, T, R Ryan, C. A. 1972.** Wound-induced proteinase inhibitor in plant leaves: A posible defense mechanism against insects. Science 175:776-777.
- Karban, R Kuc, J. 1999.** Induced Resistance Against Pathogens and Herbivores: An Overview In: Induced Plant Defenses Against Pathogens and Herbivores. APS Press.
- Kuc, J. 1995.** Phytoalexins stress metabolism and disease resistanse in plant. Annual Review of Phytopathology 33:275-297.
- Macias, A, F Galindo, G, C, J Molinillo, G, M, J Cutler, G, H. 1999.** Recent Advances In Allelopathy, Vol I, A Science for the Future. Servicio de publicaciones Universidad de Cádiz, España.

# POTENCIAL INSECTICIDA Y REPELENTE DE LA ALBAHACA (*Ocimum sp*) FRENTE A LA MOSCA CASERA (*Musa domestica*)

**E. Murillo, M. Montealegre., D. Villanueva., M. Alcocer y M. Cardona**  
Departamento de Química, Facultad de Ciencias, Universidad del Tolima.  
Ibagué. Tolima. Colombia. Tél. : + 57 82 644219 Fax: + 57 82 644869  
e-mail: emurillo8@hotmail.com

**CATIE**



## Resumen

Se hizo la determinación taxonómica y el estudio macromorfológico de 12 variedades de albahaca (*Ocimum sp*), detectadas en el municipio de Ibagué-Tolima; adicionalmente, se compararon los rendimientos del aceite esencial obtenido por hidrodestilación y destilación-extracción simultánea, se determinaron y cuantificaron los constituyentes mayoritarios de los aceites esenciales de las 12 variedades de albahaca, analizados por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM), y se muestra la interrelación entre la actividad insecticida con la composición química, frente a *M. domestica*, de la variedad de mayor actividad.

## Introducción

Los vegetales han hecho posible la supervivencia de los animales y humanos al aportarles sus propiedades, conferidas por diversos componentes químicos (principios activos), que los convierten en los mejores aliados en la lucha por sobrevivir.

Los principios activos de algunos vegetales pueden estar constituidos total o parcialmente por esencias, las plantas que las poseen se les conoce como aromáticas; éstas encuentran aplicación en una extensa gama de usos a nivel agronómico, médico, zootécnico, industrial y comercial; en consecuencia, se presentan multitud de procesos en los que son utilizadas como materia prima. Teniendo en cuenta que en Colombia los productos alimenticios, los animales y el hombre se ven afectados por acción de plagas tan molestas como la mosca casera (*Musca domestica*) encontrada en lugares concurridos por el hombre, en donde pueden depositar agentes patógenos causantes de muchas enfermedades para hombres y animales, generando enormes pérdidas en la economía; el uso de productos químicos para su control es la tecnología disponible en nuestro país, algunos prohibidos por las nocivas consecuencias ecológicas, por la intoxicación causada en los seres vivos por inhalación, consumo de agua y alimentos contaminados.

Los aceites esenciales, por ser un producto natural con nula o muy baja toxicidad, son una alternativa para el control de plagas de este tipo puesto que se les ha encontrado propiedades insecticidas (Kayitare y Ntezurubanza 1991; Bhattacharyya y Bordoloi 1986), fungicidas (Dubey y Kishore 1987; Dubey 1991), antibacteriales (Cáceres *et al.* 1993; Thomas 1989), nematocidas (Singh, *et al.* 1991; Fazal y Husain 1991), entre otras.



En este trabajo se presenta la determinación taxonómica y un estudio macromorfológico de 12 variedades de albahaca (*Ocimum* sp), detectadas en el municipio de Ibagué-Tolima; adicionalmente, se comparan los rendimientos del aceite esencial obtenidos por hidrodestilación y destilación-extracción simultánea, se presentan los constituyentes mayoritarios de los aceites esenciales de las 12 variedades de albahaca encontradas, analizados por cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM), y se muestra la interrelación entre la actividad insecticida con la composición química, frente a *M. domestica*, de la variedad de mayor actividad.

### **Materiales y métodos**

**Material vegetal** : se trabajó con la parte aérea de las variedades de *Ocimum* recolectadas en el área urbana y suburbana del municipio de Ibagué (20° C, 74.1 % humedad relativa, 1300 m.s.n.m.). La determinación taxonómica se realizó en el Herbario Toli de la Universidad del Tolima, utilizando claves taxonómicas establecidas por Moreno *et. al* (1987).

**Material insectil** : se utilizaron adultos de *Musca domestica* (24 horas de nacidos), provenientes de pupas suministradas por PERKINS LTDA, bioterio ubicado en Palmira-Valle (24°C, 1000 m.s.n.m.). Para el sostenimiento, se les suministró una dieta de agua y azúcar (1:1).

**Extracción de los aceites esenciales:** se aplicó un método tradicional, hidrodestilación, (HD) y otro de mayor actualidad, destilación-extracción simultánea, (DES), con el propósito de comparar la influencia del método de extracción en el rendimiento de aceite esencial, en su composición química y, por ende, en la actividad biológica.

**Análisis químico** : la identificación de los constituyentes químicos se llevó a cabo por inyección de 1.0 ml del aceite esencial (solución al 20% en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) en un CG Hewlett Packard (HP) 6890 Plus en interfase con un detector selectivo de masas HP 5972, equipado con una columna capilar DB-5 (30 m x 0.25 mm d.i.). La temperatura del inyector se mantuvo a 250° C. La temperatura de la columna estuvo a 50° C (5 min.) y luego se programó de 50° C a 250° C a 5° C/min. El flujo del He, utilizado como gas de acarreo, fue de 20 cm/min, presión 78 kPa y split 1:30. La energía de los electrones ionizantes fue de 70 eV, los espectros de masas fueron obtenidos por barrido automático dentro de un rango de masas m/z de 30 a 300. Los datos cuantitativos fueron suministrados por autointegración del equipo. Los compuestos fueron identificados por comparación de los espectros de masas de cada componente resultante en la CG/EM con los estándares de las bases de datos y con datos reportados en la literatura Adams (1995); Kondjoyan y Berdagué (1996). Se usó como estándar interno el tetradecano.

**Evaluación de la actividad insecticida** : el potencial insecticida del aceite se evaluó sobre adultos de *M. domestica* (un día de nacidos), aplicando la "prueba de contacto", consistente en adormecer al insecto con éter etílico y aplicarle con una microjeringa un microlitro del aceite esencial en el mesotórax. Se probaron concentraciones entre 100 y 2000 ppm de los aceites preparados en acetona-agua (1%) sobre una población de 25 moscas por tratamiento (13 machos, 12 hembras). Las lecturas de mortalidad se tomaron a las 24 horas. Se hicieron cuatro réplicas por concentración, utilizando como blanco el disolvente de los aceites.

El potencial insecticida de los volátiles se corroboró mediante un ensayo que evaluó el desarrollo larval del insecto. A la dieta (aserrín y harina de trigo), se adicionó el aceite en diferentes concentraciones 500, 1000, 1500 y 2000 ppm.

**Prueba de repelencia :** para este ensayo se construyó un sistema de trampas interconectadas entre si, esquematizado en la Figura 1 y en el cual se colocaron diferentes atrayentes para el insecto.

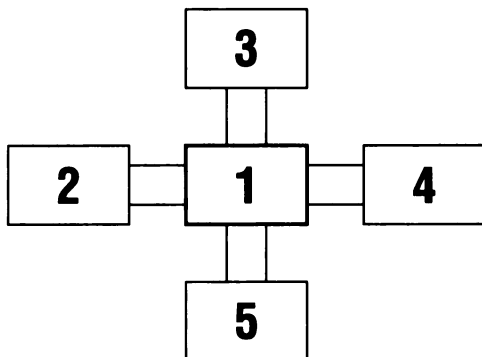


Figura 1. Sistema de trampas utilizado en el ensayo de repelencia

Los atrayentes se distribuyeron así: (1) cámara donde se liberaron 100 moscas (50 hembras y 50 machos); (2) cámara con el cebo (carne) utilizado como control; (3) cámara que contenía carne mezclada con 0.5 ml de aceite esencial a una concentración de 200 ppm, disuelto en etanol-agua (1%); (4) cámara donde se depositó carne mezclada con un repelente comercial (Repelex) y (5) cámara que contenía 0.5 ml de solución de aceite esencial (200 ppm) impregnado en papel filtro (diámetro 125 mm). El ensayo se llevó a cabo en completa oscuridad, eliminando así posibles interferencias ocasionadas por la luz. El número de individuos atraídos en cada cámara se determinó una hora después de colocadas las moscas. La prueba se repitió 5 veces.

### Resultados y discusión

Se detectaron 22 variedades, las que fueron sometidas a clasificación taxonómica que dejó ver diferencias en cuanto a forma, tamaño y color en la hoja, lo propio aconteció con la inflorescencia y en el vegetal, considerado como un todo. Sobre esta base se agruparon las plantas en 12 variedades así: 3 pertenecientes a la variedad *basilicum* (25%), 4 clasificadas como *americanum* (33%), 2 de ellas pertenecientes a la variedad *minimum* (17%), una sólo resultó ser *micranthum* (8%) y las dos restantes (17%), no fue posible determinar la variedad a la que pertenecen.

Teniendo en cuenta la hoja, las 12 variedades resultaron:

- 7 de hojas verdes, que representan el 58.3%
- 5 variedades con hojas de tonalidades moradas, las cuales son el 41.7%
- 1 vegetal de hojas grandes (5.0 a 7.0 cm), 8.3%
- 5 plantas de hoja mediana (3.0 a 5.0 cm), 41.7%
- 6 vegetales de hoja pequeña (0.9 a 3.0 cm), 50%
- 9 variedades de hoja con borde aserrado, 75%
- 4 variedades de hoja con borde dentado, 25%
- Las 12 variedades presentaron la hoja de forma ovalada

Con base en el color de la flor, las plantas se pudieron clasificar así:

- 5 variedades blancas, que equivalen al 41.7%
- 1 variedad rosada, 8.3%
- 6 variedades con tonalidad morada, 50%

Si la base de clasificación es la altura del vegetal como un todo, entonces:

- 5 variedades resultaron pequeñas (30 a 50 cm), 41.7%
- 7 variedades grandes (50 a 90 cm), 58.3%

### Rendimiento de aceite esencial

La figura 1 muestra los rendimientos de aceite esencial de las 12 variedades de albahaca obtenidos por HD y DES. La figura 1, deja ver claramente que en el método DES todas las variedades mostraron mayor rendimiento que en HD, siendo Crespa Morada (11), Verde de hojas grandes (8) y Crespa blanca (12) las de mayor producción de aceite esencial por DES. Si se relaciona la morfología de las plantas con su rendimiento se puede anotar que las variedades de hojas grandes (Verde de hojas grandes) y medianas (Crespa blanca) muestran mayores rendimientos que los vegetales de hoja pequeña (tal como las denominadas "virgen"). Las variedades crespas dieron los mejores rendimientos en ambos métodos, excepto la crespa morada en HD; en este método, la variedad Zancona morada (4), dio los mejores rendimientos, en tanto que Castilla morada (3) evidenció baja productividad de aceite en ambos métodos; por su parte Virgen morada (9), fue la de más bajo rendimiento en HD.

Un análisis de varianza, determinó que existen diferencias significativas entre los rendimientos de aceite esencial de las variedades. La prueba de Tukey mostró que entre las 12 plantas, la variedad de mayor rendimiento fue la Crespa morada (*Ocimum* sp) y la de más bajo rendimiento fue castilla morada (*O. americanum*). Composición química

### Composición química

Se adoptó como criterio para seleccionar los componentes mayoritarios, aquellos compuestos químicos del aceite esencial cuyo contenido fuera igual o mayor del 1% (aunque aparezca en esta cantidad en una sola de las variedades). La tabla 1, se construyó con el propósito de mostrar los constituyentes mayoritarios de los aceites esenciales que poseen las 12 variedades de albahaca encontradas en Ibagué-Tolima.

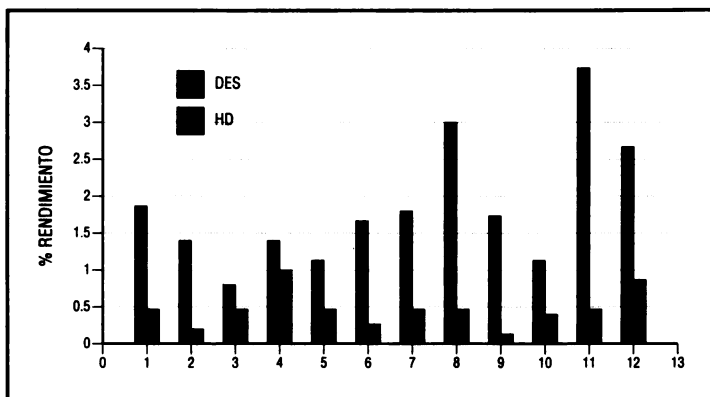


Figura 1. Rendimiento (volumen/ peso) de aceite esencial de 12 variedades de albahaca (*Ocimum* spp) obtenidos por HD y DES

En donde:	Varietal	Nombre científico
No.		
1	Canela	<i>O. micranthum</i> W.
2	Querendona Morada	<i>O. americanum</i> L.
3	Castilla Morada	<i>O. americanum</i> L.
4	Zancona Morada	<i>O. americanum</i> L.
5	Clavo	<i>O. americanum</i> L.
6	Blanca Compacta	<i>O. basilicum</i> L.
7	Dulce de Castilla	<i>O. basilicum</i> L.
8	Verde de hojas grandes	<i>O. basilicum</i> L.
9	Virgen Morada	<i>O. minimum</i> L.
10	Virgen Pequeña	<i>O. minimum</i> L.
11	Crespa Morada	<i>O. sp</i>
12	Crespa Blanca	<i>O. sp</i>

La tabla 1 además de mostrar los constituyentes mayoritarios, deja ver los quimiotipos de cada variedad, para determinarlos se adoptó como criterio aquellos compuestos que estuvieran en proporción igual o superior al 20%. Se observa que el 83% de las variedades (10), poseen el quimiotipo "cinamato de metilo", sólo una evidencia como quimiotipo "linalol" aunque en ella el contenido de cinamato de metilo es superior al 20%; otra de las albahacas reveló como quimiotipo "cariofileno". La misma tabla deja ver además que la albahaca canela (*O. micranthum*) es la que posee mayor cantidad de cinamato de metilo (80%). En un estudio realizado por Murillo *et al* (2002), esta variedad evidenció mayor actividad antifúngica frente a *Fusarium oxysporum*; adicionalmente, albahaca canela, a diferencia de las once restantes, fue encontrada en potreros y en bordes de caminos. Todo lo anterior permitió plantear la hipótesis de si el potencial biológico de este vegetal era concordante con su hábitat, debido tal vez a una agresividad natural desarrollada frente al medio de desarrollo lo que a su vez, generaría compuestos químicos con potencial insecticida; para responder esta pregunta se estudió el potencial insecticida de la planta desarrollada en tres hábitats: el primero en medio de maleza sin cuidado alguno, a quien se llamará "Albahaca Silvestre Cultivada" (A.S.C.), el segundo en invernadero, junto con otras especies de albahaca, con las exigencias requeridas en un cultivo comercial, se denominará "Albahaca Domesticada" (A.D.) y el tercero ubicado en Lérida (400 m.s.n.m., 26° C en promedio y un 75% de humedad relativa), en medio de su hábitat natural, se llamará "Albahaca de Monte" (A.M.). En los tres casos el corte se realizó 90 días después de su plantación.

En este caso se trabajó con aceite esencial extraído por hidrodestilación (HD) y soxhlet a presión normal (ESPN); este último, resulta ser semejante, por sus condiciones, a DES.

**Actividad insecticida** : la acción insecticida evidenciada en la "prueba de contacto", por los volátiles de *O. micranthum*, desarrollada en tres hábitats diferentes (A.D., A.S.C. y A.M.), resultó similar a la actividad manifestada por la mezcla acetona-agua al 1% (disolvente de los aceites), utilizado como blanco. Los resultados de cuatro réplicas de cada tratamiento fueron siempre variables y no permitieron ver diferencias notorias entre la mortalidad ocasionada por el aceite preparado a bajas concentraciones (100 y 200 ppm) y el mismo trabajado en dosificaciones medias (250 y 800 ppm) y altas (1000 y 2000 ppm). El análisis estadístico realizado a través de un modelo de regresión lineal (Probit), reveló que no existe ninguna relación funcional lineal entre las dosis y el número de moscas muertas (coeficientes de regresión lineal iguales a cero: 0.00044, 0.00033, 0.00018, 0.00047), lo cual indica que las variables son estadísticamente independientes; alterno a esto se realizó una estimación de los coeficientes de correlación con el fin de corroborar lo anterior, los resultados dejaron ver que ambas variables son estadísticamente independientes.

Tabla 1. Componentes mayoritarios de los aceites esenciales de 12 variedades de *Ocimum* encontradas en Ibagué-Tolima

Variedades	Cinamato de metilo	Linalol	1.8- cineol	Metilchavicol	Eugenol	Metil Eugenol	Transcariofileno	Oxido de cariofileno	Tipo	Subtipo
<b>Canela</b>	79.8	4.4	0.3	12.3				0.6	Cinamato de metilo	
<b>Q. Morada</b>	74.9	4.6	2	6.4		0.9	1.3	0.2	Cinamato de metilo	
<b>D. Castilla</b>	72.4	12.6	10.8	0.5		0.25	0.6	0.6	Cinamato de metilo	
<b>C. Morada</b>	52.2	3	2	5.8		24.2	0.8	0.6	Cinamato de metilo	Cin->metil eugenol
<b>H. Grandes</b>	25.2	33	2.6	0.4	4.1	0.3			Linalol	Linalol >cin. metilo
<b>Z. Morada</b>	62.8	13.3	1.6	7.3		1.3	0.4	0.1	Cinamato de metilo	
<b>B. Compacta</b>	39.5	20.6	14.6	0.5		0.5			Cinamato de metilo	Cin>Linalol / >1.8-cineol
<b>Cr. Morada</b>	66.4	16.5	8.3	0.7		0.4	0.6		Cinamato de metilo	Cin>Linalol
<b>Cr. Blanca</b>	35.3	15.9	13.8	0.5		1.5	1.2	0.3	Cinamato de metilo	Cin>Linalol / >1.8-cineol
<b>Clavo</b>	8.7	0.8		1.9	1.3	26	43	13.9	Transcariofileno	
<b>V. Morada</b>	38.8	19.9	9	1.1					Cinamato de metilo	Cin>Linalol
<b>V. Pequeña</b>	41	20.3	2.7	1.9				0.5	Cinamato de metilo	Cin>Linalol

Las observaciones anteriores motivaron el diseño de una segunda prueba, que confirmara o negara las percepciones captadas en la prueba de contacto. En tal sentido, se hizo una evaluación del "desarrollo larval" de *Musca domestica* aplicando a su dieta el aceite en concentraciones de 500,1000 y 1500 ppm. Este ensayo corroboró lo evidenciado en la prueba anterior; todo lo cual permitió inferir que la actividad insecticida del aceite esencial de *O. micranthum* frente a adultos de *M. domestica* no depende del microambiente (A.D., A.S.C. y A.M.) donde se desarrolle el vegetal ni del método de extracción aplicado (HD o ESPN) en la obtención de sus volátiles.

**Actividad repelente** : con el propósito de determinar la influencia del método extractivo (HD y ESPN) y el hábitat (A.S.C., A.D. y A.M.) en la variable respuesta (número de moscas atraídas hacia cada trampa) se hizo un análisis multivariado de varianza (MANOVA) el cual permitió inferir que no existe diferencia significativa entre los métodos de extracción ( $P > 0.05$ ); sin embargo, el hábitat parece influir de manera significativa ( $P < 0.05$ ); es decir que existe diferencia en relación con el microambiente donde se desarrolle *O. micranthum*.

Puesto que MANOVA no deja ver cuál hábitat ejerce mayor influencia en el potencial repelente de los volátiles de la planta y cuál lo es menos, esta generalidad la resuelve un "análisis de componentes principales" el cual condensa toda la información del experimento en cuatro factores (F1 – F4). Las varianzas hacen mayor aporte a F1 y F2. Se pudo establecer que el 43.2% del total de las varianzas originales contribuyen a F1 y el 28.03% a F2, por esta razón en el análisis de los resultados se tomó a F1 como variable respuesta y sobre él se aplicó un análisis de varianza de doble vía (dos factores: métodos y hábitat) con el fin de encontrar la significancia. Los dos factores expresan, en dimensión reducida, la información en varianza obtenida a través de las cuatro trampas. La Figura 2 se construyó con el propósito de ilustrar el aporte de las variables en el plano de F1.

Se observó que las trampas con carne + repelente comercial (2) y aceite (4) son las más asociadas a F1 (0.90 y 0.92, respectivamente), esto significa que la actividad repelente del aceite esencial de *O. micranthum* es semejante a la del repelente químico. De lo cual podría inferirse que el aceite esencial puede no sólo sustituir al producto químico sino que además muestra ventajas adicionales como son: biodegradabilidad, ausencia de contaminación ambiental, bajo costo de producción, simplicidad en las condiciones de cultivo de la planta y un recurso natural contra una plaga tan perjudicial como lo es

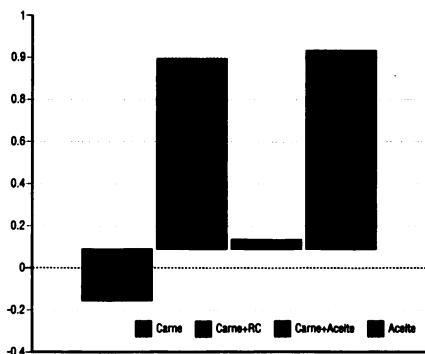


Figura 2. Distribución del grado de correlación de las trampas con el factor F1 (Carne + R.C., Aceite).

*M.domestica*. Se hizo entonces, un "análisis de varianza de doble vía" [métodos de extracción (1,2) y hábitat (1, 2, 3)], con el fin de establecer diferencias significativas por método y por hábitat. Los resultados mostraron que los métodos de extracción no son significativos.

Con base en el estadístico de prueba F, para el hábitat, se concluyó que no existen notorias diferencias entre la albahaca domesticada (AD) y la de monte (AM), pero estas dos comparadas con la albahaca silvestre cultivada (ASC) resultan significativamente diferentes. Los datos permiten inferir que *O. micranthum* desarrollada en forma silvestre, es la que atrae más a *M. domestica*, por lo tanto es la menos repelente del insecto; por el contrario, la planta manifiesta su actividad repelente con mayor fuerza cuando se desarrolla en el monte (hábitat natural); sin embargo, si se le cultiva bajo condiciones agrícolas controladas su potencial repelente resulta semejante al del vegetal desarrollado en forma agreste.

En la Tabla 2 se observa la composición porcentual de los constituyentes mayoritarios del aceite esencial de *O. micranthum* en los tres hábitats de desarrollo, comparado con los resultados obtenidos en el trabajo que le antecede, así como también los respectivos índices de retención en columna apolar.

En la Tabla 2 se observa que cuando *O. micranthum* se desarrolló bajo condiciones naturales (A.M.) y sus volátiles resultaron constituidos por 17% de cinamato de metilo, el doble de metil chavicol y baja cantidad de 1,8-cineol y linalol, la planta evidenció la mayor actividad repelente frente al insecto. También es notorio que en la albahaca silvestre cultivada (A.S.C.) el contenido de metil chavicol fue similar al del linalol, casi tres veces inferior al del cinamato de metilo y el componente mayoritario es el 1,8-cineol (25.19%), en este caso la actividad evidenciada por la planta es la más baja. Sin

Tabla 2. Compuestos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de *O. micranthum* desarrollada en diferentes hábitat.

Componentes mayoritarios	A.D.	A.S.C.	A.M.	Murillo et.al/2000	I.K
1,8-cineol	15.42	25.19	3.13	0.3	1033
Linalol	1.27	1.21	3.81	4.4	1098
Metilchavicol	11.92	1.93	34.47	12.3	1253
Cinamato	12.25	6.12	16.68	80	1379 (E)- 1301 (Z)
Proporción	12:1:9:10	21:1:2:5	1:1:9:4	trazas: 1:3:18	

I.K: Índice de Kovats

embargo, en tanto la proporción relativa del 1,8-cineol, el metil chavicol y el cinamato se mantengan cercanas y el linalol aparezca en proporción relativamente baja (1.27%), el vegetal puede evidenciar una actividad repelente semejante a la albahaca de monte, es el caso de la albahaca domesticada (A.D.). Resulta importante hacer mención que de los cuatro componentes mayoritarios, el cinamato de metilo es el único no reportado con actividad repelente y al 1,8-cineol no se le conoce acción insecticida. (Duke, 2001).

## Conclusiones

- El potencial insecticida de *Ocimum micranthum* W. no parece guardar relación con el hábitat de la planta ni con el método de extracción de sus volátiles. Por el contrario, podría pensarse que el medio natural donde se desarrolle el vegetal puede influir de manera directa en la actividad repelente de la planta frente a *Musca domestica*, a su vez éste influiría significativamente en la dominancia de los constituyentes químicos que conforman sus volátiles.

- El método de extracción del aceite esencial no parece influir en la actividad repelente evidenciada por la planta.
- La actividad repelente del aceite esencial de *O. micranthum* podría guardar relación con el contenido de metil chavicol en su aceite esencial.

## Referencias bibliográficas

- ADAMS, R. P. 1995.** Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation Carol Stream, Illinois (USA). 468p.
- BHATTACHARYYA, P. R; BORDOLOI, D.N. 1986.** Insect growth retardant activity of some essential oil bearing plants. Indian Perfumer.30 (2/3) 361-371. Regional Research Laboratory, Jorhat 785 006, India.
- CASERES, A; FIGUEROA, L. 1993.** Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 2. Evaluation of activity of 16 plants against gram-positive bacteria. Journal of Ethnopharmacology. 39 (1) 77-82. Faculty of Chemical Sciences and Pharmacy, University of San Carlos. Ciudad Universitaria. Guatemala.
- DUBEY, N K; KISHORE, N. 1987.** Fungitoxicity of some higher plants and synergistic activity of their essential oils. Tropic science.27 (1). 23p.
- DUBEY, R.C. 1991.** Fungicidal effect of essential oils of three higher plants on sclerotia of *Macrofomina phaseolina*. Indian phytopatology. 44. 214p.
- DUKE, J.A. 2001.** Phytochemical and ethnobotanical Databases.Agricultural Research Service. [http://www.ars-gnn.gov/cgi-dm/duke/chemical\\_activity.pt](http://www.ars-gnn.gov/cgi-dm/duke/chemical_activity.pt).
- FAZAL, M.; HUSAIN, S.I. 1991.** Studies on nematocidal effect of *Ocimum sanctum* and *Thuja orientalis*. New Agriculturist. 1 (2); 111-112.
- KAYITARE, J; NTEZURABANZA.1991.** Estudio de la toxicidad de *O. americanum* a bruchidos de frijol.
- KONDJOYAN, N.; BERDAGUÉ, J-L.1996.** A Compilation of Relative Retention Indices for the Analysis of Aromatic Compounds. Edition du Laboratoire Flaveur.
- MORENO, B. G. V.; TAMAYO, C. C. H.; ESTRADA, E. I. 1987.** Acta Agronómica, Universidad Nacional de Colombia. 37, 34.
- MURILLO, E.; VIÑA, A.; CORREA, I.L. 2002.** Actividad antifúngica y composición química del esencial de doce variedades de *Ocimum sp* cultivadas en Ibagué-Colombia. Revista Internacional aceite CIT. Información Tecnológica. Vol. 13 Nº 1.
- SINGH,R.P.; TOMAR, S.S.;DEVAJUMAR, C.; GOSWAMI, B.K.; XAXENA,D.B. 1991.** Nematicidal efficacy of some essential oils against *Meloidogyne incognita*. Indian Perfumer. 35 (1): 35-37.
- THOMAS, O. .O. 1989.** Actividad antimicrobial del extracto acuoso de hojas y flores contra *Staphylococcus aureus*, *E.coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Candida albicans*.



# EXTRACTOS VEGETALES COMO REPELENTES PARA MANEJAR PLAGAS: ESTUDIOS DE CASO CON *Bemisia tabaci* E *Hypsipyla grandella*

Luko Hilje

Unidad de Fitoprotección  
Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE)  
Turrialba, 7170, Costa Rica  
e-mail: lhilje@catie.ac.cr

**CATIE**



## INTRODUCCION

El cuestionamiento del modelo convencional de producción agrícola, por ser insostenible económica y ambientalmente, ya que es muy dependiente de los plaguicidas, ha conducido en forma paulatina a la búsqueda de nuevas concepciones y prácticas sobre cómo enfrentar los problemas de plagas. En Mesoamérica, éstas hoy se enmarcan dentro del paradigma de desarrollo sostenible, y de la noción y prácticas del manejo integrado de plagas (MIP).

A su vez, éste contempla, con fundamento en la coevolución de los insectos herbívoros y sus plantas hospedantes, la búsqueda y utilización de principios activos naturales (insecticidas, repelentes, atrayentes, etc.) para el combate de los insectos que son plagas de los cultivos y plantaciones forestales. Esto es de particular importancia para los países tropicales, debido a su rica biodiversidad vegetal (Wilson 1988, Reid *et al.* 1993), poca de la cual ha sido explorada y aprovechada para el manejo de plagas (Hilje y Hanson 1998). En particular, en la región neotropical, la alta tasa de deforestación actual crea el riesgo de que muchos genes y organismos desaparezcan sin que se llegue a conocer su valor (Wilson 1988). No obstante, debe reconocerse que también podría haber biodiversidad valiosa en sistemas intervenidos por el hombre (agrobiodiversidad).

Una de las mejores maneras de aprovechar esta rica biodiversidad es explorar, identificar y utilizar sustancias derivadas de plantas en programas de MIP orientados hacia plagas agrícolas y forestales claves (Hilje y Hanson 1998). Por ejemplo, en las plantas son frecuentes los metabolitos secundarios con funciones defensivas contra insectos, tales como alcaloides, aminoácidos no proteicos, esteroides, fenoles, flavonoides, glicósidos, glucosinolatos, quinonas, taninos y terpenoides (Harborne 1977, Panda y Khush 1995).

De hecho, históricamente, aunque varios de los primeros insecticidas utilizados provenían de plantas, como la ryania (*Ryania speciosa*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*), el derris o timbo (*Derris* spp.), el hombre grande (*Quassia amara*) y la sabadilla (*Schoenocaulon officinale*), su uso perdió vigencia en los años 50, con la aparición de los insecticidas sintéticos, pues las sencillas moléculas de éstos permitían producirlos a escala industrial y un costo relativamente bajo. En la actualidad, los únicos insecticidas botánicos utilizados ampliamente son los derivados de la semilla del árbol de nim (*Azadirachta indica*, Meliaceae), originario de Asia (Schmutterer *et al.* 1982).

Sin embargo, hay un interés creciente y palpable de la industria agroquímica por productos con nuevos modos de acción, ya sea con el empleo del producto natural *per se*, como sucede con el nim, o de moléculas sintéticas, análogas a las naturales (Hall y Menn 1999). Esto obedece, en gran medida, a la difusión y aceptación del paradigma del desarrollo sostenible, así como de concepciones y prácticas de producción ambientalmente benignas, como la agricultura orgánica. Ello abre posibilidades para el aprovechamiento de numerosas especies de plantas tropicales que ofrecen un potencial, poco o nada explorado, como fuentes de principios activos para el combate de insectos plagas (Grainge y Ahmed 1988, Stoll 1989).

### **POTENCIAL DE LOS REPELENTE EN EL MIP**

Las alomonas vegetales se pueden clasificar como *repelentes*, *supresivas*, *disuasivas*, *antibióticas* y *anorexigénicas* (Wharten y Morgan 1990). Las sustancias incluidas en las primeras tres categorías interfieren con la habilidad de un insecto para localizar las plantas, alimentarse y ovipositar en ellas. Aunque existe una amplia lista de especies vegetales con este tipo de propiedades (Grainge y Ahmed 1988, Stoll 1989, Wharten y Morgan 1990), muchas referencias son más bien anecdóticas y requieren confirmación científica.

A pesar del interés de la industria agroquímica por los bioplaguicidas y productos afines, es notorio el escaso interés por productos *repelentes* (sustancias que actúan a distancia, alejando a los insectos adultos) o *disuasivos* (sustancias que inhiben la alimentación o la oviposición, una vez que el insecto ha entrado en contacto con ellas). Esto se explica porque, en realidad, su producción comercial es tan compleja y cara como la de un insecticida, y su efecto no anula un problema de plaga, sino que lo transfiere a los productores vecinos (Schoonhoven 1982).

Sin embargo, a pesar de estos inconvenientes, este tipo de sustancias podrían jugar un papel muy importante contra insectos que tienen un umbral económico muy bajo, es decir, que con muy pocos individuos causan un daño muy serio e irreversible. Tal es el caso de la mosca blanca, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae) y el gusano barrenador de las meliáceas, *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae), que en la actualidad son las principales plagas en los campos agrícola y forestal en el continente americano, respectivamente, por lo que su manejo es de verdadera relevancia económica y social.

En ambos casos, el daño causado por apenas un individuo puede causar pérdidas irreversibles, de modo que no tendría sentido matar al insecto una vez que el daño está hecho. Para *B. tabaci* como vector de geminivirus en tomate, basta con un umbral de apenas 0,3 adultos/planta (es decir, un adulto por cada tres plantas) para causar un 100% de incidencia de virosis (Hilje 2001). Para *H. grandella*, el umbral es de apenas una larva por árbol, ya que ésta perfora el brote principal y causa bifurcaciones que impiden el aprovechamiento comercial del fuste resultante (Newton et al. 1993).

*B. tabaci* es considerada como la principal plaga agrícola mundial, pues ataca unos 25 cultivos de gran valor comercial (tomate, chile, frijol, ayote, melón, sandía, soya, algodón, etc.). Por ejemplo, en el último decenio en Costa Rica las pérdidas en varios cultivos han sido serias, debido al impacto del complejo mosca blanca-geminivirus. En el caso del tomate, en el Valle Central, que es la principal zona productora del cultivo, muchos agricultores abandonaron la siembra del cultivo y, donde esto no ocurrió así, el

rendimiento promedio disminuyó de 35 a 21 t/ha. Entre 1992-1995 las pérdidas variaron entre 20-80%.

Por su parte, *H. grandella* es una plaga muy seria, pues ataca maderas preciosas, como las caobas (*Swietenia* spp.) y los cedros (*Cedrela* spp.), las cuales son escasas por haber sido sobreexplotadas, históricamente. Una forma de disminuir la presión sobre los bosques naturales y suplir suficiente cantidad de estas maderas es el establecimiento de plantaciones comerciales extensas. Sin embargo, en el continente americano dichos esfuerzos han fracasado debido al ataque de *H. grandella*, cuya distribución comprende casi todo el continente. Aunque se han investigado numerosas opciones para el manejo integrado de esta plaga (Grijpma 1973, Whitmore 1976a, 1976b), sus resultados han sido poco factibles en términos operativos y económicos (Hilje y Cornelius 2001).

Por tanto, para *B. tabaci* como para *H. grandella*, es necesario y hasta urgente desarrollar programas innovadores de MIP, basados en una estrategia preventiva, ambientalmente benigna y rentable, con una relación satisfactoria de beneficio:costo. Esta podría fundamentarse en sustancias que repelan o disuadan a los adultos o a las formas inmaduras (larvas o ninfas) de ambas plagas.

### LOGROS RECIENTES

En teoría, sería esperable hallar repelencia, fagodisuasión u ovidisuasión en extractos vegetales, por lo que hasta ahora en el CATIE se han evaluado los efectos de más de 50 extractos sobre ambas plagas, incluyendo productos comerciales de origen vegetal y extractos crudos provenientes de follaje, semillas, bulbos, botones florales, frutos y aceites esenciales. Estos se seleccionaron según referencias anecdóticas de agricultores, así como por su poca o nula afinidad taxonómica con los hospedantes más frecuentes de ambas plagas. Los extractos crudos se prepararon a partir de una mezcla con etanol y agua, según los protocolos de extracción empleados en el laboratorio del Centro de Investigaciones en Productos Naturales (CIPRONA, Universidad de Costa Rica).

En el caso de *B. tabaci*, hasta ahora se han realizado tamizados generales con los siguientes extractos (Cubillo et al. 1994, 1997, 1999, Gómez et al. 1997, Hilje & Stansly 2001, Aguiar et al. 2002): ajo (*Allium sativum*, Alliaceae), apazote (*Chenopodium ambrosioides*, Chenopodiaceae), cardamomo (*Elettaria cardamomum*, Zingiberaceae), canavalia (*Canavalia ensiformis*, Fabaceae), cebolla (*Allium cepa*, Alliaceae), ciprés (*Cupressus lusitanica*, Cupressaceae), chile muelo (*Drymis granatensis*, Winteraceae), chile picante (*Capsicum frutescens*, Solanaceae), clavo de olor (*Syzygium aromaticum*, Myrtaceae), culantro de castilla (*Coriandrum sativum*, Apiaceae), culantro coyote (*Eryngium foetidum*, Umbelliferae), eucalipto (*Eucalyptus deglupta*, Myrtaceae), flor de muerto (*Tagetes jalisciensis* y *T. microglossa*), gavilana (*Neurolaena lobata*, Compositae), higuillo (*Piper aduncum*, Piperaceae), hombre grande (*Quassia amara*, Simaroubaceae), indio desnudo (*Bursera simaruba*, Burseraceae), jamaica (*Pimenta dioica*, Myrtaceae), lima (*Citrus limetta*, Rutaceae), madero negro (*Gliricidia sepium*, Fabaceae), menta (*Satureja rimiria*, Labiatae), orégano (*Lippia graveolens*, Lamiaceae), ruda (*Ruta chalepensis*, Rutaceae), sorosí (*Momordica charantia*, Cucurbitaceae), tacaco cimarrón (*Sechium pittieri*, Cucurbitaceae), tefrosia (*Tephrosia vogelii*, Fabaceae), titonia (*Tithonia diversifolia*, Asteraceae) y zacate limón (*Cymbopogon citratus*, Poaceae).

Los experimentos se realizaron en un invernadero en el CATIE, en Turrialba, Costa Rica. Cada extracto se evaluó por separado, a las siguientes dosis: 1, 5, 10 y 15 ml/l agua (0,1, 0,5, 1,0 y 1,5%, v/v) (volumen/volumen), que se compararon con cuatro tratamientos testigos: un aceite repelente (Volck 100 Neutral, 1,5% v/v), un agente tensoactivo (Citowett, 0,25 ml/l), un insecticida (endosulfán, Thiodan 35% CE, 2,5 ml/l), y agua destilada; el Citowett se usó en todos los tratamientos que incluían extractos. Se empleó un diseño de bloques completos al azar, con cuatro repeticiones. Se efectuaron experimentos de *escogencia restringida*, colocando dos macetas, cada una con una planta de tomate (var. Hayslip) con dos hojas verdaderas, dentro de una jaula de manga. Una planta fue asperjada con la respectiva dosis de cada extracto, y la otra lo fue con agua destilada. En el caso del testigo absoluto, una planta se asperjó con Citowett y la otra con agua. Las plantas se introdujeron en las jaulas 30 min después de asperjadas, y en cada jaula se liberaron 50 adultos de *B. tabaci*. El criterio para determinar la *fagodisuasión* fue el número de adultos posados en el follaje a las 48 h, en combinación con el de adultos sobrevivientes en dicho intervalo. La *ovidisuasión* se determinó mediante el recuento de huevos depositados hasta las 48 h.

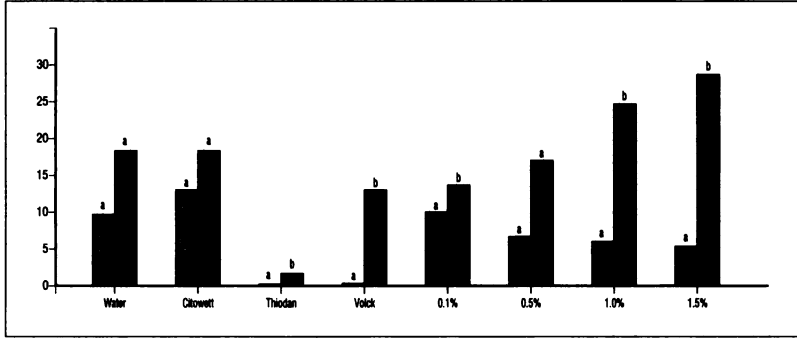
Al menos 12 de estos extractos causaron fagodisuasión, sobresaliendo el madero negro, tacaco cimarrón, apazote, sorosí y hombre grande (Hilje y Stansly 2001). Por ejemplo, el tacaco cimarrón causó fago y ovidisuasión a dosis tan bajas como 0,5% (Fig. 1). La fagodisuasión se detectó por el mucho menor ( $p < 0,05$ ) número de adultos posados en el follaje de las plantas tratadas con el extracto (Fig. 1A). Por su parte, la ovidisuasión se determinó mediante el mucho menor ( $p < 0,05$ ) número de huevos depositados en dichas plantas (Fig. 1B), aunque debe indicarse que ello más bien podría ser un reflejo directo de la cantidad de adultos posados en ese intervalo. El hecho de que el número de adultos sobrevivientes hasta las 48 h no difiriera ( $p > 0,05$ ) del testigo absoluto (agua) (Fig. 1C), revela que su reducción no obedeció a un efecto tóxico del extracto, sino disuasivo.

En realidad, el tipo de diseño experimental no permite establecer comparaciones en cuanto a la eficacia relativa de cada extracto, para lo cual se requieren experimentos de *escogencia irrestricta* (en mesas de invernadero), los cuales se están efectuando. Asimismo, con algunos extractos se están realizando experimentos de campo para determinar si efectivamente estos extractos pueden impedir que *B. tabaci* inocule los geminivirus en las plantas de tomate, para disminuir el impacto de las epidemias virales y lograr rendimientos satisfactorios.

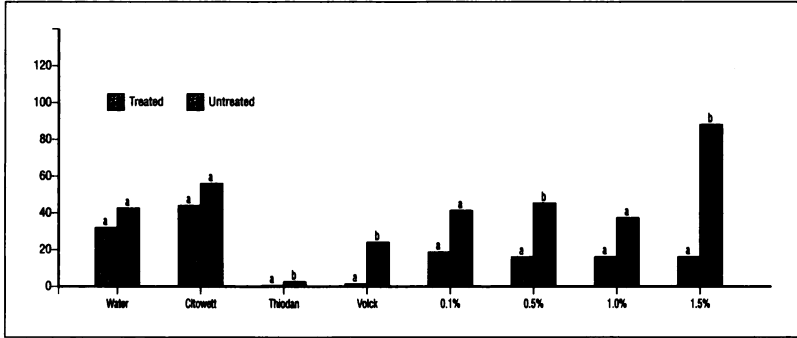
Por su parte, en el caso de *H. grandella* se han evaluado extractos de las siguientes plantas: ajo, apazote, chile muelo, chile picante, clavo de olor, culantro de castilla, culantro coyote, eucalipto, flor de muerto, gavilana, hombre grande, madero negro, menta, orégano, ruda, sorosí, tacaco cimarrón, zacate limón y nim (*Azadirachta indica*, Meliaceae) (Mancebo et al. 2000a).

Para ello se expusieron larvas de instar III sobre discos foliares de cedro impregnados con una sola concentración (10%) de cada extracto. Del tamizado se seleccionaron seis extractos en los que se detectaron posibles efectos fagodisuasivos o inhibidores del desarrollo larval: extractos de madera y follaje de hombre grande, ruda, tacaco cimarrón, y dos productos comerciales (Azatín y Nim 80) derivados del árbol de nim. El extracto de madera de *Q. amara* causó un efecto fagodisuasivo (Fig. 2), mientras que el Azatín mató a las larvas. Estos hallazgos fueron confirmados mediante bioanálisis de laboratorio detallados y complementarios, los cuales también revelaron que el extracto

No. adultos



No. huevos



No. adultos

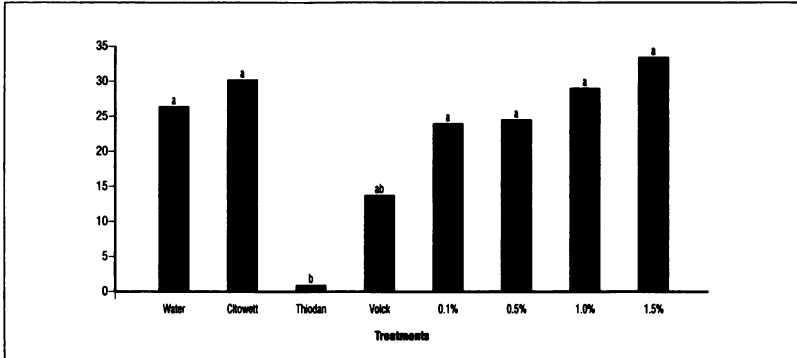


Figura 1. Número promedio de adultos de *B. tabaci* posados (A) y de huevos depositados (B) a las 48 h de aplicado el extracto de tacaco cimarrón (*S. pittieri*), así como el número de adultos muertos (C) en ese intervalo. Los promedios seguidos por una misma letra no difieren estadísticamente ( $P=0,05$ ).

de follaje de hombre grande y de ruda tienen efecto fagodisuasivo, el Nim 80 actúa como regulador de crecimiento, y el tacaco cimarrón mata a las larvas de *H. grandella* (Mancebo *et al.* 2000b, 2001, 2002). Posteriormente estos extractos fueron evaluados a esa misma concentración (10%), en pruebas de invernadero, colocando tres larvas de instar I de *H. grandella* en brotes terminales de cedro previamente tratados con dichos extractos. Los resultados confirmaron los hallazgos previos.

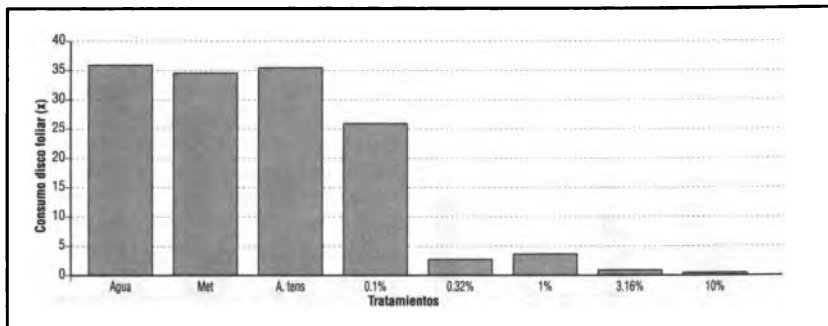


Figura 2. Porcentaje promedio de consumo de discos foliares de cedro tratados con extractos de madera de *Q. amara*, al exponerlos a larvas de tercer instar de *H. grandella* por 24 h.

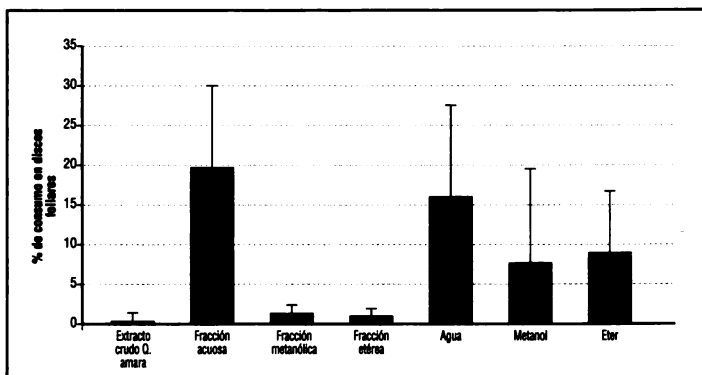


Figura 3. Porcentaje promedio de consumo en discos foliares de cedro tratados con las diferentes fracciones del extracto de *Q. amara*, al exponer larvas de instar III de *H. grandella*, durante 24 h.

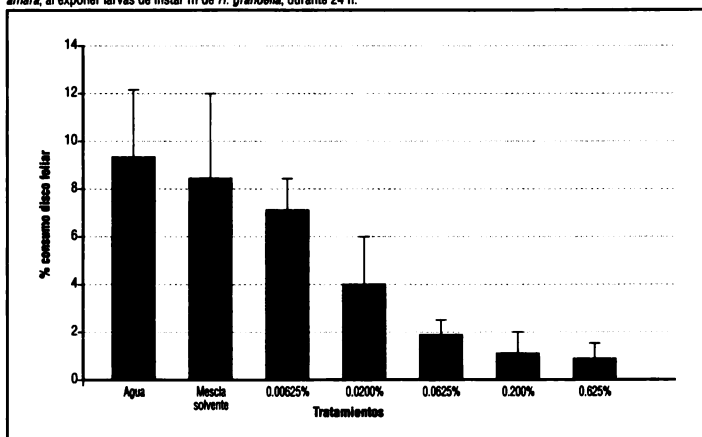


Figura 4. Porcentaje promedio de consumo en discos foliares de cedro tratados con las concentraciones crecientes de la fracción metanólica del extracto de *Q. amara*, al exponer larvas de instar III de *H. grandella*, durante 24 h.

Asimismo, en experimentos posteriores (Soto 2000) se estudió el efecto fagodisuasivo de las fracciones acuosa, metanólica y etérea de un extracto de la madera de hombre grande sobre las larvas. Para ello se efectuó un bioanálisis, exponiendo larvas de instar III a discos foliares de cedro impregnados con las fracciones a varias concentraciones; se realizaron evaluaciones diarias para medir el porcentaje de consumo en los discos, la mortalidad y los efectos en el desarrollo. Este se complementó con un experimento de invernadero, inoculando larvas de instar I en plantas de cedro tratadas con las fracciones, en el brote principal, que permitió medir los efectos de las larvas sobre las plantas (número de orificios, montículos, brotes caídos y túneles).

De ambos experimentos se seleccionaron la fracción metanólica y la etérea, por ser las más prometedoras como fagodisuasivas (Fig. 3), y se realizó un bioanálisis específico para cada una, mediante bioanálisis con larvas de instar III; éstas se expusieron a discos impregnados con concentraciones crecientes de la fracción metanólica (0,00625, 0,02, 0,0625, 0,2, 0,625%) y de la fracción etérea, midiendo el porcentaje de consumo en los discos y la mortalidad a la primera semana después de la exposición. Se determinó que las fracciones metanólica (Fig. 4) y etérea fueron fagodisuasivas para las larvas, y que la primera lo hizo a apenas el 0,0625%, mientras que los resultados para la fracción etérea no fueron claros.

## PERSPECTIVAS

Los resultados descritos, aún bastante preliminares, indican claramente que varios extractos de plantas neotropicales contienen sustancias que actúan como disuasivos de *B. tabaci* e *H. grandella*. Aunque contra ambas plagas sería preferible utilizar repelentes, ya que éstos impedirían a la hembra alimentarse o depositar sus huevos en las plantas, evitando así el daño a éstas, las sustancias disuasivas también tienen un potencial importante, inhibiendo la alimentación o la oviposición.

Es decir, ellos ofrecen un valioso potencial para el desarrollo de programas preventivos e innovadores de MIP. Aunque podrían utilizarse de manera rústica, especialmente en fincas de pequeños productores, también podrían dar origen a insecticidas con nuevos modos de acción. Asimismo, estos extractos se podrían formular, en estado puro o semi-puro, como productos de liberación controlada, las cuales se aplicarían solamente durante el **período crítico** de cada cultivo, que en hortalizas corresponden a las primeras 5-8 semanas desde la siembra, y en las caobas y cedros a los primeros seis años de establecida una plantación.

No obstante, un requisito obvio es que dichos principios no deben ser tóxicos para las personas (agricultores y consumidores), ni para la biota silvestre. Afortunadamente, varios de ellos, como el hombre grande y la ruda, son inocuas para las personas (y posiblemente para la mayoría de los animales vertebrados y muchos invertebrados), ya que incluso se utilizan en la medicina tradicional.

Una ventaja adicional es que la mayoría se presta para ser sembrada y propagada en amplia escala, ya sea en áreas abiertas, en sistemas agroforestales, o enriqueciendo los bosques naturales, especialmente en reservas indígenas, como sucede con el hombre grande (Ocampo 1995). Sin embargo, como parte de su rentabilidad, debería considerarse la facilidad, disponibilidad temporal y el costo económico de cosechar la estructura vegetal que aporta el extracto (madera, fruto o follaje), así como el grado de pureza (sustancia pura o semi-pura, fracciones o extractos crudos) necesario para lograr la eficacia deseada.

Hasta ahora en el CATIE, que no tiene la capacidad técnica para involucrarse en la producción comercial de repelentes/disuasivos, están empezando a perfilarse alianzas no solamente con entidades de investigación como el CIPRONA y el INBio (Instituto Nacional de Biodiversidad), sino también con empresas locales que manufacturan productos químicos, como RIMAC y ChemTica International.

Eventualmente, estos esfuerzos, además de agregar valor a productos derivados de la rica biodiversidad vegetal neotropical, permitirían que los repelentes/disuasivos formulados y comercializados disminuyeran los riesgos de residuos en los alimentos, aguas continentales y marinas, y suelos, de intoxicaciones laborales, y del efecto adverso sobre los enemigos naturales de las plagas. El beneficio inmediato lo recibirían los productores agrícolas y forestales, ya que se estaría contribuyendo a la sostenibilidad de los sistemas agrícolas y forestales tropicales. Pero, además, esta experiencia y los productos obtenidos podrían constituirse en un modelo que podría ser capitalizado por investigadores y productores agrícolas y forestales en muchos países extra-continenciales, para el manejo de estas y otras plagas.

## REFERENCIAS

- Aguiar, A. Kass, D.C. Mora, G.A. Hilje, L. 2002.** Fagodisuasión y ovidisuasión causadas por tres extractos vegetales sobre los adultos de *Bemisia tabaci*. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica).
- Cubillo, D. Larriva, W. Quijije, R. Chacón, A. Hilje, I. 1994.** Evaluación de la repelencia de varias sustancias sobre la mosca blanca, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 33: 26-28.
- Cubillo, D. Sanabria, G. Hilje, L. 1997.** Mortalidad de adultos de *Bemisia tabaci* con extractos de hombre grande (*Quassia amara*). Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 45: 25-29.
- Cubillo, D. Sanabria, G. Hilje, L. 1999.** Evaluación de la repelencia y mortalidad causada por insecticidas comerciales y extractos vegetales sobre *Bemisia tabaci*. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 53: 65-71.
- Gómez, P. Cubillo, D. Mora, G.A. Hilje., L. 1997.** Evaluación de posibles repelentes de *Bemisia tabaci*: II. Extractos vegetales. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). 46: 17-25.
- Grainge, M. Ahmed, S. 1988.** Handbook of plants with pest-control properties. John Wiley & Sons, New York. 470 p.
- Grijpma, P. (ed.). 1973.** Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller). Lep., Pyralidae. Vol. I. IICA Misc. Publ. No. 101. 91 p.
- Hail, F.R. Menn, J.J. 1999.** Biopesticides: Use and delivery. Humana Press, New Jersey. 626 p.
- Harborne, J.B. 1977.** Introduction to ecological biochemistry. Academic Press, London. 243 p.



- Hilje, L. 2001.** Avances hacia el manejo sostenible del complejo *Bemisia tabaci*-geminivirus en tomate, en Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 61: 70-81.
- Hilje, L. Cornelius, J. 2001.** ¿Es inmanejable *Hypsipyla grandella* como plaga forestal? Hoja Técnica No. 38: i-iv. (Unidad de Fitoprotección, CATIE).
- Hilje, L. Hanson, P. 1998.** La biodiversidad tropical y el manejo integrado de plagas. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 48: 1-10.
- Hilje, L. Stansly, P.A. 2001.** Development of crop associations for managing geminiviruses vectored by whiteflies in tomatoes. Final Report. U.S. Department of Agriculture (USDA). CATIE. Turrialba, Costa Rica. 132 p.
- Mancebo, F. Hilje, L. Mora, G.A. Salazar, R. 2000a.** Efecto de extractos vegetales sobre larvas de *Hypsipyla grandella*. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 55: 12-23.
- Mancebo, F. Hilje, L. Mora, G.A. Salazar, R. 2000b.** Antifeedant activity of *Quassia amara* (Simaroubaceae) extracts on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. Crop Protection 19(5): 301-305.
- Mancebo, F. Hilje, L. Mora, G.A. Castro, V.H. Salazar, R. 2001.** Biological activity of *Ruta chalepensis* (Rutaceae) and *Sechium pittieri* (Cucurbitaceae) extracts on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. Revista de Biología Tropical 49(2): 501-508.
- Mancebo, F. Hilje, L. Mora, G.A. Salazar, R.** Biological activity of two neem (*Azadirachta indica* A. Juss., Meliaceae) products on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. Crop Protection 21 : 107-112.
- Newton, A.C. Baker, P. Ramnarine, S. Mesón, J.F. Leakey, R.R.B. 1993.** The mahogany shoot borer: Prospects for control. Forest Ecology and Management 57: 301-328.
- Ocampo, R.A. (ed.). 1995.** Potencial de *Quassia amara* como insecticida natural. Serie Técnica. Informe Técnico No. 267. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 185 p.
- Panda, N. Khush, G.S. 1995.** Host plant resistance to insects. CAB International-IRRI. Wallingford, United Kingdom. 431 p.
- Reid, W.V. Laird, S.A. Meyer, C.A. Gámez, R. Sittenfeld, A. Janzen, D.H. Goliin, M.A.; Juma, C. 1993.** La prospección de la biodiversidad: el uso de los recursos genéticos para el desarrollo sostenible. WRI-INBio-Rainforest Alliance-ACTS. 387 p.
- Schmutterer, H. Ascher, K.R.S. Rembold, H. (eds.). 1982.** Natural pesticides from the neem tree (*Azadirachta indica* A. Juss). GTZ. Eschorn, Germany. 297 p.
- Schoonhoven, L.M. 1982.** Biological aspects of antifeedants. Entomologia experimentalis et applicata 31: 57-69.
- Soto, F. 2000.** Efectos de extractos vegetales sobre larvas de *Hypsipyla grandella* (Zeller) y su sistemicidad en árboles de cedro. Tesis Mag. Sci., CATIE, Turrialba, Costa Rica. 104 p.

- Stoll, G. 1989.** Protección natural de cultivos en las zonas tropicales. Alemania Federal. Ed. Científica Josef Margraf. 184 p.
- Warthen, J.D. Morgan, E.D. 1990.** Insect feeding deterrents. In E.D. Morgan & N.B. Mandava (eds.) CRC Handbook of natural pesticides, Vol. 6: Insect attractants and repellents. Boca Raton, Florida, CRC Press. p. 23-134.
- Whitmore, J. L. (ed.). 1976a.** Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller). Lep., Pyralidae. Vol. II. IICA Misc. Publ. No. 101. 139 p.
- Whitmore, J. L. (ed.). 1976b.** Studies on the shootborer *Hypsipyla grandella* (Zeller). Lep., Pyralidae. Vol. III. IICA Misc. Publ. No. 101. 116 p.
- Wilson, E.O. 1988.** Biodiversity. National Academy Press, Washington, D.C. 521 p.

# Organic and Transition Bananas: Experience With Effective Microorganisms (EM)

P. Tabora, S. Okumoto and F. Elango <sup>1</sup>

<sup>1</sup>EARTH University,  
P. O. Box 4442-1000, San Jose, Costa Rica  
e-mail: ptabora@earth.ac.cr

**CATIE**



## Abstract

Since 1993, several organic banana production models and strategies have been established at EARTH University in Costa Rica in order to provide experience for its academic program as well as its commercial operations. The experience includes work on the management of black sigatoka disease (*Mycosphaerella fijiensis*) and the burrowing nematode (*Radopholus similis*), the use of bokashi as an organic soil amendment, the use of different varieties, etc. The strategies include the use of effective microorganisms as a major component of the experience which has shown its contributions in both the organic regimen and the transition to organic models, enabling the control of black sigatoka fungus (*Mycosphaerella fijiensis*) and the burrowing nematodes (*Radopholus similis*). An understanding of the nutritional needs of organic bananas has also been made clearer.

**Keywords:** Bananas, Radopholus, Black Sigatoka, Bokashi, Agroforestry

## Introduction

Several pesticides used by the banana industry to control diseases such as black sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) and the toppling-over disease (*Radopholus similis*) continue to pose environmental problems and are also the most costly operations in banana production. Thus, strategies that allow the reintroduction of microbial biodiversity into the soil and the environment in general in order to lessen the impact and costs have motivated our work on bananas using effective microorganisms (EM).

EARTH University is located in the "banana belt" of Costa Rica and it has its own commercial operations of 350 hectares. By virtue of its mission towards the development of sustainable agriculture, it has therefore embarked on research activities towards sustainable banana production. Several models have been established either as research areas and as demonstration plots. This paper reports some of these experiences.

While several plots, some as student research projects, were established for some experiments, a number of other experiential research activities were carried out on our 300 ha commercial banana farm.

The following data were collected since 1993. These experiences have enabled us to construct some new banana production/management models which we highlight hereunder.

### Materials and Methods

While several plots, some as student research projects, were established for some experiments, a number of other experimental research activities were carried out on our 300 ha commercial banana farm. The following data were collected since 1993. We also collected data from other commercial farms and we call these experiential activities. The data were collected as part of the regular monitoring activities of these farms.

The data on black sigatoka disease are based on the Stover (1987) modified by Gauhl (1992) system which counts the characteristic elongated streaks on the leaves per unit area and are recorded on the basis of less than 5% or more than 5% at the time of floral bud appearance and later at 10 weeks from bud appearance of just a few weeks to harvest. Severity is based on an index that rates infection beyond 5% on different stages of the plants and summing them up to give a total severity rating. Data are on a weekly basis indicated from weeks 1 to 52 of the year.

The data on *Radopholus similis* nematodes are based on microscopic counts per 100 grams of roots in samples about 30 cm from the base of the follower-sucker plant and about 30 cm depth of the soil.

Data on varieties were obtained from the planting of the same ages, but we report only the data from the Highgate variety which gave better results. These are the indicative data based on commercial parameters taken at the packing house.

### Results and Discussion

#### *Field experiences on Black Sigatoka (Mycosphaerella fijiensis).*

From what we reported the 1998 IFOAM Conference in Argentina, we now have a commercial field experience on the management of black sigatoka under a transitional strategy. Results indicate that when EM is applied in the environment (Kopemaz Farm), there is a net gain of 1.0 -1.5 leaves at harvest time (Fig. 1) and a reduction in the severity of infection (Fig. 2) of Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*).

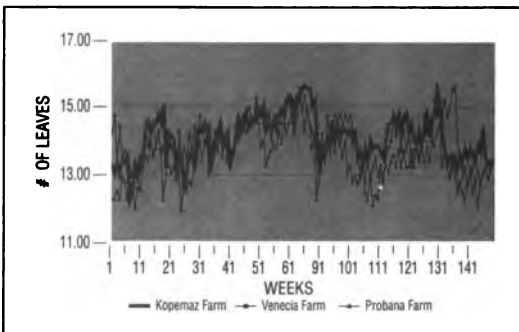


Figure 1. Total number of uninfected leaves at flower-bud appearance and at harvest time (period from 1998 to 2002), between a farm in transition (with EM treatment, in bold/green line) and two adjacent conventional farms (without EM treatment, in blue and violet simple lines)

EM lixivates were applied about weeks 31-41 and the response began to appear on week 60 when it was observed by the field workers that the disease was virtually minimal on the leaves. This meant a net gain of 1 – 1.5 leaves which also translates into a net gain of 1.5 – 2.0 kg. of harvestable banana fruits totaling some 3,000 to 4,000 kg. or about 200 exportable boxes per hectare per year. This field experience has allowed a farmer to reduce his chemical sprays by having them spaced further apart, without any reduction in number of leaves (9-11at harvest and 13-15 at bud appearance). In 1998 we reported that for the organic regimen, 9.0 leaves were obtained at bud appearance in the organic regimen with EM applications, which was 3 more leaves than those from the control (no applications of any kind) . This time, with a transitional bananas (chemicals + EM) we have 12-13 leaves, and this is 1.0 – 1.5 leaves more than the conventional bananas (with only the chemicals).

As can be seen, the Kopemaz farm (with EM) had less instability. The number of leaves never went below 12. In the adjacent farms (Provana and Venecia Farms) number of leaves went down to 11. In the Kopemaz Farm, after week 41 when EM was applied all over, there were only 45 days when leaves at harvest were less than leaves at shooting time, whereas, with Provana and Venecia Farms there were 60 and 75 days, respectively, indicating much less severity with the Kopemaz Farm, and much more in the other farms.

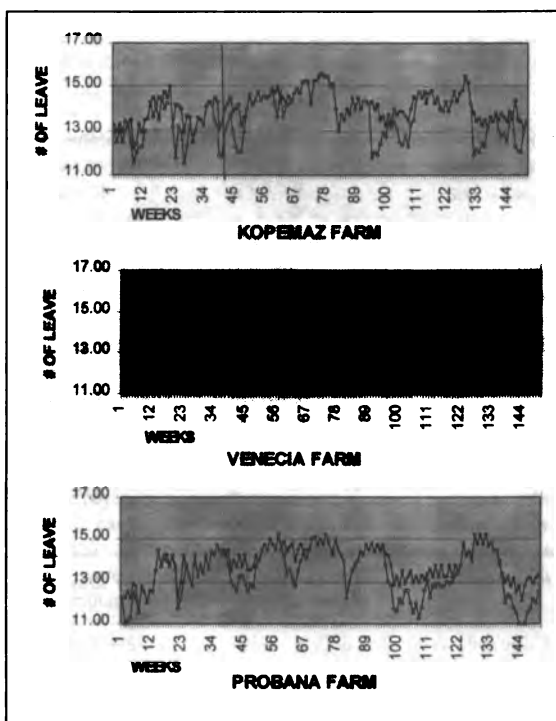


Figure 2. Severity of black sigatoka in the farm with the EM Regimen and in the two adjacent farms (continuous lines represent the number of leaves with less than 5% infection at bud shooting; lower discontinuous yellow lines, 5% infection at 10 weeks from shooting, indicating a severe damage).

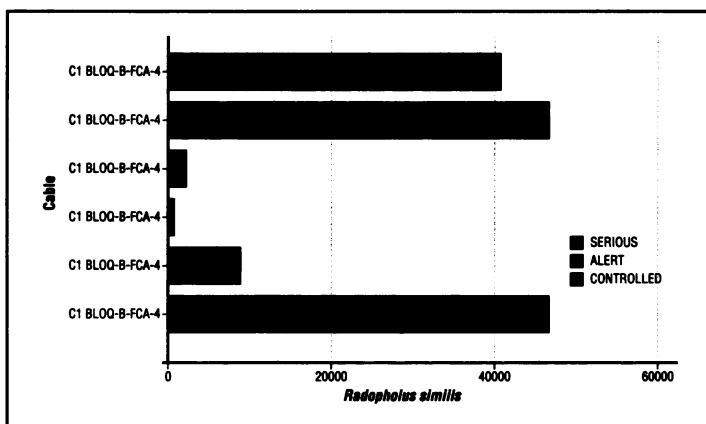
**Field experiences the toppling-over disease (*Radopholus similis*), soil biodiversity and root health**

From what we reported in the 1997 Nature Farming Conference in Thailand and also the 1998 IFOAM Conference in Argentina, we now have additional field experience on the management of nematodes. The population of *Radopholus* nematode is reduced when organic matter is applied at rates of about 20 tons per hectare (Fig. 2). Root biomass increases and percentage of infection is reduced. The effect is sustained over time for more than one year. The data for Figure 2 were obtained three years after the application of organic matter.

We reported in 1998 that the nematodes are suppressed in numbers to very negligible counts just two months after the application, and that the suppression held firm for as long as nine months. This time we have this experience of suppression for as long as three years.

**Table 1 and Figure 3.** Percentage of functional roots and number of *Radopholus similis* obtained per 100 g. of roots, EARTH Commercial Banana Farm, February 2002.

Cable in every farm	Total root weight (g)	Weight of functional root (g)	% F.R.	<i>Radopholus</i> sp per 100 (g)	<i>Helicotylenchus</i> sp per 100 (g)	Total Nematodes
C1-BLOQ-B-FCA-4	37	30	81	46800	0	46800
C1-BLOQ-B-FCA-4	45	37	82	8800	0	8800
C1-BLOQ-B-FCA-4	44	37	84	0	0	7600
C1-BLOQ-B-FCA-4	27	25	93	2000	2400	4800
C1-BLOQ-B-FCA-4	48	34	71	47200	2000	49200
C1-BLOQ-B-FCA-4	70	44	63	40800	4000	44800
Monthly average	45	35	79	24267	1400	27000



The blocks with none or very few *Radopholus* are the blocks with initial organic matter application and then sprayed with EM. This was later applied with Bokashi after the plants were established. While the data presented was taken in February 2002 the applications were done in 1998.

There is an on-going debate over a nematode root infection/phytotoxicity complex. It is believed that root infection is partly due to Fe, Mn and Zn phytotoxicity. This phytotoxicity probably triggers the infection of nematodes and therefore there is an initial condition that favors nematode attack.

We analyzed the soils without Bokashi and Fe, Mn and Zn were about twice higher (Table 2). Inversely, there is higher Potassium, Nitrogen and Phosphorus on the soils where Bokashi had been applied.

**Table 2.** Soil analysis of organic vrs conventional banana production systems

Production Systems	pH	Ext. Ac.	CIC	K Cmol+/Kg	Ca	Mg	P	Ca	Zn PPM	Fe	Mn	C	N %	MO
Organic	5.91	0.37	16.17	0.56	4.83	2.21	41.80	9.82	5.96	114.64	5.63	5.78	0.13	9.94
Conventional	5.50	0.33	24.91	0.18	4.99	1.92	35.16	13.73	31.11	195.91	9.76	6.36	0.06	10.94

Organic matter notably complexes with Iron and where organic matter is high, Iron binding and immobilization is high (Schertmann, et al, 1986) to form iron oxides with the organic matter.

### *Experience on yields of the Highgate, Valery, Yangambi and Grand Naine varieties under an Organic Agroforestry System*

The Highgate variety was discovered only after the Valery variety was popularized because the latter was resistant to the Panama Wilt disease (*Fusarium oxysporum f. sp. cubense*) whereas Highgate was known as susceptible to Panama Wilt disease. Nonetheless offers some very special qualities.

As a mutant of Gross Michel, the fruits of highgate are just as good as the original Gross Michel, much sweeter than the Cavendish varieties. Highgate is also more precocious than the original Gross Michel, bearing at 11-13 months from planting. We planted the Highgate under a system of a secondary growth forest where the underbrush was cleared and this allowed some 40% sunshine to penetrate the forest floor. Yield results were outstanding as can be seen from the following figures (Table 3).

**Table 3.** Average yield results of the harvest from an organic system using the Highgate variety under an Agroforestry System.

Measurement Basis	
Number of hands of full raceme	12.66
Average caliper grade (thickness of fruits)	40.28 banana caliper index
Average Length of fingers in inches (cm)	9.14 inches (23.3 cm)
Average Number of fingers per hand	18.3
Average weight of fruits.	43.90 Kg.
Average weight of fruits for packing	29.42 Kg.
Average weight of fruits rejected	4.96 Kg.
Average weight of rachis	4.55 Kg.
Equivalent Ratio at Packing (Raceme Per Box)	1.56 boxes per raceme

The above figures translate to a very high quality fruits and a rated yield of about 2,325 boxes per hectare per year, indeed a very respectable yield. The size of the racemes are big because Black Sigatoka which attacks the variety, was not severe. In fact at harvest time some plants still had 12 leaves and the least number was 9 leaves.

The sizes and lengths of the fingers were definitely of excellent export quality sizes and lengths. Much of the rejects were based on bruises due to field growing conditions and the 16.6 % reject is considered normal under these conditions. Thus, a ratio of 1.5 has been obtained, indeed quite high, much more than normal.

Under the same Agroforestry System, we also grew varieties Valery, Yangambi and Grand Naine. The results from Valery come close to the Highgate variety, but we had very few samples to make valid comparisons. The Grand Naine variety was not as vigorous and did not compare well to those of the Highgate variety. This may mean a change in strategies for these varieties, to give good ratings to harvests. The Yangambi variety proved resistant to black sigatoka disease, but, the fruits remained very small and the fingers were not comparable to those of Grand Naine.

### *Bokashi and its impact on yields and costs in commercial operations*

We also reported during the IFOAM 1998 Conference in Argentina that the cost of Bokashi was the highest cost item and that its improvement was key to lowering the costs of the bananas. We now report that the cost of the bokashi (approximately 20 tons) of \$4,500 per ha/crop can come to almost half due to efficiencies in the production and in the distribution system. While there are still more strategies to make bokashi cheaper, the present improvements make the cost of organic bananas already come quite close to that of the conventional crop. This was rated previously as 45% higher and may now dip to only 14% higher (Table 4).

**Table 4.** Field costs of US\$ of producing (up to cutting of bunches) of exportable bananas, based on a 5-year project from conventional and in transition to organic bananas (as of 1998 estimates) and using cheaper bokashi (as of 2001).

Production system	Field Costs (up to bunch harvest)	Number of boxes	Field cost per box
Conventional	\$ 22, 278.70	9,680.00	\$2.30
Transitional (old figure)	\$ 34, 193.28	10,412.20	\$3.28
Transitional (new figure)	\$ 27,193.28	10,412.20	\$2.61

The new strategies could include programs of rotation and green manuring with nitrogen fixers to build up nitrogen into the soil, the application of organic matter direct to the soils and spraying with EM just before mixing with the soil, a slightly higher density planting program, and of course a change in varieties.

### **Conclusions**

Recent experiences obtained in new researches and commercial activities related to organic and transitional bananas point to continued decrease in costs of production. After some 9 years of work, we have now seen the potential of EM and Bokashi as tools for reducing disease-causing nematodes, reducing the black sigatoka disease problem, and improving the quality of the fruits to make them competitive to the conventional bananas.

There are still other areas for improvements such as in the use of varieties that can be more resistant to the main diseases; cultural practices such as soil amendments, crop rotation, green-manuring with nitrogen-fixing associations, and population density management. All these can make organic bananas become competitive in cost to conventional bananas. These might mean more labor in the field or in the farm facilities, but, this in fact may also be quite welcome in some countries wanting to provide more employment for its people.



## References

- Gauhi, F. (1992).** Epidemiologia y ecologia de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*, MORELET) en plátano (*Musa* sp.) en Costa Rica. Panamá. UPEB. 114 pp.
- Schwertmann, et al. (2000).** Mutual interactions between organics and iron oxides.in Interactions of Soil Minerals with Natural Organics and Microbes. Soil Sci. Soc. Of America. Sp. Public. # 17. Madison, WI.
- Stover, R. H. and Simmonds, N. W. (1987).** Bananas, Longmans, London, U. K.
- Tabora, P., M. Shintani and F. Elango. (2000).** Organic bananas: managing pests with biodiversity and E:M (effective microorganisms). Proc. 13<sup>th</sup> Int'l. IFOAM Scientific Conference. Basel, Switzerland: p 175.
- Tabora, P., et al. (1997).** Control of black sigatoka disease (*M. fijiensis*) using EM (effective microorganisms). Proc. 5<sup>th</sup> Int'l. Conf. On Kyusei Nature Farming. Bangkok. Thailand: pp 226-229.

## Acknowledgements

We acknowledge Mr. Oscar Zuñiga, banana farmer, and the research staff of the Standard Fruit Co. in Costa Rica for the data on the management of black Sigatoka and Mr. Luis Quiroz Sandi of the EARTH Commercial Banana Farm for allowing us to conduct commercial activities with EM and for providing support for data gathering.

## **ANEXOS**

# 1. Características del Taller

## Justificación

El fenómeno de inducción de resistencia consiste en estimular y activar los mecanismos de resistencia que tiene la planta mediante la aplicación exógena de agentes biológicos, químicos y físicos. En la actualidad, se está trabajando en inducción de resistencia contra plagas, enfermedades y factores ambientales adversos, como la sequía, heladas, adaptabilidad a suelos pobres, etc. Esta inducción es particularmente importante porque con la estimulación del sistema "inmunológico" de la planta se puede reducir o evitar el uso de pesticidas o agroquímicos en la producción.

Por sus características particulares, en las zonas tropicales y subtropicales existe una alta biodiversidad de especies vegetales de las cuales se pueden extraer compuestos naturales para la producción de biopesticidas, promotores de crecimientos e inductores de resistencia. Además, la microflora que hay en la rizosfera de dichas especies alberga gran diversidad de microorganismos benéficos que aún no se han estudiado a profundidad. La utilización de esta diversidad vegetal así como la microflora benéfica es fuente potencial de inductores de resistencia o agentes biológicos de control que deben ser estudiados y considerados como métodos de control alternativos a las formas tradicionales, por lo general contaminantes que se basan en pesticidas.

Se han realizado pocos estudios sobre las interacciones de patógenos y agentes biológicos, inductores de resistencia en sistemas de producción agroforestal, y en teoría estos sistemas son más ricos en agentes biológicos de control que los sistemas intensivos de producción agrícola.

## Objetivo General

Este Taller Internacional reúne investigadores, técnicos y científicos de América Latina y el Caribe con especialistas en: moléculas inductoras de resistencia, tipos y modos de inducción a plagas; tipos de resistencia, mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados con la resistencia en plantas y estrategias alternativas de control de plagas de interés Agroforestal.

## Objetivos específicos :

- Presentar los resultados obtenidos en los tres temas mencionados y discutirlos en relación a la situación de América Latina y el Caribe
- Presentar y discutir las posibilidades de realizar investigaciones conjuntas en estos temas
- Priorizar asuntos de investigación de interés para la región y reforzar las colaboraciones existentes

## 2. Programa del taller

### Día 1: **Martes, Agosto 27, 2002**

10:00 am-4:00 pm	Registro y llegada de participantes a CATIE
5:00 – 5:30 pm	Acto inaugural Bienvenida: Dr. Luis E. Pocasangre, Comité Organizador Introducción al curso: Dr. Alba Stella Riveros, Comité Organizador Inauguración del Taller: Dr. Reinhold Muschler, Jefe Departamento de Agricultura Ecológica CATIE
5:30 pm----	Cóctel de Bienvenida

### Día 2: **Miércoles, Agosto 28, 2002**

#### **TEMA 1: MOLECULAS INDUCTORAS DE RESISTENCIA Y TIPOS DE INDUCCION A PLAGAS**

Moderador:	Dr. Reinhold Muschler, Jefe del Departamento de Agricultura Ecológica CATIE
8:00-9:00 am	Desarrollo histórico de la Inducción de Resistencia <b>Dr. Joseph Kuc, Universidad de Kentucky, EEUU</b>
9:00-10:00 am	Caracterización e importancia de la biodiversidad microbial en ecosistemas agrícolas, para la salud del sistema radical de las plantas <b>Dr. Richard Sikora, Universidad de Bonn, Alemania</b>
10:00-10:30 am	Café
10:30 -11:30 am	<b>Bases bioquímicas de la resistencia en plantas</b> Dra. Alba Stella Riveros, UTolima-CATIE
11:30 – 12:30 pm	Panel de discusión
12:30 p.m.	Almuerzo

**Día 3: Jueves, Agosto 29, 2002**

**TEMA 3: ESTRATEGIAS ALTERNATIVAS DE CONTROL DE PLAGAS DE INTERES AGROFORESTAL**

- Moderadora:** Dra. Tamara Benjamin, Investigador Asociado CATIE  
**8:00-9:00 am** Estrategias para el manejo de sistemas biológicos para el control de fitonematodos en la producción de cultivos tropicales  
**Dr. Richard Sikora, Universidad de Bonn, Alemania**
- 9:00-10:00 am** Presente y futuro de las aplicaciones practicas de la inducción de resistencia para el control de enfermedades  
**Dr. Joseph Kuc, Universidad de Kentucky, EEUU**
- 10:00-10:30 am** Café
- 10:30 -11:30 am** La microscopia electrónica como herramienta en la investigación fitopatologica: efectos inducidos por activadores de resistencia  
**MSc. Ethel Sánchez, Omar Corrales y Mayra Montiel**  
**Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica**
- 11:30 – 12:30 pm** Panel de discusión
- 12:30 p.m.--** Almuerzo

**TEMA 3: ESTRATEGIAS ALTERNATIVAS DE CONTROL DE PLAGAS DE INTERES AGROFORESTAL**

- Moderadora:** Dra.Vera Sánchez , Investigadora CATIE
- 2:00 –3:00 pm** Papel de los metabolitos secundarios en la inducción de resistencia y tecnologías limpias en plantas  
**MSc. Jorge Loaiza, Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica**
- 3:00-4:00 pm** Potencial insecticida de la albahaca (*Ocimum sp.*) y alelopático del algodón lechero (*Colotropis procera*).  
**MSc. E. Murillo P\*, M. Montealegre A., D. Villanueva P., M. Alcocer T. y M.Cardona L, Universidad del Tolima, Colombia**
- 4:00-4:30 pm** Café
- 4:30 – 5:30 pm** Extractos vegetales como repelentes, para el manejo de plagas: estudios de caso con *Bemisia tabaci* e *Hypsipyla grandella*  
**Dr. Luko Hiije, Unidad de Fitoprotección CATIE, Costa Rica**
- 5:30 – 6:30 pm** Panel de discusión

**Día 4: Viernes, Agosto 30, 2002**

**TEMA 3: ESTRATEGIAS ALTERNATIVAS DE CONTROL DE PLAGAS DE INTERES AGROFORESTAL**

6:00 am	Salida desde CATIE
Moderador:	M.Sc.. Suichi Okumoto, Investigador EARTH
9:00-9:30 am	Introducción
9:30-10:00 am	Café
10:00 am-12:30 pm	Gira de campo
12:30 pm--	Almuerzo
2:00-4:00 pm	Experiencias en el manejo de Sigatoka negra y nematodos mediante el uso de microorganismos en sistemas de producción en banano <b>Dr. Pánfilo Tabora, MSc. Suichi Okumoto y Dr. Fritz Elango EARTH, Costa Rica</b>
4:00-4:30 pm	Café
4:30 pm --	Regreso a CATIE
7:00 pm	Entrega de certificaciones y clausura del evento

### **3. Acrónimos y Abreviaturas**

<b>CATIE</b>	Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Costa Rica
<b>EARTH</b>	Escuela de Agricultura de la Región Tropical Húmeda, Costa Rica
<b>ICIA</b>	Instituto Canario de Investigaciones Agrarias, España
<b>INIBAP</b>	International Network for the Improvement of Banana and Plantain, France
<b>INIBAP-LAC</b>	INIBAP para América Latina y el Caribe, Costa Rica
<b>MIP</b>	Manejo Integrado de Plagas
<b>UCR</b>	Universidad de Costa Rica, Costa Rica
<b>UNA</b>	Universidad Nacional, Heredia, Costa Rica
<b>UT</b>	Universidad del Tolima, Ibagué, Tolima - Colombia

#### 4. Lista de Conferencistas

**Dr. Joseph Kuc**

Professor Emeritus, University of Kentucky  
5502 Lorna Street, Torrance,  
California 90503 - U.S.A.  
e-mail: [JoeKuc@Aol.com](mailto:JoeKuc@Aol.com)

**Dr. Richard A. Sikora**

Institute for Plant Pathology, University of Bonn  
Nussallee 9, 53115 Bonn, Germany  
e-mail: [Rsikora@uni\\_bonn.d](mailto:Rsikora@uni_bonn.d)

**Dr. Rubén A. Ortiz V.**

Agrosoil Consulting International  
Apdo. 231-3011, Heredia, Costa Rica  
e-mail: [agrosoil@racsa.co.cr](mailto:agrosoil@racsa.co.cr)

**Dr. Luis Pocasangre**

Laboratorio de Nematología,  
Centro Agronómico Tropical de Investigación  
y Enseñanza (CATIE)  
Turrialba, 7170, Costa Rica  
e-mail: [Lpoca@catie.ac.cr](mailto:Lpoca@catie.ac.cr)

**Dr. Alba Stella Riveros**

Convenio UT-CATIE  
c/o Centro Agronómico Tropical de Investigación  
y Enseñanza "CATIE"  
Unidad de Fitoprotección,  
7170, Turrialba, Costa Rica,  
e-mail: [asrivero@catie.ac.cr](mailto:asrivero@catie.ac.cr) / [stella@racsa.co.cr](mailto:stella@racsa.co.cr)  
Tels: (506) 558 2446 ó 556 1632 Fax (506) 556 0606

**Dr. M.C. Jaízme-Vega**

**A. S. Rodríguez-Romero**  
Departamento de Protección Vegetal,  
ICIA, Apdo. 38200,  
La Laguna, Tenerife,  
Islas Canarias- España  
Fax: + 34 22 47 63 03  
e-mail: [mcjaizme@icia.es](mailto:mcjaizme@icia.es)

**M.Sc. Ethel Sánchez**

**Mayra Montiel**

Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas,  
Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica.  
e-mail: [ethels@cariari.ucr.ac.cr](mailto:ethels@cariari.ucr.ac.cr)

**Omar Corrales**

Syngenta LAN  
e-mail: [omar.corrales@syngenta.com](mailto:omar.corrales@syngenta.com)





**M.Sc. Jorge Eduardo Loaiza**  
Laboratorio de Productos Naturales, Escuela de Química  
Universidad Nacional de Costa Rica  
e-mail: [jloaiza@una.ac.cr](mailto:jloaiza@una.ac.cr)

**M.Sc. Elizabeth Murillo Perea**  
Departamento de Química, Facultad de Ciencias,  
Universidad del Tolima. Ibagué. Tolima. Colombia.  
Tél. : + 57 8 2644219 Fax: + 57 82 2644869.  
e-mail: [emurillo8@hotmail.com](mailto:emurillo8@hotmail.com).

**Dr. Luko Hilje**  
Unidad de Fitoprotección  
Centro Agronómico Tropical de Investigación  
y Enseñanza (CATIE)  
Turrialba, 7170, Costa Rica  
e-mail: [lhilje@catie.ac.cr](mailto:lhilje@catie.ac.cr)

**Dr. Panfilo Tabora**  
**Suichi Okumoto**  
**Fritz Elango**  
EARTH University,  
P. O. Box 4442-1000,  
San Jose, Costa Rica  
e-mail: [ptabora@earth.ac.cr](mailto:ptabora@earth.ac.cr)