

**PROGRAMA DE EDUCACIÓN PARA EL DESARROLLO Y LA
CONSERVACIÓN
ESCUELA DE POSGRADUADOS**

**ESTUDIO DE HONGOS ENDOFÍTICOS COMO INDUCTORES
DE RESISTENCIA PARA EL CONTROL DE SIGATOKA
NEGRA (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) EN PLÁTANO**

Tesis sometida a consideración de la Escuela de Posgrado, Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza como requisito para optar por el grado de:

Magister Scientiae en **Agricultura Ecológica**

Por

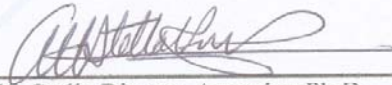
Miguel Angel Barrios Murillo

Turrialba, Costa Rica, 2006

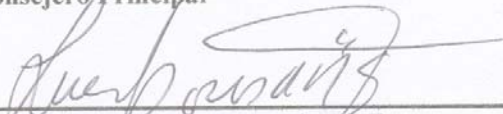
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y la Escuela de Posgrado del CATIE, y aprobada por el Comité Consejero del estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

Magister Scientiae en Agricultura Ecológica

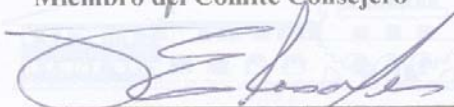
FIRMANTES:



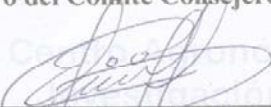
Alba Stella Riveros Angarita, Ph.D.
Consejero Principal



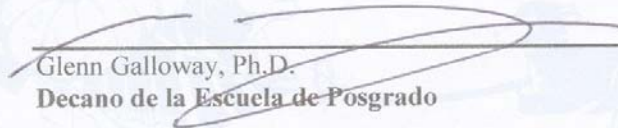
Luis E. Pocasangre Enamorado, Ph.D.
Miembro del Comité Consejero



Franklin E. Rosales Izaguirre, Ph.D.
Miembro del Comité Consejero



Eduardo Delgado Hernández, Ph.D.
Miembro del Comité Consejero



Glenn Galloway, Ph.D.
Decano de la Escuela de Posgrado

Miguel Angel Barrios M.

Miguel Angel Barrios Murillo.
Candidato

DEDICATORIA

A DIOS, quien me ha brindado toda la sabiduría e inteligencia para encontrar el camino del éxito, además de darme toda la fuerza necesaria para no desfallecer y levantarme cada día. A mí amada familia, en especial a mis padres y hermanos quienes me han enseñado los principios y valores más importantes de la vida para crecer cada día como persona y profesional.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas de Costa Rica (CONICIT) por apoyar la financiación de esta tesis.

A la Dra. Alba Stella Riveros, por su gran apoyo, confianza, aprendizaje y orientación que me brindó a lo largo de este tiempo.

A los doctores Franklin E. Rosales, Eduardo Delgado y Luis E. Pocasangre, por sus sugerencias como jurados.

Al Dr. Fernando Casanoves y al M.Sc. Gustavo López, quienes aportaron su conocimiento estadístico para el entendimiento y comprensión de los resultados obtenidos.

A mis grandes amigos Julia y Sergio, y en especial a Gina y Blanca por acompañarme en los momentos más importantes y difíciles en este tiempo.

A los integrantes del área de Fitoprotección, Laboratorio de Diagnóstico, por su colaboración y apoyo brindado.

A Manrique González y Emilge Riveros por compartir sus experiencias, además de su disposición brindada en el Laboratorio de Nematología.

A Carlos y Gerardo por su colaboración y apoyo en la fase de invernadero.

Al Grupo Temático de *Musáceas* del CATIE, por su apoyo y colaboración brindada.

A todas aquellas personas que de una u otra forma hicieron posible la realización de este trabajo.

BIOGRAFÍA

El autor nació el 10 de junio de 1982 en la ciudad de Ibagué, departamento del Tolima (Colombia). Obtuvo su título como Licenciado en Biología y Química en la Universidad del Tolima en el 2004. Durante este periodo tuvo la oportunidad de participar como asistente de investigación en el área de Limnología y Acuicultura de la Universidad del Tolima. La tesis de Licenciatura fue desarrollada en este mismo campo del conocimiento obteniendo calificación de meritoria y reconocida con Mención Especial en reconocimiento a la Calidad Académica en el VI Seminario Internacional de Limnología por su significativo aporte a la investigación realizada. En el 2005, inició sus estudios de Posgrado en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), con miras a la obtención del grado de *Magíster Scientiae* en Agricultura Ecológica.

CONTENIDO

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	IV
BIOGRAFÍA	V
CONTENIDO	VI
SUMMARY	IX
ÍNDICE DE CUADROS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos del estudio	3
1.1.1 Objetivo general.....	3
1.1.2 Objetivos específicos.....	3
1.2 Hipótesis del estudio	3
2 MARCO CONCEPTUAL	4
2.1 El cultivo del plátano	4
2.1.1 Importancia del cultivo	5
2.1.2 Principales plagas y enfermedades del cultivo	5
2.2 Relación Planta-Microorganismo mutualista (Hongos endofíticos)	7
2.2.1 Mecanismos de biocontrol	8
2.2.2 Biofertilización y estimulación de los mecanismos de defensa en plantas	9
2.3 Inducción de resistencia	12
2.4 Bibliografía	14
3 ARTÍCULO 1. Colonización diferencial de hongos endofíticos mutualistas en tejidos de vitroplantas de plátano y su efecto sobre la promoción de crecimiento	18
3.1 Introducción	18
3.2 Materiales y métodos	19
3.2.1 Localización del estudio	19
3.2.2 Material vegetal y hongos endofíticos	19
3.2.3 Descripción de los tratamientos	19
3.2.4 Preparación de la suspensión de esporas e inoculación de vitroplantas	20
3.2.5 Variables a evaluar	21
3.3 Análisis de datos	22
3.4 Resultados y discusión	22
3.4.1 Determinación del porcentaje de colonización	22
3.4.2 Efecto de hongos endofíticos sobre promoción de crecimiento en vitroplantas de plátano	26
3.4.3 Determinación de los niveles de Ca, Mg, K y P a nivel foliar en las Vitroplantas de plátano	28

3.5	Conclusiones	30
3.6	Bibliografía	31
4	ARTÍCULO 2. Efecto de hongos endofíticos mutualistas para el control de Sigatoka negra (<i>Mycosphaerella fijiensis</i>) en vitroplantas de plátano, bajo condiciones controladas de invernadero	34
4.1	Introducción	34
4.2	Materiales y métodos	35
4.2.1	Localización del estudio	35
4.2.2	Material vegetal y fúngico.....	35
4.2.3	Descripción de los tratamientos	35
4.2.4	Inoculación de vitroplantas con hongos endofíticos	36
4.2.5	Evaluación de resistencia a la Sigatoka negra	36
4.2.6	Metodología de evaluación	38
4.2.7	Lectura de Unidades SPAD de clorofila	39
4.2.8	Variables a evaluar	40
4.3	Resultados y discusión	40
4.3.1	Evaluación de resistencia a la Sigatoka negra	40
4.3.2	Periodos de desarrollo de la enfermedad	43
4.3.3	Unidades SPAD de clorofila	45
4.4	Conclusiones	47
4.5	Bibliografía	48
5	RECOMENDACIONES GENERALES	50
6	ANEXOS	51

BARRIOS MURILLO, MA. 2006. ESTUDIO DE HONGOS ENDOFÍTICOS COMO INDUCTORES DE RESISTENCIA PARA EL CONTROL DE SIGATOKA NEGRA (*Mycosphaerella fijiensis*) EN PLÁTANO.

Palabras clave: hongos endofíticos, inoculación artificial, *Trichoderma*, *Fusarium*, Sigatoka negra, *Musa*, inducción de resistencia.

RESUMEN

La Sigatoka negra es una enfermedad foliar causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* que ataca el cultivo de banano y plátano en el mundo, generando grandes pérdidas en producción, con alta inversión en agroquímicos como método efectivo de control, por lo cual es importante desarrollar alternativas que permitan reducir el costo económico y ambiental. El objetivo del estudio fue evaluar la colonización, promoción de crecimiento y control de Sigatoka negra, en vitroplantas de plátano inoculadas con cuatro aislamientos de Hongos Endofíticos (HE), bajo condiciones controladas de invernadero. Los resultados muestran mayor porcentaje de colonización de HE en la raíz, seguido por el cormo, pseudotallo y hoja. Aislamientos de *Trichoderma atroviride* fueron perdiendo a través del tiempo su poder de colonización, mientras que, cepas de *Fusarium oxysporum* incrementaron paulatinamente estos valores. Se encontraron diferencias significativas para las variables de promoción de crecimiento área foliar ($p < 0.0001$) y diámetro del pseudotallo ($p < 0.0093$); también se observó un efecto positivo en los tratamientos con cepas combinadas de HE, atribuida a una acción sinérgica. El análisis foliar (relación Ca-Mg-K), reveló un ligero desequilibrio en los tratamientos evaluados, excepto para el testigo, debido posiblemente a la toma de nutrientes del suelo por parte de los HE para sobrevivir. En relación al control de la Sigatoka negra, siguiendo las lecturas con las escalas de Fouré (1985) y Romero (2005), el T4, aislamiento de *Fusarium oxysporum*, fue el único que mostró un retraso de cinco días en el desarrollo de síntomas y evolución de la enfermedad comparado con el testigo. A la fecha, existen reportes de literatura sobre inducción de resistencia usando HE inoculados a nivel radical para el control de enfermedades foliares y dado el caso, que los resultados aquí presentados, no demuestran con suficiente amplitud la respuesta esperada, se recomienda continuar trabajando en esta dirección, ya que esta es la primera experimentación realizada en el cultivo del plátano.

BARRIOS MURILLO, MA. 2006. STUDY OF FUNGAL ENDOPHYTES AS RESISTANCE INDUCTORS FOR BLACK SIGATOKA (*Mycosphaerella fijiensis*) CONTROL IN PLANTAIN.

Key words: fungal endophytes, artificial inoculation, *Trichoderma*, *Fusarium*, black Sigatoka, *Musa*, induction of resistance.

SUMMARY

Black Sigatoka is a foliar disease caused by *Mycosphaerella fijiensis* fungus. It attacks banana and plantain crops around the world, generating enormous production losses and high agrochemical investments as effective control method. It is very important to develop alternatives to reduce economic and environmental costs. The objective of this study was to evaluate colonization, growth promotion and black Sigatoka control in plantain vitroplants, inoculated with four Fungal Endophytes (FH) isolates under controlled greenhouse conditions. Results showed higher FE colonization percentage at root level, followed by the corm, pseudostem and leaf. *Trichoderma atroviride* isolates lost their colonization power through time, while *Fusarium oxysporum* strains gradually increased these values. Significant differences were found for growth promotion of foliar area ($p < 0.0001$) and pseudostem diameter ($p < 0.0093$) and a positive effect was also observed in combined FE strain treatments, attributed to a synergic action. The foliar analysis (Ca-Mg-K relationship), showed a slight unbalance in treatments evaluated (except the control), probably due to FE soil nutrients uptake. In relation to black Sigatoka control, series of comparative measurements using Fouré (1985) and Romero (2005) scales, T4, *Fusarium oxysporum* isolate, was the only treatment showing a significant delay (five days) to develop symptoms of disease evolution compared to the control. Up to date, there are literature reports on resistance induction using inoculated FE at root level to control foliar diseases. Even though results obtained through this study do not demonstrate the expected response with enough certainty, it is recommended to continue working in this direction, since this is the first research effort with FE conducted in plantain.

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1: DESCRIPCIÓN Y ORIGEN DE LOS TRATAMIENTOS UTILIZADOS EN LA INVESTIGACIÓN.	20
CUADRO 2: PORCENTAJE GENERAL DE COLONIZACIÓN DE HONGOS ENDOFÍTICOS EN TEJIDOS DE RAÍZ, CORMO, PSEUDOTALLO Y HOJA, EN VITROPLANTAS DE PLÁTANO (CV. DOMINICO-HARTÓN).	22
CUADRO 3: EFECTO DE HONGOS ENDOFÍTICOS EN LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO EN VITROPLANTAS DE PLÁTANO (CV. DOMINICO-HARTÓN) A LOS 60DDI.	26
CUADRO 4: RELACIÓN DE EQUILIBRIO CA-MG-K FOLIAR EN VITROPLANTAS DE PLÁTANO (CV. DOMINICO-HARTÓN) 60 DDI CON HONGOS ENDOFÍTICOS.	29
CUADRO 5: DESCRIPCIÓN Y ORIGEN DE LOS TRATAMIENTOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO DE HONGOS ENDOFÍTICOS COMO INDUCTORES DE RESISTENCIA PARA EL CONTROL DE SIGATOKA NEGRA EN VITROPLANTAS DE PLÁTANO.	36
CUADRO 6: ESCALA DE FOURÉ (1985) PARA LA EVALUACIÓN DE RESISTENCIA A LA SIGATOKA NEGRA EN VITROPLANTAS DE PLÁTANO (CV. DOMINICO-HARTÓN), INOCULADAS CON M. FIJENSIS BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE INVERNADERO.	38
CUADRO 7: PERIODOS Y TIEMPOS DE DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD, BASADOS EN LA ESCALA DE FOURÉ (1985), EN LA HOJA NO.2 DE VITROPLANTAS DE PLÁTANO INOCULADAS CON M. FIJENSIS BAJO CONDICIONES DE INVERNADERO.	44

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>FIGURA 1: PROTOCOLO DE INOCULACIÓN DE HONGOS ENDOFÍTICOS EN VITROPLANTAS DE PLÁTANO (CV. DOMINICO-HARTÓN). TA1=TRICHODERMA ATROVIRIDE; TA2=TRICHODERMA ATROVIRIDE; FO1=FUSARIUM OXYSPORUM; FO2=FUSARIUM OXYSPORUM, MÁS INFORMACIÓN CUADRO 1, ESTE ARTÍCULO.</i>	20
<i>FIGURA 2: PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN PARA EL REAISLAMIENTO DE HONGOS ENDOFÍTICOS EN FRAGMENTOS DE RAÍZ, CORMO, PSEUDOTALLO Y HOJA, EN VITROPLANTAS DE PLÁTANO.</i>	21
<i>FIGURA 3: PORCENTAJE DE TEJIDO COLONIZADO POR LOS HONGOS ENDOFÍTICOS A TRAVÉS DEL TIEMPO EN FRAGMENTOS DE RAÍZ, EN VITROPLANTAS DE PLÁTANO. TA1=TRICHODERMA ATROVIRIDE; TA2=TRICHODERMA ATROVIRIDE; FO1=FUSARIUM OXYSPORUM; FO2=FUSARIUM OXYSPORUM</i>	24
<i>FIGURA 4: PORCENTAJE DE TEJIDO COLONIZADO POR LOS HONGOS ENDOFÍTICOS A TRAVÉS DEL TIEMPO EN FRAGMENTOS DE CORMO, EN VITROPLANTAS DE PLÁTANO. TA1=TRICHODERMA ATROVIRIDE; TA2=TRICHODERMA ATROVIRIDE; FO1=FUSARIUM OXYSPORUM; FO2=FUSARIUM OXYSPORUM</i>	25
<i>FIGURA 5: PORCENTAJE DE TEJIDO COLONIZADO POR LOS HONGOS ENDOFÍTICOS A TRAVÉS DEL TIEMPO EN FRAGMENTOS DE PSEUDOTALLO Y HOJA, EN VITROPLANTAS DE PLÁTANO. TA1=TRICHODERMA ATROVIRIDE; TA2=TRICHODERMA ATROVIRIDE; FO1=FUSARIUM OXYSPORUM; FO2=FUSARIUM OXYSPORUM</i>	25
<i>FIGURA 6: PORCENTAJES FOLIARES DE Ca, Mg, P y K EN VITROPLANTAS DE PLÁTANO (CV. DOMINICO-HARTÓN) INOCULADAS CON HONGOS ENDOFÍTICOS. TA1=TRICHODERMA ATROVIRIDE; TA2=TRICHODERMA ATROVIRIDE; FO1=FUSARIUM OXYSPORUM; FO2=FUSARIUM OXYSPORUM.</i>	28
<i>FIGURA 7: PROTOCOLO DE INOCULACIÓN DE MYCOSPHAERELLA FIJENSIS EN LA HOJA No.2 EN VITROPLANTAS DE PLÁTANO (CV. DOMINICO-HARTÓN) BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE INVERNADERO.</i>	37
<i>FIGURA 8: ESCALA PARA LA EVALUACIÓN DE RESISTENCIA A LA SIGATOKA NEGRA EN VITROPLANTAS DE PLÁTANO (CV. DOMINICO-HARTÓN), INOCULADAS ARTIFICIALMENTE CON M. FIJENSIS, BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE INVERNADERO.</i>	39
<i>FIGURA 9: DESARROLLO DE SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD, SIGATOKA NEGRA, EN LA HOJA No.2 DE VITROPLANTAS DE PLÁTANO (CV. DOMINICO-HARTÓN) INOCULADAS BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE INVERNADERO. ESCALA DE FOURÉ (1985).</i>	41
<i>FIGURA 10: DESARROLLO DE SÍNTOMAS DE LA ENFERMEDAD, SIGATOKA NEGRA, DE ACUERDO A LA ESCALA DE ROMERO (2005), EN LA HOJA No. 2 DE VITROPLANTAS DE PLÁTANO (CV. DOMINICO-HARTON) INOCULADAS BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE INVERNADERO.</i>	42
<i>FIGURA 11: TIEMPO DE DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD (TDE), BASADO EN LA ESCALA DE FOURÉ (1985), EN VITROPLANTAS DE PLÁTANO (CV. DOMINICO-HARTÓN) INOCULADAS CON M. FIJENSIS BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE INVERNADERO.</i>	44
<i>FIGURA 12: UNIDADES SPAD DE CLOROFILA TOMADA EN LA HOJA No.2 DE VITROPLANTAS DE PLÁTANO INOCULADAS CON M. FIJENSIS BAJO CONDICIONES CONTROLADAS DE INVERNADERO. : VALORES EN T4.</i>	46

1 INTRODUCCIÓN

El cultivo del plátano es de gran importancia a nivel de pequeños productores, al constituirse en un alimento esencial para la dieta básica y generar ingresos a la canasta familiar. Se cultiva a nivel mundial en un área aproximada de 5 290 107 hectáreas, con una producción anual de 33 349 584 TM, de las cuales el 70% se concentra en los países del África; y el restante en las regiones de América Latina y el Caribe (27%) y Asia (3%). En América Latina, Colombia (38%), Perú (19%) y Ecuador (8%) son los países más productores (FAO 2006).

Entre los principales problemas fitosanitarios que enfrenta el cultivo, se encuentran los ocasionados por hongos y nematodos. En el caso de los hongos, la Sigatoka negra causada por *Mycosphaerella fijiensis*, es considerada la enfermedad foliar más limitante y destructiva a nivel mundial. Esta enfermedad causa destrucción paulatina del área foliar, acompañada de una fuerte necrosis, afectando el proceso fotosintético, haciendo que la planta llegue a la floración con un reducido número de hojas funcionales, perjudicando el eficiente llenado de frutos y acelerando el proceso de maduración de la fruta, lo que genera grandes pérdidas económicas en la fase de comercialización (Guzmán 2006; Marín y Romero 1998).

El impacto de la Sigatoka negra en los países productores ha sido devastador en los últimos 30 años; ocasionando importantes pérdidas en la producción. En Costa Rica, el costo de control para el cultivo de banano es de US\$1500 dólares por ha/año (Marín *et al.* 2003). En México, se han registrado pérdidas del 50 al 100% en la producción, lo que ha obligado en la mayoría de las zonas de producción a incrementar los ciclos de aplicación, llegando a sobrepasar las 40 aplicaciones por ciclo de cultivo (Orozco-Santos y Orozco-Romero 2006).

Sumado a lo anterior, la pérdida de sensibilidad de *M. fijiensis* a ciertas moléculas químicas, debido a su enorme plasticidad genética, dada por su doble tipo de reproducción vegetativa; y la urgencia de competir en el mercado nacional e internacional con productos de excelente calidad y con una menor cantidad de residuos tóxicos, crean la necesidad de encontrar métodos que permitan reducir los daños causados por esta enfermedad.

En ese sentido, el uso de controladores biológicos para el manejo alternativo de la Sigatoka negra en el cultivo del plátano, podría ser una estrategia promisoriosa de control. El grupo meta al que está dirigido esta investigación son los pequeños agricultores de plátano y

aquellos quienes comparten tecnologías amigables con el ambiente, como se refleja en los sistemas orgánicos, biológicos o en transición.

El objetivo de esta investigación, fue evaluar una alternativa potencial para el control de Sigatoka negra, mediante el uso de hongos endofíticos que ayuden a reducir o eliminar el uso de plaguicidas químicos utilizados en el control de la enfermedad. Estos hongos endofíticos colonizan los tejidos de la planta, promueven el crecimiento y podrían eventualmente inducir mecanismos de resistencia, bien como mensajeros secundarios, que activen factores de defensa capaces de transferir algún tipo de señal local, que posteriormente sea de tipo sistémica, ó que proteja la planta, contra el ataque de *M. fijiensis* reduciendo la expresión de síntomas de la enfermedad. Estos mismos inductores estimularían de manera óptima el desarrollo fisiológico de la planta, facilitando el metabolismo, la división celular y la promoción del crecimiento. Así mismo, la implementación de estas metodologías en los sistemas de producción agrícola de los pequeños agricultores, aportaría ventajas comparativas respecto a los métodos de control químico ampliamente establecidos, toda vez que estos son sistemas eficientes, de bajo costo, con baja inversión en mano de obra, fáciles de implementar, amigables con el ambiente y seguros, sin ocasionar daños a la salud humana o animal.

1.1 Objetivos del estudio

1.1.1 Objetivo general

Estudiar alternativas potenciales para el manejo de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en plátano, mediante el uso de hongos endofíticos que actúen como promotores de crecimiento e inductores de resistencia.

1.1.2 Objetivos específicos

Evaluar la colonización de hongos endofíticos a través del tiempo, bajo condiciones controladas de invernadero.

Estimar el efecto de los hongos endofíticos sobre la promoción del crecimiento en vitroplantas de plátano.

Evaluar bajo condiciones de invernadero el desarrollo de síntomas y severidad de la Sigatoka negra en vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón) previamente inoculadas con cuatro hongos endofíticos no patogénicos de los géneros *Fusarium* y *Trichoderma*.

1.2 Hipótesis del estudio

Los hongos endofíticos colonizan las vitroplantas de plátano confiriéndole resistencia contra el ataque de *Mycosphaerella fijiensis*.

La inoculación de las vitroplantas de plátano con hongos endofíticos promueve el crecimiento y reducen significativamente la expresión de síntomas y la severidad de la Sigatoka negra.

2 MARCO CONCEPTUAL

2.1 El cultivo del plátano

El plátano tuvo su centro de origen en el continente Asiático, principalmente en las zonas de Filipinas, India y Nueva Guinea. Son plantas monocotiledóneas pertenecientes a la familia Musáceas, orden Escitaminales. Las especies más importantes dentro de esta familia son: *acuminata* y *balbisiana* (sección Eumusa género *Musa*), de donde por cruzamientos interespecíficos han originado la mayoría de los cultivares de plátano comestibles más importantes del mundo (Stover y Simmonds 1987).

Morfológicamente, la planta de plátano consiste de un sistema de raíces fibrosas, un cormo subterráneo y un falso tallo (pseudotallo) que sostiene las hojas, flores y frutos. **Las Raíces** tienen forma de cordón y aparecen en grupos de 3 ó 4. Son de color blanco cuando emergen, y a medida que aumenta la edad de la planta, se tornan amarillentas y duras. Su diámetro oscila entre 1.0 y 5.0 mm. En suelos fértiles, bien drenados y profundos, las raíces se pueden extender 1.5 m en profundidad y hasta 5.0 m lateralmente (Lavillé 1964). **El cormo** es un tallo subterráneo con ramificación monopódica. En el ápice se encuentra anidado el punto vegetativo o meristemo apical, a partir de los cuales surgen las raíces y el pseudotallo. La forma del cormo está influenciada por la textura y estructura del suelo, puede variar desde cónica en suelos pesados a cilíndrica achatada en suelos livianos. El diámetro no excede de los 30 cm. La consistencia suele ser carnosa debido a su alto contenido de parénquima. **El pseudotallo** ofrece a la planta apoyo y capacidad para almacenar reservas amiláceas; también, le permite alcanzar mayor altura y elevar el nivel de las láminas foliares que captan la luz solar. En una planta adulta puede medir 5.0 m de altura y 40 cm de diámetro según el clon. Su estructura es resistente y puede soportar el peso de las láminas foliares y de su inflorescencia que llega hasta 75 kg. **Las hojas** son grandes y oblongas (2-4 m de largo y hasta de 0.5 m de ancho), poseen seudopetiolos largos que se ensanchan en vainas, cuyo conjunto forma el pseudotallo (Belalcázar 1998).

2.1.1 Importancia del cultivo

Las *Musáceas* (bananos y plátanos) son el cuarto cultivo más importante del mundo, después del arroz, el trigo y el maíz. El plátano tiene una gran importancia estratégica dentro del sector rural, y ocupa un lugar destacado en el suministro de alimentos (Belalcázar 1998). En Colombia, el área sembrada es aproximadamente de 413,000 has. con una producción de 3.4 millones de TM/año, donde el 96% es destinado al mercado interno y el resto a la exportación. En Perú, se tiene establecida una superficie de 136,000 has. de plátanos cultivadas, que producen más de 1.6 millones de toneladas, donde el 70% de la producción, se concentran en la zona selvática como fuente alimenticia importante dentro del consumo familiar, al mismo tiempo que permite la generación de ingresos económicos en forma permanente, considerándose la caja clásica que regula gran parte del presupuesto diario familiar como producto de comercialización local y regional. Para el caso del Ecuador se reportan sembradas cerca de 144,932 has. con una producción de 1 012 720 TM/año, de las cuales destinan el 95% a la exportación y el resto al consumo interno (FAO 2006).

2.1.2 Principales plagas y enfermedades del cultivo

Entre los problemas fitosanitarios más frecuentes que afronta el cultivo en relación a plagas y enfermedades se tiene: virus del mosaico del pepino (CMV), virus del rayado del banano (BSV), nematodos (*Radopholus similis*, *Pratylenchus* spp. y *Meloidogyne* spp.), picudo negro (*Cosmopolites sordidus*), y Sigatoka negra (*Micosphaerella fijiensis*). Esta última, es la principal enfermedad responsable de grandes pérdidas económicas en la producción mundial y a la cual nos referiremos a continuación.

2.1.2.1 Sigatoka negra

La Sigatoka negra, es la enfermedad más importante que afecta la producción comercial de bananos y plátanos en la mayoría de las regiones productoras del mundo. Esta enfermedad es causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, reportado por primera vez al sudoeste asiático (Rhodes 1964). La primera aparición de ésta enfermedad fuera del continente asiático fue en Honduras en el año de 1972 (Stover 1980). A partir de esta fecha, la enfermedad se ha diseminado a través de varias regiones de América Latina y el Caribe: Belice en 1975, Guatemala, Costa Rica, El Salvador y Nicaragua en 1977. México y

Panamá en 1980, Colombia en 1981, Ecuador en 1986, Venezuela y Cuba en 1991 (Martínez *et al.* 1999; Vidal 1992); Jamaica y Perú en 1994, Republica Dominicana en 1996, Bolivia en 1997 (Tejerina 1998) y Brasil, en 1998 (Maciel *et al.* 1998).

Mycosphaerella fijiensis, tiene la característica de reproducirse tanto sexual como asexualmente durante su ciclo de vida, lo que dificulta su manejo. La fase asexual, genera conidios que son liberados desde los conidióforos a partir de las primeras lesiones de la enfermedad (pizcas o estrías). La fase sexual produce una gran cantidad de ascosporas desde estructuras llamadas peritecios, los cuales se forman sobre la superficie del estado de lesión más avanzado de la enfermedad (Meredith 1970).

Como producto de la gran capacidad reproductiva del hongo, éste ha alcanzado una amplia variedad genética y patogénica que le ha permitido adaptarse a diversas condiciones ambientales. Entre las variables agrometeorológicas que influyen en la germinación, penetración y éxito en la colonización de los tejidos internos y desarrollo de *M. fijiensis*, se encuentra la temperatura, la humedad relativa, el viento y la precipitación; las cuales definen la dinámica del inóculo y el impacto de la enfermedad en los rendimientos (Marín *et al.* 2003).

Los síntomas de la enfermedad, bajo condiciones controladas de invernadero pueden desarrollarse por completo desde los 10 hasta los 50 días (Romero 2005). De acuerdo con Fouré (1985), los estadios de la enfermedad se pueden describir como aparece a continuación:

- **Estadio 1:** pequeñas manchas de color blancuzco o amarillo con pequeños puntos negros en la zona central, este síntoma es visible en el envés de la hoja.
- **Estadio 2:** surge como una raya, generalmente de color café y visible en el envés de la hoja que cambia progresivamente de color café a negro.
- **Estadio 3:** se diferencia del anterior en sus dimensiones. La raya se hace más grande y bajo ciertas condiciones (poco inóculo y condiciones climáticas favorables), puede alcanzar una longitud de 2 a 3 cm.
- **Estadio 4:** visible por la haz de la hoja como una mancha negra, claramente apreciada a simple vista.
- **Estadio 5:** ocurre cuando la mancha se vuelve totalmente negra, provista de un halo amarillo que la rodea y se extiende en la haz de la hoja.
- **Estadio 6:** ocurre cuando el centro de la mancha negra se seca y adquiere un color gris claro rodeado por un halo de color amarillo brillante.

El desarrollo de síntomas de la enfermedad, ha sido complementado con la evaluación del:

- **Periodo de Incubación (PI):** número de días desde el momento de la inoculación hasta la aparición del primer estadio (pizcas).
- **Periodo de Latencia (PL):** tiempo transcurrido entre la aparición de las estrías y las primeras manchas en estadio 6.
- **Tiempo de Evolución de Síntomas (TES):** número de días desde la aparición de los primeros síntomas (estadio 1) hasta el final de estos (estadio 6).
- **Tiempo de Desarrollo de la Enfermedad (TDE):** número de días entre el momento de la inoculación y la aparición de las primeras manchas necrosadas en la hoja (estadio 6).

En lo que hace referencia al control de la Sigatoka negra, este se ha realizado principalmente mediante el uso de agroquímicos, conjuntamente con prácticas culturales que permite reducir el inóculo del hongo (Romero 2006; Marín *et al.* 2003). No obstante, en la actualidad se está trabajando en métodos alternativos mediante mecanismos como: la utilización de enmiendas orgánicas, bacterias epifitas (quitinolíticas y glucanolíticas), extractos de plantas con características fungicidas, lixiviados de compost o lombricompost; y más recientemente, la inducción de resistencia por parte de antagonistas y hongos endofíticos (Orozco-Santos y Orozco-Romero 2006; Patiño *et al.* 2006; Riveros *et al.* 2002).

2.2 Relación Planta-Microorganismo mutualista (Hongos endofíticos)

En los últimos años, los inconvenientes causados por el uso de químicos en la agricultura se han incrementado, lo que ha generado un gran interés en la búsqueda de sistemas de control alternativos (Benítez *et al.* 2004). Una de las estrategias presentadas es la utilización de microorganismos que puedan actuar como agentes de biocontrol donde los mecanismos empleados por estos son muchos y de variada naturaleza (Howell 2003).

Según Rey *et al.* (2001), la habilidad de un hongo para existir en un hábitat particular como el suelo o la superficie del órgano de una planta, esta particularmente determinado por las relaciones ecológicas con otros microorganismos. Estas interrelaciones a menudo son antagonistas naturales, donde uno o más de los organismos puede resultar perjudicado o tener una actividad reducida. Especies como: micorrizas, rizobacterias y hongos endofíticos, son los

más utilizados para el control biológico de enfermedades, debido a su ubicuidad, facilidad para ser aislados y subcultivados, así como, un rápido crecimiento en un gran número de sustratos (Pocasangre *et al.* 2006; Sikora y Pocasangre 2006; Rey *et al.* 2001).

En ese sentido, se estudiarán los hongos endofíticos (HE), los cuales han sido definidos como microorganismos que colonizan los tejidos u órganos internos de una planta sin causar ningún tipo de daño a la misma (Latch 1993; Carroll 1990). La mayoría de estos hongos, son ascomicetos y están presentes en gran parte de su ciclo de vida dentro del tejido de la planta, donde pueden alterar la fisiología promoviendo el crecimiento e incrementando la resistencia al estrés causado por factores bióticos o abióticos (Pocasangre *et al.* 2006; Sikora y Pocasangre 2006; Pocasangre 2003; Sikora 1992). Entre los géneros más conocidos de HE se encuentran: *Acremonium*, *Anthostomella*, *Aspergillus*, *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Clypeopycni*, *Colletotrichum*, *Coniothyrium*, *Cryptocline*, *Fusarium*, *Glomerella*, *Guignardia*, *Lasioidiploidia*, *Libertella*, *Nodilosporium*, *Phaeosphaeria*, *Phialophora*, *Phoma*, *Phomastospora*, *Phomopsis filiciana*, *Scopulariopsis*, *Trichoderma*, *Verticillium* y *Xylaria* (Souza *et al.* 2004; Petrini *et al.* 1992).

Los HE son también conocidos por el desarrollo de relaciones planta-microorganismo mutualista donde actúan como antagonistas contra plagas y enfermedades (Harman *et al.* 2004). El éxito de la mayoría de estos hongos se debe a su alta capacidad de reproducción, habilidad para sobrevivir bajo condiciones desfavorables, eficiencia en el uso de nutrientes, promoción de crecimiento e inducción de los mecanismos de defensa en las plantas (Sikora y Pocasangre 2006; Benítez *et al.* 2004).

2.2.1 Mecanismos de Biocontrol

Según Howell (2003), los controladores biológicos son organismos vivos cuya actividad depende de las condiciones ambientales donde habitan y de los mecanismos complejos que actúan sinérgicamente para el control de enfermedades. Benítez *et al.* (2004), afirma que cuando el agente de biocontrol es un HE, el mecanismo se da como resultado de su habilidad para producir sustancias o metabolitos que impidan la germinación de esporas, inhibiendo la acción del patógeno o modificando la rizosfera por acidificación del suelo, lo cual interfiere el crecimiento del patógeno agresor. Asimismo, el biocontrol puede resultar de la interacción entre los patógenos y el controlador biológico, mediante un micoparasitismo que involucre un contacto físico y la producción de enzimas hidrolíticas, compuestos tóxicos y/o

antibióticos que actúan sinérgicamente con las enzimas (Sharon *et al.* 2001). En el caso de cepas no patogénicas de *Trichoderma* y *Fusarium*, éstas pueden además, ejercer efectos positivos incrementando el crecimiento de la planta (biofertilización), al mismo tiempo de estimular mecanismos de defensa (Harman 2000).

2.2.2 Biofertilización y estimulación de los mecanismos de defensa en plantas

Existe un grupo importante de hongos que presentan efectos antagónicos contra otros microorganismos. Sin embargo, aún no se ha logrado determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos en la planta huésped (Howell 2003). Para *Trichoderma*, se ha considerado un complejo de mecanismos que incluye: competencia por nutrientes y espacio, antibiosis, micoparasitismo e inducción de resistencia (Harman *et al.* 2004). Hongos como *Fusarium oxysporum* no patogénico, se le adjudican como modos de acción más importantes: inducción de resistencia, competencia por nutrientes en la rizosfera y competencia por sitio de infección (Tam 2005; Hammerschmidt and Kuc 1995).

Colonización en raíces de plantas: cepas de *Trichoderma* colonizan primero las raíces de las plantas, estimulan el crecimiento y confieren protección contra infecciones (Benítez *et al.* 2004). La colonización implica la habilidad por parte del endofítico de adherirse y reconocer la raíz, y penetrar y resistir metabolitos tóxicos producidos por la planta en respuesta a la invasión de un organismo extraño (Franken *et al.* 2002). Algunas cepas de *Trichoderma* establecen largos periodos de colonización en las raíces de las plantas, penetrando en el interior de la epidermis donde producen compuestos capaces de inducir local o sistémicamente una respuesta de defensa por parte de la planta. La síntesis y acumulación de fitoalexinas, flavonoides, terpenoides, derivados fenólicos y otros compuestos antimicrobiales, actúan contra la invasión de hongos patógenos (Chet *et al.* 2006; Harman *et al.* 2004).

Biofertilización: la colonización de las raíces por *Trichoderma*, además, de aumentar el crecimiento y desarrollo de las raíces, puede también aumentar la productividad del cultivo, darle resistencia al estrés abiótico y una eficiente toma y uso de nutrientes por parte de la planta (Benítez *et al.* 2004). Chet *et al.* (1997), afirman que la producción en los cultivos puede incrementarse hasta un 300% después de la inoculación de *Trichoderma hamatum* o *Trichoderma koningii*. También, reportan en experimentos llevados a cabo en invernadero, un aumento considerable en la producción, con semillas de plantas previamente tratadas con

esporas de *Trichoderma*. Sin embargo, existen muy pocos reportes de cepas que producen factores de crecimiento (auxinas, citoquininas y etileno) que son detectados e identificados en el laboratorio (Benítez *et al.* 2004). La producción controlada de estos componentes, junto con la síntesis o estimulación de fitohormonas, sumada a la adición de cepas de *Trichoderma* acidificando su ambiente circundante por secreción de ácidos orgánicos, puede mejorar la biofertilización (Osiewacz 2002). Estos ácidos orgánicos resultan del metabolismo de otras fuentes de carbono principalmente glucosa, con capacidad de solubilizar fosfatos, micronutrientes y minerales cationes incluyendo hierro, manganeso y magnesio (Howell 2003). Por lo tanto, la adición de *Trichoderma* a suelos donde estos cationes son escasos resulta en la biofertilización por la solubización del metal, mejorando la estructura del suelo e incrementando la productividad del cultivo (Benítez *et al.* 2004).

Estimulación de la resistencia en plantas y mecanismos de defensa: la habilidad de cepas de *Trichoderma* para proteger plantas contra patógenos de raíces puede ser atribuida al efecto antagonista contra la invasión del patógeno (Howell 2003). No obstante, estas asociaciones de raíz-hongo también estimulan los mecanismos de defensa de la planta, donde cepas de *Trichoderma* adicionados a la rizosfera protegen las plantas contra diferentes clases de patógenos, incluyendo virus, bacterias y hongos, mediante mecanismos de resistencia similares a la respuesta hipersensible, resistencia sistémica adquirida (SAR) e inducción de resistencia sistémica (ISR) (Harman *et al.* 2004).

A nivel molecular, la resistencia resulta en el incremento en la producción de metabolitos y enzimas relacionados con los mecanismos de defensa, tales como las enzimas fenil-alanina amonio-1yase (PAL) y chalcone sintasa (CHS), involucradas en la biosíntesis de fitoalexinas y de proteínas relacionadas con la patogenicidad como: quinasas y β -1,3-glucanasas, entre otros (Benítez *et al.* 2004).

Investigaciones en ese sentido, han revelado que la expresión de la quitinasa (Chit42) de *Trichoderma harzianum* en plantas de tabaco y papa resulta en líneas transgénicas altamente tolerantes o completamente resistentes contra *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani*. De esta manera, la protección de plantas parece ser un resultado exclusivamente del incremento en la actividad enzimática de estas enzimas. En otros casos, expresiones heterogéneas de pectinasas y glucanasas en plantas resultan en un refuerzo enzimático contra patógenos pero no en estimulación específica de los mecanismos de resistencia en plantas (Benítez *et al.* 2004).

La adición de laminarin y β -1,3-glucan, induce varios genes de defensa y reduce la infección contra *Botrytis cinerea* y *Plasmopara viticola* (Benítez *et al.* 1998). *Phytophthora parasitica* produce unas células glicoproteínas (CBEL) que tiene un campo de celulosa obligatoria (CBD) y provoca respuesta de defensa en la planta huésped. La infiltración de CBEL en la planta no-huésped también induce reacción de defensa. La expresión en plantas de quitinasas con CBDs, tales como las Chit42CBD, puede resultar en el aumento de resistencia contra fitopatógenos. Se han descrito que cuando tales plantas tienden a estar en la presencia de *Trichoderma*, la resistencia persiste por largos períodos y después de varios meses (Benítez *et al.* 2004).

Biocontrol por competencia en la rizosfera: la competencia en la rizosfera es importante ya que un agente de biocontrol no puede competir por espacio ni nutrientes si este no es capaz de crecer en la rizosfera (Howell 2003). Aunque la competencia en la rizosfera no puede ser el principal mecanismo que conduce al control biológico, este es ciertamente un componente importante del proceso (Benítez *et al.* 2004; Benítez *et al.* 1998).

Especies de *Trichoderma* son a menudo capaces de suprimir el crecimiento de hongos endógenos mediante la producción de altas cantidades de sideróforos que capturan el hierro deteniendo el crecimiento de otros hongos (Chet and Invar 1994). Para *T. harzianum* se ha observado control contra *Fusarium oxysporum* patógeno al capturar más rápidamente nutrientes y colonizar la rizosfera (competencia por espacio), siendo más efectivo el biocontrol cuando la concentración de nutrientes disminuye (Tjamos *et al.* 1992).

Modificación de la rizosfera: el ambiente del suelo influye en la germinación de esporas, formación de clamidiosporas y en la producción de metabolitos secundarios, tales como sideroforos, antibióticos y enzimas, que impiden la colonización por patógenos (Eisendle *et al.* 2004). Las condiciones de pH es uno de los factores más importantes afectando la actividad de diferentes microorganismos en el suelo. Algunos antibióticos son degradados por pH altos, aire seco, y pH bajo induciendo degradación de enzimas por ácidos proteicos inhibiendo el crecimiento de hongos patógenos por la acción de ácidos débiles, como el ácido salicílico (Delgado *et al.* 2002). Uno de los mecanismos de *Trichoderma* para alcanzar la colonización y control de patógenos en una dinámica de ambiente de pH es responder adecuadamente para cada condición de pH. Las cepas de *Trichoderma* son capaces de modificar el pH externo y adaptar su metabolismo a las condiciones de crecimientos

circundantes reduciendo consecuentemente la virulencia del fitopatógeno (Benítez *et al.* 2004).

Antibiosis: muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles que impiden la colonización por microorganismos antagonistas; entre estos metabolitos, la producción de ácido arcianico, alamethicina, tricholin, peptaibols, antibióticos, 6-penthy- α -pyrone, massailactone, viridina, gliovirin, entre otros, son los más conocidos (Vey *et al.* 2001). En algunos casos, la producción de antibióticos está correlacionada con la habilidad de biocontrol. En ese sentido, la combinación de enzimas hidrolíticas y antibióticos resulta en un alto nivel de antagonismo comparado con esos obtenidos por cada mecanismo por separado (Howell 1998). En los últimos años, se ha documentado efectos sinérgicos entre una endoquitinasa de *T. harzianum* y gliotoxin, y entre enzimas hidrolíticas y peptaibols en germinación de conidias de *Botrytis cinerea* (Harman *et al.* 2004; Howell 2003). En plantas de tabaco, aplicaciones exógenas de peptaibols inducen una respuesta de defensa y reducen la susceptibilidad del tabaco ante el virus del mosaico (Wiest *et al.* 2002).

Micoparasitismo: el ataque directo de un hongo sobre otro, es un proceso que involucra eventos secuenciales, incluyendo el reconocimiento, ataque y la subsecuente penetración y muerte del huésped (Benítez *et al.* 2004). En el caso de *Trichoderma*, el primer paso consiste en detectar al hongo y colonizarlo rápidamente (Harman *et al.* 2004). Posteriormente, une al patógeno con las paredes de células carbohidratadas y forma la estructura apresoria con bajos niveles de una endoquitinasa extracelular que provee liberación de oligomerasas del hongo, lo que induce la expresión de endoquitinasas fungitoxicas que se difunden antes de que el contacto sea realmente logrado (Viterbo *et al.* 2002).

2.3 Inducción de resistencia

La inducción de resistencia consiste en la estimulación, por parte de moléculas activadoras, de los mecanismos de defensa en el hospedante (Riveros 2001). En ciertos casos, la inducción de resistencia inicia con una respuesta local por parte de la planta alrededor del punto de necrosis y es asociada con un incremento rápido de la síntesis de ácido salicílico (AS) y la posterior activación de un gran número de genes que codifica para la producción de proteínas (PR) relacionadas con la patogenicidad. Subsecuentemente, la resistencia se expresa

sistemicamente y se desarrolla en todas las partes de la planta, fenómeno conocido como: Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) (Durrant and Dong 2004).

En la actualidad, se han sugerido una serie de inductores sintéticos de resistencia que involucran el ácido salicílico (AS) como señal intermediaria que conduce a SAR inhibiendo la acción de la catalasa; convirtiendo el H_2O_2 en H_2O y O_2 . La inhibición resulta en una acumulación de especies reactivas de oxígeno que puede actuar como mensajeros secundarios para inducir la expresión de los genes responsables de SAR (Chen *et al.* 1993). No obstante, algunos autores consideran que la inhibición de la catalasa no solo se logra por acción del AS. La inducción de ciertas proteínas no es producto de la acumulación del H_2O_2 sino del AS directamente, además, la actividad de la enzima no decrece con el tratamiento de AS. Así mismo, los niveles de AS dentro del tejido son muy bajos como para inhibir la catalasa, y el H_2O_2 en altos niveles también puede inducir la producción de AS (Hammerschmidt and Smith 2000).

Diferentes inductores bióticos como proteínas, glicoproteínas, péptidos, quitina, glucano, polisacáridos y lípidos, han sido encontrados en fluidos de esporas en germinación, filtrados de cultivos de hongos y bacterias, paredes celulares o membranas de hongos fitopatógenos, al igual que en el espacio apoplástico de las plantas donde se encontraba el hongo en proceso de colonización intercelular (Riveros 2002; Darvill and Albersheim 1984). Dentro del género *Mycosphaerella* se ha reportado que la especie *M. pinodes*, la cual secreta un elicitor en su fluido de piconsporas en germinación, induce mecanismo de defensa en plantas mediante la producción de fitoalexinas, además de un incremento en la actividad de proteínas PR como β -1,3-glucanasa y endoquitinasa. Este elicitor, además, de inducir las respuestas de defensa, responde a un supresor que bloquea esta misma, condicionando los tejidos de la planta a ser susceptibles. La acción de este supresor parece estar relacionada con base en el tipo de interacción que puede ser específica a una especie o en forma similar a la especificidad entre el cultivar y una raza del patógeno (Kûc 2002b).

De otro lado, se ha desarrollado resistencia sistémica inducida a partir de la colonización de las raíces de la planta por microorganismos de la rizosfera, particularmente rizobacterias. Esta resistencia se caracteriza por estar mediada de vías metabólicas sensibles al ácido jasmónico y etileno, además de ser independiente de la expresión de los genes PR y del ácido salicílico (Madriz 2002; Tuzun and Bent 2000).

2.4 Bibliografía

- Belálcazar, S. 1998. El cultivo del plátano en el trópico. Manual de asistencia técnica No. 50. Quindío, Colombia. 290 p.
- Benítez, T; Rincón, AM; Limón, MC; Codón, AC. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, Vol. 7, 249-260.
- Benítez, T; Delgado-Jarana, J; Rincón, AM; Rey, M; Limón, MC. 1998. Biofungicidas: *Trichoderma* as a biocontrol agent against phytopathogenic fungi. In: Recent research developments in microbiology, Vol. 2. Trivan Pandalai SG (ed.). p. 129-150.
- Carroll, G. C. 1990. Fungal endophytes in vascular plants: Mycological research opportunities in Japan. *Trans. Mycology. Soc. Japan*, Vol. 31, 103-116.
- Chen, Z; Silva, H; Klessig, D. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, Vol. 262, 1883-1886.
- Chet, I; Viterbo, A; Brotman, Y; Lousky, T. 2006. Enhancement of plant disease resistance by the biocontrol agent *Trichoderma*. *Life Sciences. Weizmann Institute of Science*. p. 1-2.
- Chet, I; Inbar, J; Hadar, I. 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. In: *The Mycota IV: Environmental and microbial relationship*. Wicklow DT, Söderström B. (eds). Springer-Verlag, Berlin, p. 165-184.
- Chet, I; Inbar, J. 1994. Biological control of Fungal pathogens. *Appl. Biochem Biotechnol*, Vol. 48, 165-184.
- Darvill, AG; Albersheim, P. 1984. Phytoalexins and their elicitors- A defense against microbial infection in plants. *Annual Review Plant Physiological*, Vol. 35, 243-275.
- Delgado-Jarana, J; Rincón, AM; Benítez, T. 2002. Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: cloning and characterization . *Microbiology*, Vol. 148, 1305-1315.
- Durrant, WE; Dong. 2004. Systemic acquired resistance. *Annual Review*, No.42, 185-209.
- Eisendle, M; Oberegger, H; Buttinger, R; Illmer, P; Hass, H. 2004. Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*. *Euk Cell*, Vol. 3, 561-563.
- FAO. 2006. Base de datos estadísticos (en línea). Consultado 14 sep. 2006. Disponible en <http://apps.fao.org/>
- Fouré, F. 1985. Black leaf streak disease of banana and plantains (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) study of the symptoms and stages of the disease in Gabon. IRFA. París.
- Franken, P; Khun, G; Gianinazzi-Pearson, V. 2002. Development and molecular biology of arbuscular mycorrhizal fungi. In *Molecular biology of fungal development*. Osiewacs, HD. (ed.). Marcel Dekker, New York. p. 325-348.
- Gúzman, M. 2006. Estado actual y perspectivas futuras del manejo de la Sigatoka negra en América Latina. En: *Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat*. Joinville, SC, Brasil. Bananicultura: un negocio

- sostenible. Soprano, E; Tcacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds.) Editorial, Epagri, Estación experimental de Itajaí, SC, Brasil. p. 83-91
- Hammerschmidt, R; Kúc, J. 1995. Induced resistance to diseases in plants. Kluwer Academic Publishers, Netherlands. p. 169-175.
- Hammerschmidt, R; Smith, R. 2000. A survey of plant defense responses to pathogens. In: Induced plant defenses against pathogens. 55-71 p.
- Harman, GE. 2000. Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. Plant Diseases, Vol. 84, 377-393.
- Harman, GE; Howell, RH; Viterbo, A; Chet, I; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology, Vol. 2, 43-56.
- Howell, CR. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Disease, Vol. 87, No.1, 4-10.
- Howell, CR. 1998. The role of antibiosis in biocontrol. In: *Trichoderma* and *Gliocladium*. Harman, GE; Kubicek, CP. (eds.). Taylor and Francis, Padstow, Vol. 2, P. 173-184.
- Kúc, J. 2002b. The practical application of induced resistance for disease control now and for the future. En: Memoria Taller Internacional Inducción de Resistencia y uso de tecnologías limpias para el manejo de plagas en plantas. Riveros, AS; Pocasangre, LE; Rosales, F. (eds.). CATIE, Turrialba. CR. 54-60 p
- Latch, GC. 1993. Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts. Biotic stress tolerance imparted to grasses by endophytes. Agriculture, Ecosystems and Environments, Vol. 44, 143-156.
- Laville, E. 1964. Études de la mycoflore des racines du bananier "poyo". Fruits, Vol. 19, No.8, 435-449.
- Maciel, C; Pires, A; Oliveira, S. 1998. La Sigatoka negra en Brasil. Confirmada la amenaza. Infomusa (Montpellier), Vol. 7, No.1, 130-131.
- Madriz, K. 2002. Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Rev. Manejo Integrado de Plagas, No. 63, 22-32.
- Marin, D; Romero, R; Guzmán, M; Sutton, T. 2003. Black Sigatoka and increasing threat to banana cultivation. Plant Disease, Vol. 87, No.3.
- Marín, D; Romero, R. 1998. El combate de la Sigatoka negra. En: Divulgación científica al servicio del productor bananero nacional. Dirección de investigaciones de CORBANA. Sandoval, JA; Vargas, R. (eds.). 251 p.
- Martínez, G; Pargas, R; Muñoz, D. 1999. La Sigatoka negra y su avance en el territorio Venezolano. Implicaciones Socioeconómicas. CENIAP.
- Meredith, DS. 1970. Banana leaf spot diseases (Sigatoka) caused by *Mycosphaerella fijiensis* and *musicola*. In: Sigatoka negra en la región del Pacífico del Sudeste Asiático. Jones, DR. (ed.). Montpellier, Francia. Musaraña/Inibap Agrópolis. p. 2-5.

- Orozco-Santos, M; Orozco-Romero, J. 2006. Manejo sustentable de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano: conocimiento del patosistema, prácticas culturales y control químico. En: Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil. Vol. 1. Bananicultura: un negocio sostenible. Soprano, E; Tcacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds.) Editorial, Epagri, Estación experimental de Itajaí, SC, Brasil. p. 100-116
- Osiewacz, HD. (ed.). 2002. Molecular biology of fungal development. Marcel Dekker, New York.
- Patiño, LF; Salazar, LM; Collazos, JC; Piedrahita, RA; Bustamante, E. 2006. Bacterias liticas y sustratos en la filósfera de banano y plátano para el control de Sigatoka negra. En: Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil. Vol. 1. Bananicultura: un negocio sostenible. Soprano, E; Tcacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds.) Editorial, Epagri, Estación experimental de Itajaí, SC, Brasil. p. 133-140
- Petrini, O; Sieber, TN; Toti, L; Viret, O. 1992. Ecology, metabolite production and substrate utilization in endophytic fungi. Natural Toxins, Vol. 1, 185-196.
- Pocasangre, LE; Menjivar, RD; zum Felde, A; Riveros, AS, Rosales, FE; Sikora, RA. 2006. Hongos endofíticos como agentes biológicos de control de fitonematodos en banano. En: Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil. Vol. 1. Bananicultura: un negocio sostenible. Soprano, E; Tcacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds.) Editorial, Epagri, Estación experimental de Itajaí, SC, Brasil. p. 249-254.
- Pocasangre, LE. 2003. Nuevas estrategias para el manejo de nematodos en musáceas. En: Taller convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas. (eds) Musalac/Inibap/Fontagro. Guayaquil, Ecuador. 38p.
- Rey, M; Delgado-Jarana, J; Benítez, T. 2001. Improved antifungal activity of a mutant of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 which produces more extracellular proteins. Appl Microbiol Biotenhnol, Vol. 55, 604-608
- Rhodes, PL. 1964. A new banana disease in Fidji. Commonw. Phytopathol. News, Vol. 10, 38- 41.
- Riveros, AS. 2002. Bases bioquímicas de la resistencia en plantas. En: Memoria Taller Internacional Inducción de Resistencia y uso de tecnologías limpias para el manejo de plagas en plantas. Riveros, AS; Pocasangre, LE; Rosales, F. (eds.). CATIE, Turrialba. CR. 13-23 p.
- Riveros, AS. 2001. Moléculas activadoras de la inducción de resistencia, incorporadas en programas de agricultura sostenible. Rev. Manejo Integrado de Plagas, No. 61, 4-11.
- Riveros, A; Giraldo, A; Gamboa, A. 2002. Microbiological control of black leaf streak diseases in *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. INIBAP. San José, Costa Rica. 287-297 p.
- Romero, RA. 2006. Caracterización y manejo de la resistencia a fungicidas de *Mycosphaerella fijiensis* en bananos. En: Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil. Bananicultura: un

- negocio sostenible. Soprano, E; Tcacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds.) Editorial, Epagri, Estación experimental de Itajaí, SC, Brasil. p.92-99
- Romero, JE. 2005. Evaluación de dos metodologías de diagnóstico de resistencia temprana a la Sigatoka negra en cultivares de plátano. Trabajo de grado. Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia. 84 p
- Sharon, E; Bar-Eyal, M; Chet, I; Herra-Estrella, A; Kleifield, O; Spiegel, Y. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, Vol. 91, 687-693.
- Sikora, RA; Pocasangre, LE. 2006. The concept of a suppressive banana plant: root health management with a biological approach. En: Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil. Bananicultura: un negocio sostenible. Soprano, E; Tcacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds.) Editorial, Epagri, Estación experimental de Itajaí, SC, Brasil. p.241-248.
- Sikora, RA. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*, Vol. 30, 245-270.
- Souza, AQ; Souza, AD; Filho, AS; Pinheiro, B; Sarquis, MI; Pereira, JO. 2004. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. *Acta Amazônica*, Vol. 34, No.2, 185-195
- Stover, R. 1980. Sigatoka leaf spots bananas and plantains. *Plant Disease report*, Vol. 64, No.8, 750-756.
- Stover, R; Simmonds, N. 1987. Bananas. Longman scientific and technical. Third edition. England. 467 p.
- Tam, VT. 2005. Modes of action of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* endophytes for bio-enhancement of banana toward *Radopholus similis*. Thesis Ph.D. University of Bonn, Germany. 102 p.
- Tejerina, JC. 1998. First report of Black Sigatoka in Bolivia. *Plant Disease*, Vol. 81, No.11, 1332.
- Tjamos, EC; Papavizas, GC; Cook, RJ. (eds.). 1992. Biological control of plant diseases. Progress and challenges for the future. Plenum Press, New York.
- Tuzun, S; Bent, E. 2000. The role of hydrolytic enzymes in multigenic and microbially-induced resistance in plant. In: *Induced plant defenses against pathogens*. 95-116 p.
- Vey, A; Hoagland, RE, Butt, TM. 2001. Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. In: *Fungi as biocontrol agents: Progress, problems and potential*. CAB International, Bristol. Butt, TM; Jackson, C; Magan, N. (eds.). p. 311-346.
- Vidal, A. 1992. Sigatoka negra en Cuba. Nuevos focos de plagas y enfermedades. *Boletín Fitosanitario de la FAO*, Vol. 40, No. 46, 1-2
- Viterbo, A; Ramot, O; Chemin, L; Chet, I. 2002. Significance of lytic enzymes from *Trichoderma* spp. In the biocontrol of fungal plant pathogens. *Ant. van Leeuw*, Vol. 81, 549-556.
- Wiest, A; Grzegorski, D; Xu, B; Goulard, C; Rebuffat, S; Ebbole, DJ; Bodo, B; Kenerley, C. 2002. Identification of peptaibols from *Trichoderma virens* and cloning of a peptaibol synthetase. *J Biol Chem*, Vol. 277, 20862-20868.

3 ARTÍCULO 1. Colonización diferencial de hongos endofíticos mutualistas en tejidos de vitroplantas de plátano y su efecto sobre la promoción de crecimiento

3.1 Introducción

Las plantas son naturalmente asociadas con microorganismos (hongos y bacterias) en una interacción frecuentemente mutualista, esencial para el crecimiento, dada su importancia en la toma de nutrientes, absorción de agua y fijación de nitrógeno, lo cual proporciona vigor y en alguna medida resistencia natural a las plantas (Dubois *et al.* 2006; Soto *et al.* 2006; Diouf *et al.* 2003).

Los hongos endofíticos forman parte de la microflora del suelo que interactúa con la planta y se definen como organismos no patogénicos, que durante algún momento de su ciclo de vida, colonizan o no, los tejidos internos de la planta sin causar ningún tipo de síntoma. Estos hongos promueven el crecimiento, brindan tolerancia al estrés (biótico y abiótico) e incrementan la resistencia a enfermedades y plagas (Pocasangre *et al.* 2006; Sikora y Pocasangre 2006; Pocasangre 2002; Petrini 1991).

La promoción de crecimiento, se atribuye a ciertos grupos de microorganismos, capaces de producir compuestos químicos (antibióticos y/o metabolitos secundarios), grupos ciano (HCN supresor de bacterias patógenas), sideróforos quelatantes de hierro y hormonas reguladoras de crecimiento, tales como: auxinas, citoquininas, ácido giberélico, ácido abscísico y etileno, entre otros (Raupach *et al.* 1996; Liu *et al.* 1995a,b). En algunos casos esta promoción de crecimiento, resulta como consecuencia de la reducción de microorganismos patógenos mediante un modo de acción antagónico contra el agente causal, dando como resultado un efecto positivo en el crecimiento de la planta (Harman 2006; Kloepper and Schroth 1981).

En la última década, los estudios se han centrado en forma extensiva, en el antagonismo de endofíticos esencialmente contra patógenos del suelo (Ramamoorthy *et al.* 2001; Narisawa *et al.* 2002). Algunos aislados endofíticos actúan antagónicamente contra múltiples plagas y/o patógenos simultáneamente. En los cultivos de plátano y banano, la taxa de hongos endofíticos más predominante, sin duda es el género *Fusarium* spp. (Ali *et al.* 2002; Hallman and Sikora 1996). No obstante, trabajos realizados con cepas de *Trichoderma atroviride* inoculadas en vitroplantas de banano, en etapa de vivero, mostraron un efecto en la

promoción de crecimiento para altura de la planta, diámetro del pseudotallo y emisión foliar (Menjívar 2005). Para este mismo cultivo, Meneses (2003), encontró valores en peso del sistema radical (39%) y sistema foliar (19%) mayores que el testigo absoluto, así como, un incremento en altura y diámetro del pseudotallo. En términos de producción de biomasa, plantas de banano de los cultivares Nakyetengu y Nfuuka (AAA-EA), inoculadas con aislados endofíticos de *Fusarium concentricum* mostraron incrementos significativos para esta variable (Griesbach 2000).

El objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de la inoculación de cuatro aislamientos de hongos endofíticos en la colonización y promoción de crecimiento en vitroplantas de plátano, bajo condiciones de invernadero.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Localización del estudio

El estudio se llevó a cabo en los laboratorios de Diagnóstico, Fitopatología y el invernadero de Musáceas del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza “CATIE”, ubicado en el Cantón de Turrialba, provincia de Cartago, Costa Rica, localizado a 09°55’21” de latitud Norte y 83°39’40” de latitud Oeste, altura de 602 msnm, temperatura promedio de 21°C y precipitación media anual de 2600 mm.

3.2.2 Material vegetal y hongos endofíticos

Se utilizaron 400 vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón AAB) en fase IV de endurecimiento. Tres poblaciones de hongos endofíticos de Costa Rica y una proveniente de suelos supresivos de Guatemala. Estos aislamientos fueron suministrados por el laboratorio de Nematología del CATIE (Dr. Luis E. Pocasangre) y seleccionados por su capacidad de biocontrol contra nematodos.

3.2.3 Descripción de los tratamientos

Cuatro aislamientos de hongos endofíticos no patogénicos: dos cepas de *Trichoderma atroviride* (T1 y T2) y dos cepas de *Fusarium oxysporum* (T3 y T4), con sus respectivas

combinaciones (T1+T2, T3+T4 y T1+T2+T3+T4) más un testigo absoluto (T8) fueron evaluados (Cuadro 1).

Cuadro 1: Descripción y origen de los tratamientos utilizados en la investigación.

Tratamiento	Origen	Hongos endofíticos
T1	Guatemala	<i>Trichoderma atroviride</i> (Ta1)
T2	Sixaola, Costa Rica	<i>Trichoderma atroviride</i> (Ta2)
T3	Sixaola, Costa Rica	<i>Fusarium oxysporum</i> (Fo1)
T4	Talamanca, Costa Rica	<i>Fusarium oxysporum</i> (Fo2)
T5	Guatemala y Sixaola, Costa Rica	Ta1 + Ta2
T6	Sixaola, Costa Rica	Fo1 + Fo2
T7	Guatemala, Sixaola y Talamanca	Ta1 + Ta2 + Fo1 + Fo2
T8	----	Plantas no inoculadas

3.2.4 Preparación de la suspensión de esporas e inoculación de vitroplantas

Cultivos de hongos endofíticos con una semana de crecimiento (medio PDA + ácido láctico) fueron utilizados para la preparación de esporas, la cual fue ajustada a una concentración de 1.0×10^6 esporas/ml con ayuda de un hematocímetro de Neubauer.

La inoculación se realizó sumergiendo el sistema radical de las vitroplantas en la suspensión de esporas durante 5 minutos. Posteriormente, fueron sembradas en bolsas negras de polietileno con sustrato a base de suelo, arena y granza (2:1:1) previamente autoclavado (Figura 1). Las plantas fueron mantenidas durante 8 semanas bajo condiciones de invernadero, a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, con frecuencia de riego, según capacidad de campo.

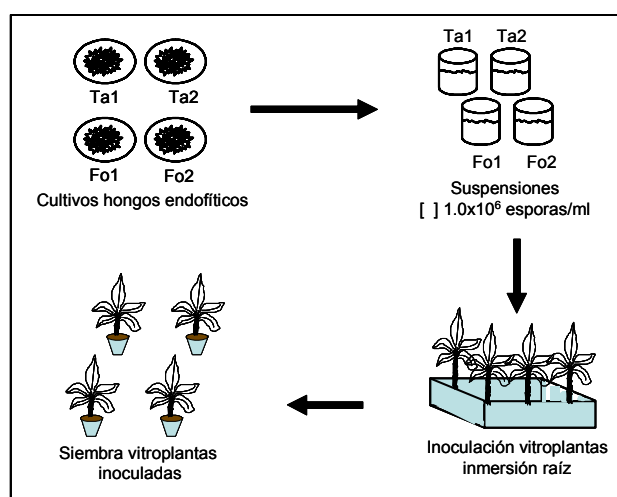


Figura 1: Protocolo de inoculación de hongos endofíticos en vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón). Ta1=*Trichoderma atroviride*; Ta2=*Trichoderma atroviride*; Fo1=*Fusarium oxysporum*; Fo2=*Fusarium oxysporum*, más información Cuadro 1, este artículo.

3.2.5 Variables a evaluar

Para determinar el efecto de los hongos endofíticos sobre la colonización y promoción de crecimiento en las vitroplantas, se realizaron mediciones los días 15, 30, 45 y 60 después de la inoculación, donde se evaluaron los porcentajes de colonización y las variables de crecimiento. Para colonización, se realizó cortes transversales y longitudinales de una muestra compuesta de 5 vitroplantas por tratamiento. 25 segmentos de 1.0 cm de longitud de cada órgano evaluado (raíz, corno, pseudotallo y hoja) fueron desinfectados al 2.5% en NaClO durante 3 minutos, seguidos de 2 enjuagues con agua destilada estéril. Posteriormente, 5 segmentos de cada órgano fueron cultivados en platos Petri (PDA al 10% + ácido láctico) e incubados a 19°C durante una semana (Figura 2). Los porcentajes de colonización se cuantificaron 10 días después de la siembra en los platos Petri mediante observación directa del micelio.

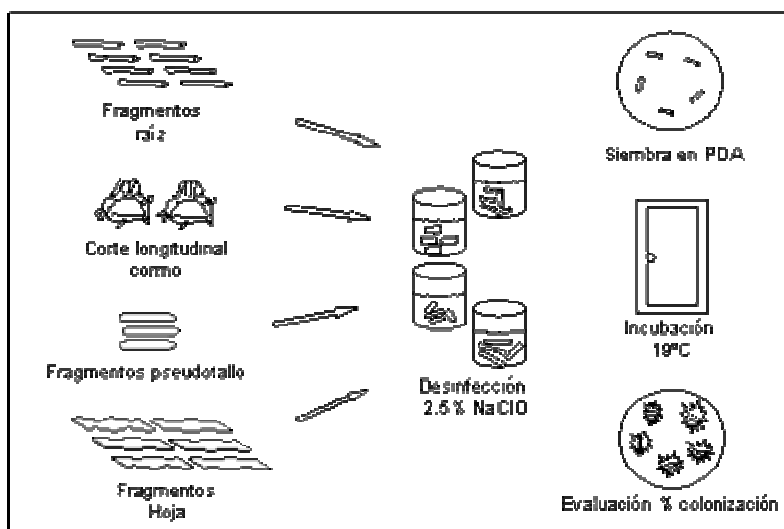


Figura 2: Protocolo de desinfección para el reaslamiento de hongos endofíticos en fragmentos de raíz, corno, pseudotallo y hoja, en vitroplantas de plátano.

Las variables de crecimiento evaluadas fueron: área foliar (obtenida mediante el producto del Largo de la hoja por el Ancho $-L \cdot A-$ multiplicado por 0.8), diámetro del pseudotallo, altura de la planta y peso de la planta (parte aérea + sistema radical).

60 Días Después de la Inoculación (DDI), se realizó un análisis foliar para determinar los micro y macronutrientes, a partir de una muestra compuesta de hojas No. 2 de cinco vitroplantas por tratamiento. Los análisis fueron realizados en el laboratorio de suelos del CATIE.

3.3 Análisis de datos

Las variables respuesta porcentaje de colonización y promoción de crecimiento fueron sometidas a un análisis de varianza, ANAVA, para un diseño completamente al azar (Anexos 1-10). Los datos de porcentaje de colonización al no tener distribución normal, fueron transformados a raíz cuadrada para su análisis respectivo.

3.4 Resultados y Discusión

3.4.1 Determinación del porcentaje de colonización

De acuerdo con el análisis de varianza, se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para raíz ($p=0.0059$), cormo ($p=0.0217$) y hoja ($p=0.0049$). A nivel del pseudotallo no se presentaron diferencias significativas ($p=0.5799$). Los resultados obtenidos en esta investigación, muestran que el porcentaje de colonización más alto a nivel de todos los órganos evaluados fue encontrado en la raíz, seguido por el cormo, pseudotallo y hoja (Cuadro 2).

Cuadro 2: Porcentaje general de colonización de hongos endofíticos en tejidos de raíz, cormo, pseudotallo y hoja, en vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón).

Tratamiento	% Colonización			
	Raíz	Cormo	Pseudotallo	Hoja
T1	53.50 ab	45.88 a	11.50 n.s	8.50 a
T2	65.75 a	45.25 a	9.50 n.s	0.50 b
T3	47.00 ab	34.38 abc	6.00 n.s	0.00 b
T4	23.50 c	17.50 c	3.50 n.s	0.00 b
T5	51.70 ab	40.50 ab	11.25 n.s	2.50 ab
T6	29.70 bc	24.25 bc	7.50 n.s	0.56 b
T7	31.50 bc	22.81 bc	13.38 n.s	4.00 a

Nota: medias seguidas de la misma letra no tienen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con el test (LSD).

Similares resultados fueron reportados por Pocasangre *et al.* (2000), quienes encontraron la mayor frecuencia de ocurrencia de hongos endofíticos en las raíces comparado con cortes de la corteza y cilindro central del cormo en diferentes cultivares de banano. No obstante, Paparu *et al.* (2004; 2006), mostraron que el porcentaje de colonización fue mayor en los tejidos del cormo respecto a la raíz en plantas de banano de los cultivares Kibuzi y Nabusa (AAA-EA) inoculadas con dos cepas diferentes de *Fusarium oxysporum*, concordando con resultados previamente obtenidos por Griesbach (2000).

Así mismo, se observa que independientemente del órgano evaluado, los valores más altos de colonización fueron encontrados en los tratamientos con *Trichoderma* (T1, T2 y T5). Además, es muy probable, que el porcentaje obtenido en el tratamiento de interacción múltiple, donde participan simultáneamente cepas de *Trichoderma* y *Fusarium* (T7), su resultado este altamente influenciado por las cepas *Trichoderma*. En el caso de los *Fusarium* (T3, T4 y T6), se observaron porcentajes de colonización bajos en raíz, cormo y pseudotallo. No obstante, es importante mencionar que el *Fusarium* T3, no presenta diferencias significativas respecto los tratamientos T1, T2 y T5 correspondiente a aislamientos de *Trichoderma*.

Aunque los T3 y T4 a nivel de hoja, no colonizan, el esfuerzo combinado de ambas cepas (T6), arrojan un valor mínimo de colonización. En este órgano se destaca los altos valores de colonización alcanzados por el T1 y el T7, comparado con el resto de tratamientos. Los anteriores resultados priorizan el trabajo colonizador realizado por cepas de *Trichoderma*, probablemente debido a la alta característica oportunista de invadir rápidamente diferentes tejidos u órganos de la planta y esto, cada vez se hace más evidente en las investigaciones donde se emplea este endofítico, independientemente del cultivo (Harman *et al.* 2004). Este éxito en la colonización de *Trichoderma*, se atribuye a la alta capacidad reproductiva, habilidad para sobrevivir bajo condiciones desfavorables, eficiencia en la utilización de nutrientes y capacidad para modificar la rizosfera generando promoción de crecimiento y activando mecanismos de defensa en las plantas (Howell 2003; Chet *et al.* 1997). En el caso de Benítez *et al.* (2004), se discute la eficiencia de colonizar de *Trichoderma* a la facilidad de estos para adherirse a la raíz, resistir los metabolitos secundarios producidos por la planta en respuesta a la invasión de un organismo extraño y, la capacidad de escapar a señales bioquímicas, logrando penetrar y colonizar ampliamente los tejidos de las plantas.

En la Figura 3, se ilustran los porcentajes de colonización evaluados el 15, 30, 45 y 60 Días Después de la Inoculación (=DDI) a nivel de raíz, donde cepas de *Trichoderma* (T1, T2 y T5) muestran un desempeño progresivo en el tiempo durante los primeros 45DDI. A partir de esta fecha, la ventaja es superada por una de las cepas *Fusarium* (T3), la cual 60DDI registró el valor máximo (66%) de colonización.

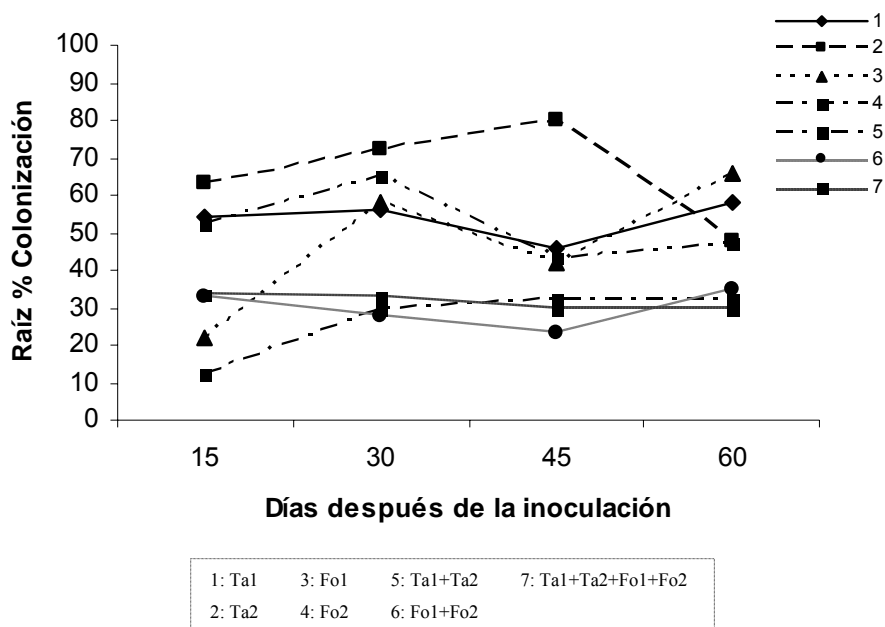


Figura 3: Porcentaje de tejido colonizado por los hongos endofíticos a través del tiempo en fragmentos de raíz, en vitroplantas de plátano. Ta1=*Trichoderma atroviride*; Ta2=*Trichoderma atroviride*; Fo1=*Fusarium oxysporum*; Fo2=*Fusarium oxysporum*

A nivel del cormo (Figura 4), el comportamiento inicial es diferente, donde cepas de *Trichoderma* por separado o combinadas, a los 15DDI obtuvieron los valores más altos de colonización. Este mismo endofítico, a lo largo del tiempo, disminuye paulatinamente el porcentaje de colonización. Es interesante resaltar que a los 45DDI, una de las cepas de *Fusarium* (T3), incrementa el poder de colonización alcanzando y superando a los otros tratamientos. Estos resultados, coinciden con los reportados por Paparu *et al.* (2004), quienes encontraron que la colonización en los tejidos del cormo de banano decrece dramáticamente semanas después de la inoculación, comportamiento que lo atribuye, al hecho de que las cepas empleadas fueron previamente aisladas de la raíz, y no del cormo de plantas adultas, considerando que las propiedades fisiológicas son diferentes para cada órgano de la planta.

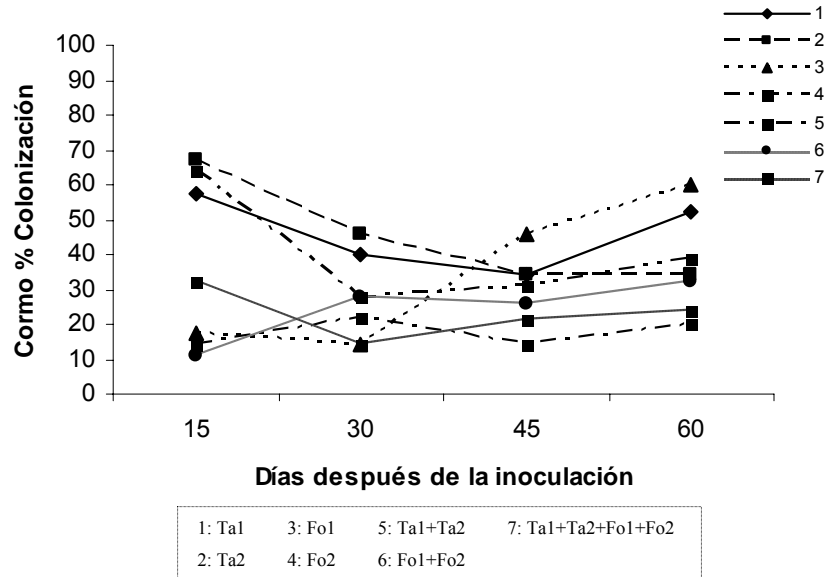


Figura 4: Porcentaje de tejido colonizado por los hongos endofíticos a través del tiempo en fragmentos de cormo, en vitroplantas de plátano. Ta1=Trichoderma atroviride; Ta2=Trichoderma atroviride; Fo1=Fusarium oxysporum; Fo2=Fusarium oxysporum

En pseudotallo, los porcentajes de colonización (2.0–28.0) son bajos. Sin embargo, se observa que el T6, presenta un aumento progresivo, alcanzando un valor máximo (13.0) a los 60DDI. A nivel de hoja, los porcentajes de colonización fueron mínimos respecto a los demás tejidos evaluados. El comportamiento constante mostrado por el T7, probablemente este relacionado con un efecto sinérgico de cepas de *Trichoderma* (Figura 5).

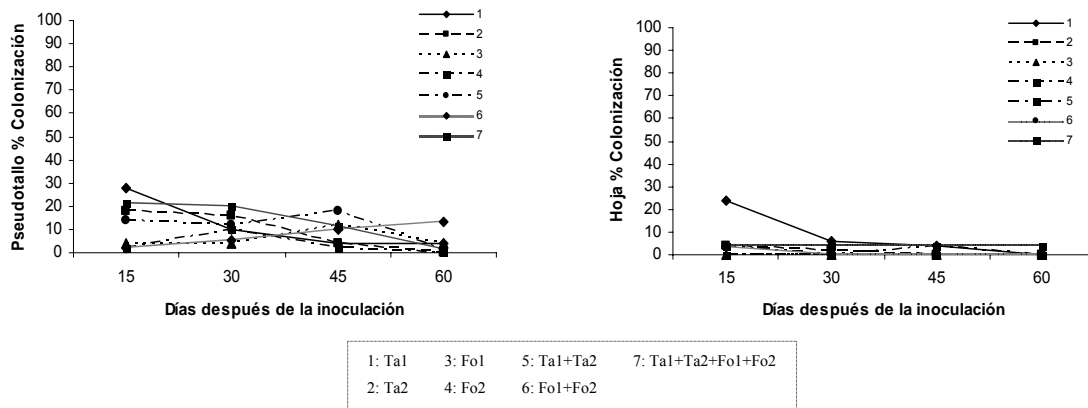


Figura 5: Porcentaje de tejido colonizado por los hongos endofíticos a través del tiempo en fragmentos de pseudotallo y hoja, en vitroplantas de plátano. Ta1=Trichoderma atroviride; Ta2=Trichoderma atroviride; Fo1=Fusarium oxysporum; Fo2=Fusarium oxysporum

La disminución en los porcentajes de colonización en estos tejidos puede ser explicada debido a las características de las cepas, las cuales podrían estar adaptadas a condiciones fisiológicas particulares presentes en la raíz y cormo. Todos los aislamientos de hongos endofíticos evaluados en la presente investigación, fueron originalmente aislados de raíz y cormo de diferentes cultivares de plantas de banano establecidas en plantaciones comerciales de Costa Rica.

3.4.2 Efecto de hongos endofíticos sobre promoción de crecimiento en vitroplantas de plátano

De acuerdo con el análisis de varianza, se encontraron diferencias significativas 60DDI para las variables de promoción de crecimiento área foliar ($p < 0.0001$) y diámetro del pseudotallo ($p < 0.0093$) (Cuadro 3). El T7 registró el mayor valor para área foliar respecto al testigo (T8) y los otros tratamientos evaluados, mientras que el T6 presentó el valor más alto para la variable diámetro del pseudotallo. Las variables de crecimiento: altura ($p = 0.0223$), peso total planta ($p = 0.0001$), peso aéreo ($p = 0.0003$) y peso radical ($p = 0.0013$); aunque, presentan diferencias significativas entre algunos grupos de tratamientos, no son significativas frente al testigo.

Cuadro 3: Efecto de hongos endofíticos en la promoción de crecimiento en vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón) a los 60DDI.

Tratamiento	Área Foliar (cm ²)	Diámetro pseudotallo (cm)	Altura (cm)	Peso (g)		
				Planta	Parte aérea	Raíz
T1	186.88 c	1.37 c	18.69 bc	31.70 c	21.79 c	9.91 b
T2	208.31 c	1.38 bc	20.38 abc	37.14 bc	26.13 bc	11.01 b
T3	196.78 c	1.37 c	17.63 c	34.23 c	23.40 c	10.83 b
T4	210.34 c	1.50 abc	20.56 ab	46.14 ab	31.00 ab	15.14 a
T5	212.21 c	1.51 abc	21.63 a	50.34 a	34.90 a	15.44 a
T6	237.43 c	1.64 a	22.87 a	52.14 a	35.67 a	16.47 a
T7	538.07 a	1.52 ab	21.69 a	50.55 a	34.17 a	16.38 a
T8	436.35 b	1.48 bc	20.03 abc	46.10 a	31.23 ab	15.38 a

Nota: medias seguidas de la misma letra no tienen diferencias significativas ($p \leq 0.05$) de acuerdo con el test (LSD).

Los resultados encontrados en esta investigación para las variables de altura y pesos de la planta (aéreo y radical) concuerdan con los encontrados por Vu (2005), quién reportó que después de dos inoculaciones en plantas de banano con *Fusarium oxysporum* bajo condiciones de invernadero, no hubo diferencias significativas para peso aéreo y radicular con relación al

testigo. Sin embargo, difieren con los reportados por Menjivar (2005), quien encontró que plantas de banano protegidas con *Trichoderma* y *Fusarium* mostraron una mayor promoción de crecimiento en lo que respecta a altura y emisión foliar comparado con el testigo. Asimismo, Meneses (2003), obtuvo un efecto en la promoción de crecimiento en plantas de banano inoculadas con hongos endofíticos, reflejado en un incremento (39 y 19%, respectivamente) en el peso foliar y radical superiores al testigo. Resultados similares fueron encontrados por Cañizares (2003) en plantas de banano y plátano protegidas con hongos endofíticos, donde muestra incrementos en peso foliar y radical (24 y 38%, respectivamente) por encima del control. Otros estudios, también, indican que plantas de banano del cv. Gran Enano (AAA) protegidas con aislamientos de hongos endofíticos presentaron pesos superiores del sistema radical y foliar que plantas no protegidas (Pocasangre 2002; zum Felde 2002). Niere *et al.* (1999), encontraron que la inoculación de plantas de banano del cv. Gros Michel, con cepas de *Fusarium oxysporum*, resultó en un aumento promedio del 18% en la planta comparado con el testigo.

El análisis entre tratamientos, muestra tendencia a favor de combinaciones por separado y en asocio de aislamientos de *Trichoderma* y *Fusarium* (T5, T6 y T7). Además, comparando el efecto independiente de ambos géneros, se observa que las cepas *Fusarium* (T6) presentan consistentemente los valores más altos de crecimiento respecto a las cepas de *Trichoderma* trabajando en conjunto, aunque estadísticamente no es diferente del T5 en las variables área foliar, altura y diámetro del pseudotallo.

Lo anterior sugiere un efecto positivo en el crecimiento de las plantas por parte de la acción sinérgica de estos hongos en asocio. Ramamoorthy *et al.* (2001), afirman que mezclas de antagonistas microbiales, pueden tener un comportamiento similar al logrado por elevadas poblaciones de un único antagonista. De acuerdo con Ali *et al.* (2002), una mezcla de varios agentes de control biológico introducidas en el suelo, puede imitar la situación natural y, por lo tanto, podría ampliar el espectro de actividad de estos organismos. Fisher and Petrini (1992), consideran que muchas combinaciones de microorganismos pueden ser usadas, aunque no exista un efecto sinérgico directo.

3.4.3 Determinación de los niveles de Ca, Mg, K y P a nivel foliar en las vitroplantas de plátano

Los análisis foliares, se realizaron 60 DDI, donde fueron considerados los datos para Ca, Mg, K, P, Cu, Zn, Mn y Fe (Anexo 11). En esta investigación se hace referencia a los primeros cuatro elementos, dada la importancia de estos, en el equilibrio nutricional del cultivo en estudio. Los porcentajes más bajos de Ca (0.34) fueron encontrados para los tratamientos T2, T3 y T4, mientras, que los tratamientos T1 y T3 tuvieron los menores valores de Mg (0.29) y P (0.07), en tanto que, para K el tratamiento T8 presentó el valor más bajo (2.15) (Figura 6).

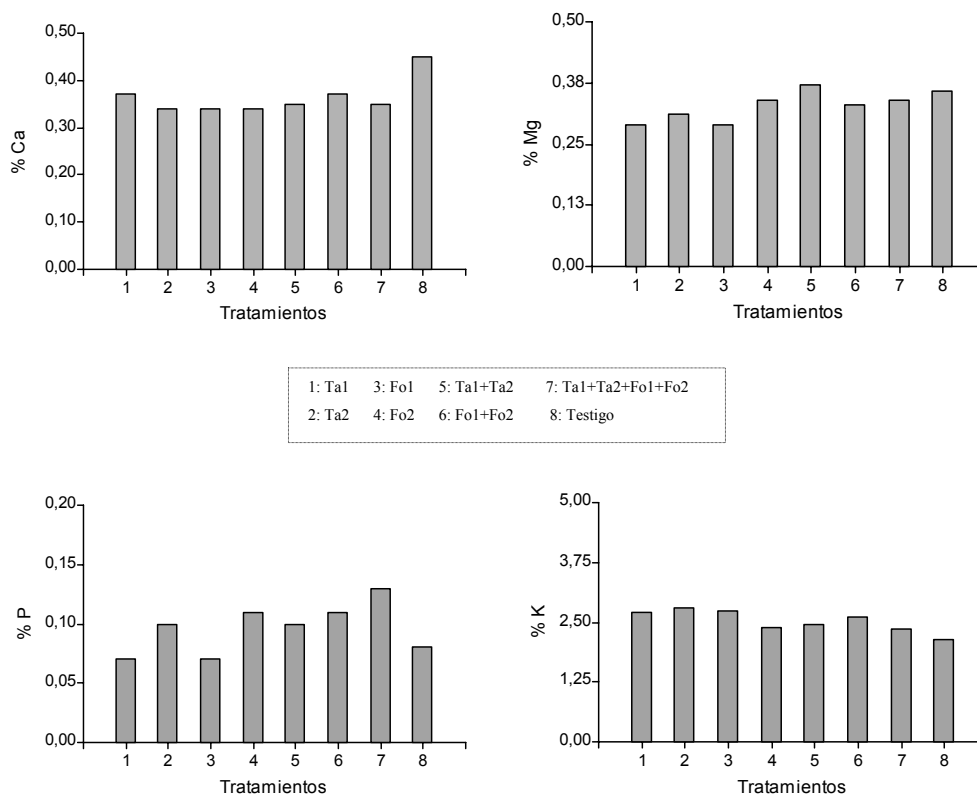


Figura 6: Porcentajes foliares de Ca, Mg, P y K en vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón) inoculadas con hongos endofíticos. Ta1=Trichoderma atroviride; Ta2=Trichoderma atroviride; Fo1=Fusarium oxysporum; Fo2=Fusarium oxysporum.

Dada la importancia de monitorear la relación de equilibrio Ca-Mg-K en este cultivo, López y Espinoza (1995), establecieron que los porcentajes relativos para Ca deberían estar en un rango de 20-27%, Mg entre 18-20% y K, entre 55-61%, como indicadores de una relación óptima entre los elementos.

De los tres elementos evaluados, el K es sin duda el que presenta el porcentaje más cercano entre los rangos establecidos para este elemento. Para el caso del Mg, los niveles se encuentran superiores al rango óptimo, y el Ca presenta valores por debajo del nivel establecido (Cuadro 4). Camacho (1997), encontró en plantas de banano inoculadas con *Trichoderma*, bajo condiciones de invernadero, niveles altos de Ca (36.40%) y Mg (27.92%), mientras que, el K se encontraba muy debajo del rango normal (35.68%), hecho que atribuye al fenómeno antagónico de la relación Ca-Mg-K, puesto que un alto contenido de un elemento puede influir en los contenidos de los otros.

Cuadro 4: Relación de equilibrio Ca-Mg-K foliar en vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón) 60 DDI con hongos endofíticos.

Tratamientos	%			miliequivalentes				% relativo		
	Ca	Mg	K	Ca	Mg	K		Ca	Mg	K
T1	0.37	0.29	2.72	18.50	24.16	69.74	112.40	16.45	21.49	62.04
T2	0.34	0.31	2.80	17.00	25.83	71.79	114.62	14.83	22.53	62.63
T3	0.34	0.29	2.75	17.00	24.16	70.51	111.67	15.22	21.63	63.14
T4	0.34	0.34	2.40	17.00	28.33	61.53	106.86	15.90	26.51	57.58
T5	0.35	0.37	2.46	17.50	30.83	63.07	111.40	15.70	27.67	56.61
T6	0.37	0.33	2.61	18.50	27.50	66.92	112.92	16.38	24.35	59.26
T7	0.35	0.34	2.35	17.50	28.33	60.25	106.08	16.49	26.70	56.41
T8	0.45	0.36	2.15	22.50	30.00	55.12	95.62	23.53	31.37	57.64

Nota: $meqCa = \%Ca / 0.020$; $meqMg = \%Mg / 0.012$; $meqK = \%K / 0.039$

En el Cuadro 4, los valores elevados del Mg, pueden ser explicados posiblemente como un detrimento del Ca, obteniendo valores inferiores a los normales. Sin embargo, es muy posible que el desequilibrio observado en los tratamientos T1 al T7 obedezca a la actividad de los hongos endofíticos en la toma de nutrientes del suelo o de la planta para sobrevivir.

Por otra parte, es conocido que cepas de *Trichoderma* tienen la habilidad para modificar su ambiente circundante, pudiendo acidificar el suelo mediante la secreción de ácidos orgánicos, lo que resulta en el metabolismo de otras fuentes de carbono (glucosa), capaces de solubilizar fosfatos, e intervenir en el equilibrio de micronutrientes y minerales. Por tanto, la adición de *Trichoderma* al suelo, resulta en la biofertilización por la solubilización del metal incrementando la riqueza del mismo (Harman *et al.* 2004; Gómez y de la Torre 1994).

3.5 Conclusiones

Trichoderma atroviride y *Fusarium oxysporum* revelan mayor éxito en la colonización en tejidos de raíz y cormo, respecto al pseudotallo y hoja. *Trichoderma* presenta mayor habilidad para colonizar comparado con los aislamientos de *Fusarium*, hecho que se atribuye a la rápida capacidad reproductiva y adaptación de este endofítico a las diferentes condiciones fisiológicas, en los órganos evaluados.

Aislamientos de hongos mutualistas de *Trichoderma atroviride* inoculados en las raíces de las plantas, disminuyen su poder de colonización a través del tiempo, en tanto que cepas de *Fusarium oxysporum* mostraron un aumento paulatino en la colonización de tejido.

Vitroplantas inoculadas con las combinaciones de hongos endofíticos (T6 y T7), mostraron un efecto en promoción de crecimiento en las variables diámetro del pseudotallo y área foliar respecto al testigo.

El fenómeno de promoción de crecimiento donde se utiliza microorganismos benéficos, parece estar relacionado con las interacciones y asociaciones que se suceden a nivel de rizosfera y microflora presente en el suelo. Combinaciones de cepas de un mismo hongo (T5 o T6), como combinaciones múltiples (T7), funcionan mejor trabajando en conjunto que cepas independientes.

El desbalance foliar registrado en los valores para el Ca y Mg, podría obedecer a la actividad de los hongos endofíticos en la toma de nutrientes del suelo o de la planta para sobrevivir.

Esta investigación, es el primer reporte que evidencia la colonización de hongos endofíticos a nivel de raíz, cormo, pseudotallo y hoja en vitroplantas de plátano inoculadas artificialmente. Los resultados aquí presentados, son base para estudios enfocados a determinar y establecer tipos de cepas de hongos endofíticos con mayor persistencia y duración en los tejidos de la planta, permitiendo generar promoción de crecimiento e inducción de resistencia local o sistémica contra patógenos foliares.

3.6 Bibliografía

- Ali, NI; Siddiqui, IA; Zaki, MJ; Anzari, MA. 2002. Variation between strains of *Pseudomonas bacterium*. 1. Effects on root-infecting fungi. Pakistan Journal of Biological Sciences, Vol. 4, 17-19.
- Benítez, T; Rincon, AM; Limón, MC; Codón, AC. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology, Vol. 7, 249-260.
- Camacho, JC. 1997. Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento e inductores de resistencia a Sigatoka negra (*M. fijiensis*) en banano (*Musa* sp.) y algunas observaciones sobre la gutación. Tesis MSc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. p 122.
- Cañizares, CA. 2003. Estudio sobre poblaciones de hongos endofíticos provenientes de suelos supresivos al nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorne en plantaciones comerciales de plátano en la zona de Talamanca, Costa Rica. Tesis MSc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. p 75.
- Chet, I; Inbar, J; Hadar, I. 1997. Fungal antagonists and mycoparasites. In: The Mycota IV: Environmental and microbial relationship. Wicklow DT, Söderström B. (eds). Springer-Verlag, Berlin, p. 165-184.
- Diouf, D; Diop, TA; Ndoye, I. 2003. Actinorhizal, mycorrhizal and rhizobial symbioses: how much do we know? African Journal of Biotechnology, Vol. 2, No1, 1-7.
- Dubois, T; Gold, CS; Papparu, P; Athman, S; Kapindu, S. 2006. Tissue culture and the *in vitro* environment. Enhancing plants with endophytes: potential for ornamentals? In: Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Tropical Issues. 1ra. Ed. Global Science Books, London. Teixeira Da Silva, J. (ed.)
- Fisher, PJ; Petrini, O. 1992. Fungal saprobes and pathogens as endophytes of rice (*Oryza sativa* L.). New Phytologist, Vol. 120, 137-143.
- Gómez, AG; de la Torre, MA. 1994. Mecanismos de corrosión microbiana sobre los materiales pétreos. Microbiología, Vol. 10, 111-120 p.
- Griesbach, M. 2000. Occurrence of mutualistic fungal endophytes in bananas (*Musa* spp.) and their potential as biocontrol agents of banana weevil *Cosmopolites sordidus* (Germar) in Uganda. Ph.D. Thesis, University of Bonn, Bonn, Germany.
- Hallman, J; Sikora, RA. 1996. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. European Journal of Plant Pathology, Vol. 102, 155-162.
- Harman, GE. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma harzianum* spp. Phytopatology, Vol. 96, 190-194.
- Harman, GE; Howell, RH; Viterbo, A; Chet, I; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology, Vol. 2, 43-56.

- Howell, CR. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, Vol. 87, No.1, 4-10.
- Kloepper, JW; Schroth, MN. 1981. Relationship of *in vitro* antibiosis of plant growth promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*, Vol. 70, 1078-1082.
- Liu, L; Kloepper, JW; Tuzun, S. 1995a. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, Vol. 85, 695-698.
- Liu, L; Kloepper, JW; Tuzun, S. 1995b. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*, Vol. 85, 843-847.
- López, A; Espinosa, J. 1995. Manual de nutrición y fertilización del banano. Una visión práctica del manejo de fertilización. Corbana. 82 p.
- Meneses, A. 2003. Utilización de hongos endofíticos provenientes de banano orgánico para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. Tesis MSc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. p 67.
- Menjívar, RD. 2005. Estudio del potencial antagonista de hongos endofíticos para el biocontrol del nematodo barrenador *Radopholus similis* en plantaciones de banano en Costa Rica. Tesis MSc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. p 69.
- Narisawa, K; Kawamata, H; Currah, RS; Hashiba, T. 2002. Suppression of *Verticillium* wilt in eggplant by some fungal root endophytes. *European Journal of Plant Pathology*, Vol. 108, 103-109.
- Niere, BI; Speijer, PR; Gold, CS; Sikora, RA. 1999. Fungal endophytes from bananas for the biocontrol of *Radopholus similis*. In: Proceedings of a workshop on banana IPM held in Nelspruit. Inibap, Montpellier. Frison, EA; Gold, CS; Karamura, EB; Sikora, RA. (eds). 313-318.
- Paparu, P; Dubois, T; Gold, CS; Niere, B; Adipala, E; Coyne, D. 2006. Colonisation pattern of nonpathogenic *Fusarium oxysporum*, a potential biological control agent, in roots and rhizomes of tissue cultured *Musa* plantlets. *Annals of Applied Biology*, Vol. 00, 1-8.
- Paparu, P; Dubois, T; Gold, CS; Adipala, E; Niere, B; Coyne, D. 2004. Inoculation, colonization and distribution of fungal endophytes in *Musa* tissue culture plants. *Uganda Journal of Agricultural Sciences*, Vol. 9, 583-589.
- Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In: *Microbial Ecology of Leaves*. Andrews, J; Hirano, S (eds). Springer-Verlag, New York, USA.
- Pocasangre, LE; Menjívar, RD; zum Felde, A; Riveros, AS, Rosales, FE; Sikora, RA. 2006. Hongos endofíticos como agentes biológicos de control de fitonematodos en banano. En: *Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat*. Joinville, SC, Brasil. Vol. 1. Bananicultura: un negocio sostenible. Soprano, E; Tcacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds.) Editorial, Epagri, Estación experimental de Itajaí, SC, Brasil. p.249-254.

- Pocasangre, LE. 2003. Nuevas estrategias para el manejo de nematodos en musáceas. En: Taller convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas. (eds) Musalac/Inibap/Fontagro. Guayaquil, Ecuador. 38p.
- Pocasangre, LE. 2002. Mejoramiento biológico de vitroplantas de banano mediante la utilización de hongos endofíticos para el control del nematodo barrenador (*Radopholus similis*). En: Inducción de resistencia y uso de tecnologías limpias para el manejo de plagas en plantas. Riveros, AS; Pocasangre, LE; Rosales, FE. (eds). 33-39 p.
- Pocasangre, LE; Sikora, RA; Vilich, V; Schuster, RP. 2000. Encuesta sobre los hongos endofíticos del banano de América Central y el cribado para el control biológico del nematodo barrenador (*Radopholus similis*). Infomusa, Vol. 9, 3-5.
- Ramamoorthy, V; Raguchander, T; Samiyappan, R. 2001. Induction of defense-related proteins in tomato roots treated with *Pseudomonas fluorecens* Pfl and *Fusarium oxysporum* f.sp. *Lycopersici*. Plant and soil, Vol. 239, 55-68.
- Raupach, GS; Liu, L; Murphy, JF; Tuzun, S; Kloepper, JW. 1996. Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). Plant Disease, Vol. 80, 891-894.
- Sikora, RA; Pocasangre, LE. 2006. The concept of a suppressive banana plant: root health management with a biological approach. En: Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil. Banicultura: un negocio sostenible. Soprano, E; Tcacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds.) Editorial, Epagri, Estación experimental de Itajaí, SC, Brasil. p.241-248.
- Soto, MJ; Oliva, JJ; Sanjuán, J; Olivares, J. 2006. Simbiosis mutualista *Rhizobium*-Leguminoza versus patogénesis. En: Fijación de nitrógeno: Fundamentos y aplicaciones. Eulogio, J; Bedmar, JJ; González, CL; Belén, R (eds). Capítulo 13, España. p. 139-149.
- Vu, TT. 2005. Modes of action of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* endophytes for bio-enhancement of banana toward *Radopholus similis* activity in absence of banana. Comm. Appl. Biol. Sci. Ghent. University, Vol. 69, No.3, 381-385.
- zum Felde, AK. 2002. Screening of endophytic fungi from Banana (*Musa*) for antagonistic effects towards the burrowing nematode, *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. Thesis MSc University of Bonn, Germany. p 53.

4 ARTÍCULO 2. Efecto de hongos endofíticos mutualistas para el control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en vitroplantas de plátano, bajo condiciones controladas de invernadero.

4.1 Introducción

El cultivo del plátano tiene una especial importancia a nivel de pequeños productores, al constituirse alimento esencial en la dieta básica y generar ingresos al grupo familiar. A nivel mundial, se cultiva en un área de 5 290 107 hectáreas, con una producción aproximada de 34 millones de TM/año, siendo el África y la América Latina y el Caribe las regiones más productoras del mundo (FAO 2006; Belálcazar 1998).

La Sigatoka negra, enfermedad foliar causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, es considerada uno de los factores más limitantes en la producción mundial de banano y plátano. Esta enfermedad, reduce significativamente el área funcional de la hoja, disminuyendo el proceso fotosintético de la planta, haciendo que la misma llegue a la floración con pocas hojas, afectando la calidad del racimo, lo que resulta en pérdidas de rendimiento y productividad del cultivo. Los programas de control, dependen principalmente de las prácticas culturales y de la aplicación rutinaria de fungicidas químicos, provocando un alto impacto ambiental, representado en daños a la salud humana y animal, sumado a costos elevados de producción (Romero 2006; Marín *et al.* 2003).

Estrategias alternativas para el manejo de la Sigatoka negra, basadas en el uso de microorganismos (glucano y quitinolíticos), inductores endógenos y exógenos de origen biótico o abiótico, empleo de extractos vegetales y lixiviados de compost y vermicompost, están siendo investigadas (Patiño *et al.* 2006; Orozco-Santos y Orozco-Romero 2006; Guzmán 2006; Larco 2004; Riveros *et al.* 2002). En otros patosistemas, igualmente, actuando a nivel foliar, se ha sugerido el aprovechamiento del potencial que ofrece la inoculación a nivel radical de hongos endofíticos mutualistas, con capacidad de producir antibióticos para defensa local y liberar iones o moléculas activadoras “elicitores” de la defensa sistémica que asegura un modo de acción mediando resistencia sistémica adquirida y activando enzimas relacionadas con la defensa en la planta huésped (Harman *et al.* 2004; Benítez *et al.* 2004).

El objetivo de este estudio, fue el de evaluar bajo condiciones controladas de invernadero, el efecto de la inoculación de cuatro cepas de hongos endofíticos y sus

respectivas combinaciones, en la inducción de resistencia para el control de Sigatoka negra, en vitroplantas de plátano.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 Localización del estudio

El estudio se llevó a cabo en los laboratorios de Diagnóstico, Fitopatología y el invernadero de Musáceas del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza “CATIE”, localizado en el cantón de Turrialba, a una altura de 602 msnm, temperatura promedio de 21°C y precipitación media anual de 2600 mm.

4.2.2 Material vegetal y fúngico

Se utilizaron 120 vitroplantas de plátano del cv. Dominico-Hartón (*Musa* AAB) en fase IV de endurecimiento. Las plantas fueron inoculadas con cuatro aislamientos de hongos endofíticos suministrados por el Laboratorio de Nematología del CATIE (Dr. Luis E. Pocasangre) y dispuestas en aclimatación en el invernadero por tres meses. La cepa CRPE01 de *Mycosphaerella fijiensis*, fue suministrada por el Laboratorio de Diagnóstico del CATIE (Dra. Alba Stella Riveros) y fue utilizada para la inoculación, a nivel foliar, de las vitroplantas.

4.2.3 Descripción de los tratamientos

Cuatro aislados de hongos endofíticos: *Trichoderma atroviride* (T1 y T2) y *Fusarium oxysporum* (T3 y T4), con sus respectivas combinaciones (T1+T2, T3+T4 y T1+T2+T3+T4) y un testigo absoluto (T8), fueron evaluados para el control de Sigatoka negra (Cuadro 5). El testigo (T8), consistió de plantas no inoculadas con las cepas de hongos endofíticos, pero si con el inóculo de *Mycosphaerella fijiensis*.

Cuadro 5: Descripción y origen de los tratamientos utilizados en el estudio de hongos endofíticos como inductores de resistencia para el control de *Sigatoka negra* en vitroplantas de plátano.

Tratamiento	Origen	Hongos endofíticos
T1	Guatemala	<i>Trichoderma atroviride</i> (Ta1)
T2	Sixaola, Costa Rica	<i>Trichoderma atroviride</i> (Ta2)
T3	Sixaola, Costa Rica	<i>Fusarium oxysporum</i> (Fo1)
T4	Talamanca, Costa Rica	<i>Fusarium oxysporum</i> (Fo2)
T5	Guatemala y Sixaola, Costa Rica	Ta1 + Ta2
T6	Sixaola, Costa Rica	Fo1 + Fo2
T7	Guatemala, Sixaola y Talamanca	Ta1 + Ta2 + Fo1 + Fo2
T8	----	Plantas no inoculadas

4.2.4 Inoculación de vitroplantas con hongos endofíticos

Quince vitroplantas por tratamiento, a excepción del testigo (T8), fueron inoculadas con la suspensión de esporas de hongos endofíticos ajustada a una concentración de 1.0×10^6 esporas/ml. La inoculación consistió en la inmersión del sistema radical de las vitroplantas durante 5 minutos en las suspensiones del hongo endofítico o mezcla, según su tratamiento. Posteriormente, las plantas fueron sembradas en bolsas de polietileno conteniendo un sustrato previamente autoclavado, compuesto por suelo, arena y granza (2:1:1). Las plantas fueron mantenidas en aclimatación durante 3 meses en el invernadero a una temperatura de 25 ± 2 °C, con frecuencia de riego, según capacidad de campo y recibiendo una fertilización (10:30:10) edáfica.

4.2.5 Evaluación de resistencia a la *Sigatoka negra*

4.2.5.1 Inoculación de vitroplantas con *Mycosphaerella fijiensis*

Después de los 3 meses de aclimatación, se seleccionaron 8 vitroplantas por tratamiento para la inoculación con *M. fijiensis*. Una suspensión conidial preparada a partir de cultivos (V8: 100ml/L+CaCO₃: 2g/L+BactoAgar: 15g/L) de *M. fijiensis* con una semana de crecimiento a una temperatura de 24 ± 1 °C y con concentración de 2×10^5 conidios/ml fue utilizada para la inoculación. La suspensión conidial contenía como adherente gelatina al 0.5%, la cual fue asperjada sobre el envés de la hoja No.2 de cada planta con una doble presión de inóculo aplicada con 15 minutos de intervalo utilizando un equipo de aspersión

(Aerógrafo BADGET*-Figura 7). Posteriormente, las plantas se colocaron en una cámara de incubación, donde se mantiene, mediante nebulización programada a cada hora, una humedad relativa del 95% durante las primeras 72 horas después de la inoculación, con el fin de favorecer la germinación de conidias y la penetración de los tubos germinativos del patógeno. 72 horas después de la inoculación, las plantas se mantuvieron por 7 días consecutivos con nebulizaciones programadas, en otro ritmo, asegurando una humedad relativa del 75%, lo cual permitió asegurar el progreso en la colonización intercelular del patógeno (Anexo 12). Terminado este periodo, las plantas fueron dispuestas en los mesones del invernadero para la evaluación de resistencia a la enfermedad mediante las escalas de Fouré (1985) y Romero (2005).

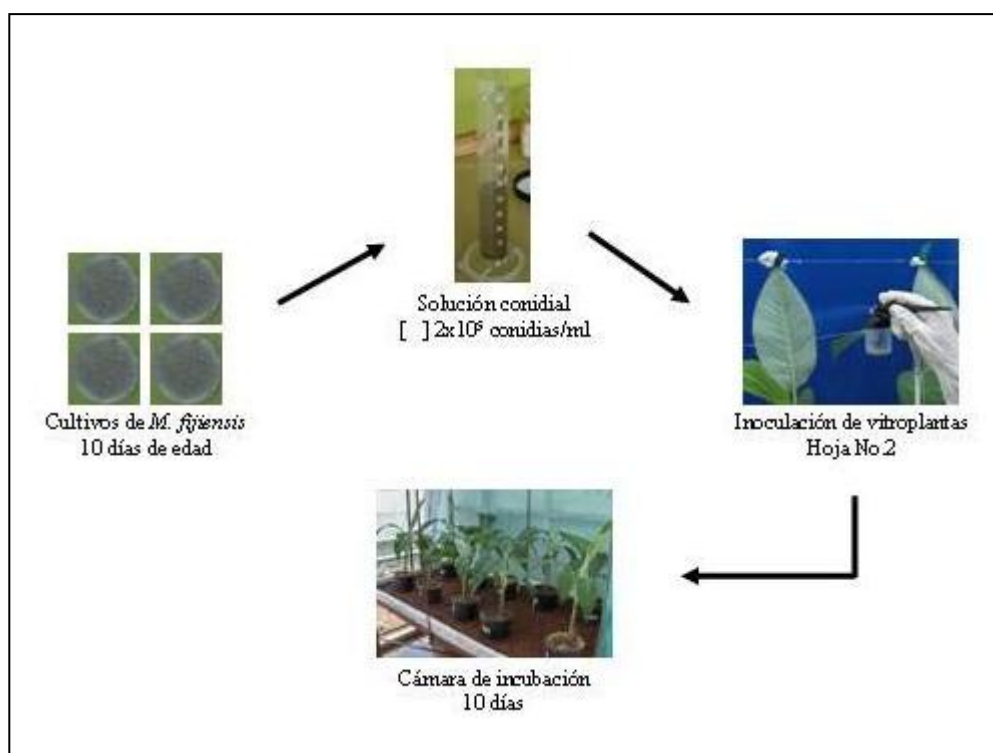


Figura 7: Protocolo de inoculación de *Mycosphaerella fijiensis* en la hoja No.2 en vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón) bajo condiciones controladas de invernadero.

* Aerógrafo BADGET, sistema de pulverización de gota fina sobre una superficie.

4.2.6 Metodología de evaluación

La evaluación de resistencia a la Sigatoka negra en las vitroplantas inoculadas, se basó en las escalas de Fouré (1985) y Romero (2005) (Cuadro 6 y Figura 8, respectivamente).

Cuadro 6: Escala de Fouré (1985) para la evaluación de resistencia a la Sigatoka negra en vitroplantas de plátano (cv.Dominico-Hartón), inoculadas con M. fijiensis bajo condiciones controladas de invernadero.

E0 = Sin síntomas.

E1 = Manchas de color blancuzco o amarillo con pequeños puntos negros en la zona central.

E2 = Surge como una raya, de color café visible en el envés de la hoja que cambia progresivamente de color café a negro.

E3 = Primeras estrías representadas en rayas que pueden alcanzar una longitud de 2 a 3 mm.

E4 = Visible por la haz de la hoja como una mancha negra, claramente apreciada a simple vista.

E5 = Presencia de un halo amarillo que rodea la mancha negra extendida en la haz de la hoja.

E6 = Ocurre cuando el centro de la mancha negra se seca y adquiere un color gris claro rodeado por un halo de color amarillo brillante.

El desarrollo de síntomas de la enfermedad basados en la escala de Fouré (1985), complementó la evaluación determinando el **Periodo de Incubación (PI)**: número de días desde el momento de la inoculación hasta la aparición del primer Estadio (E1-pizcas); **Periodo de Latencia (PL)**: tiempo transcurrido entre la aparición de las estrías y las primeras manchas en Estadio seis (E6); **Tiempo de Evolución de Síntomas (TES)**: número de días desde la aparición del E1 hasta el E6 y el **Tiempo de Desarrollo de la Enfermedad (TDE)**: número de días entre el momento de la inoculación y la aparición de las primeras manchas en E6.

La escala de Romero (2005), trabaja con Grados de la enfermedad que muestran el porcentaje de área afectada en la hoja (Figura 8). Esta escala fue el resultado de múltiples observaciones del desarrollo de síntomas con cepas costarricenses de *M. fijiensis* altamente virulentas sobre diferentes cultivares, tanto de banano como de plátano. Se consideró esta escala construida como una herramienta metodológica estrictamente para medir los síntomas bajo condiciones controladas de invernadero, donde se ajusta programas de humectación-nebulización en aras de lograr el óptimo desarrollo del patógeno.

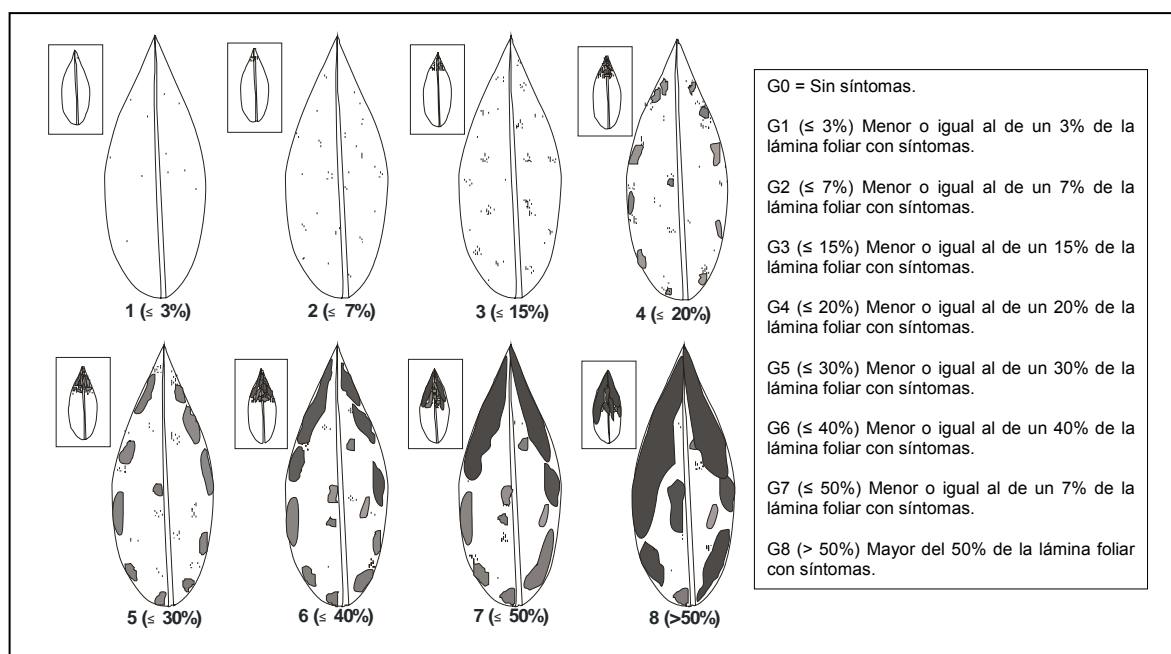


Figura 8: Escala para la evaluación de resistencia a la Sigatoka negra en vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón), inoculadas artificialmente con *M. fijiensis*, bajo condiciones controladas de invernadero.

4.2.7 Lecturas de unidades SPAD de clorofila

Los niveles de clorofila presentes en las vitroplantas, se realizaron mediante estimaciones diarias sobre el área foliar de la hoja No. 2, a razón de 4 lecturas tomadas en diferentes partes de la hoja con ayuda de un clorofilometro MINOLTA SPAD-502^{**}, el cual cuantifica la cantidad de unidades de longitud de onda dentro del rango del espectro de

^{**} Clorofilometro SPAD-502 (marca MINOLTA), mide la absorbancia de luz en la longitud de onda correspondiente al rojo (600-700nm). Provee información instantánea acerca de la clorofila presente en las hojas de las plantas.

clorofila, midiendo la luz que se trasmite a través de una hoja y estimando la cantidad de luz de absorbancia capturada por los pigmentos verdes (Anexo 13).

4.2.8 Variables a evaluar

A partir del día 10, y a intervalos de 5 días después de la inoculación con *M. fijiensis*, se llevó a cabo la evaluación de los síntomas, con el fin de determinar el efecto de los hongos endofíticos en el control de la enfermedad. Se tomaron datos del Periodo de Incubación (PI), Periodo de Latencia (PL), Tiempo de Evolución de Síntomas (TES) y Tiempo de Desarrollo de la Enfermedad (TDE). También, se realizaron estimaciones diarias de los niveles de clorofila.

Para el análisis de datos, las variables Periodo de Latencia (PL), Tiempo de Desarrollo de la Enfermedad (TDE) y Tiempo de Evolución de Síntomas (TES) fueron sometidas a un análisis de varianza, ANAVA, para un diseño completamente al azar (Anexos 14-16).

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Evaluación de resistencia a la Sigatoka negra

La evaluación de resistencia a la Sigatoka negra se basó en las escalas de Fouré (1985) y Romero (2005). En la figura 9, se observa el avance de la enfermedad en el tiempo, según los estadios de Fouré (1985). 10 días después de la inoculación de *M. fijiensis*, todos los tratamientos mostraron en la totalidad de las hojas tratadas síntomas en estadio uno (E1) manteniéndose este comportamiento hasta el día 15 después de la inoculación. Para el día 20, se observa un avance en el desarrollo de la enfermedad, donde los tratamientos T1, T3, T4, T6 y T7 alcanzan el estadio dos (E2), mientras que, los tratamientos T2, T5 y T8 alcanzan un estadio tres (E3). En el día 25, todos los tratamientos, a excepción del T4 (*F. oxysporum*), llegan al estadio cuatro (E4). Al día 30, se observa el progreso de la enfermedad, evidenciando un estadio cinco (E5) para el conjunto de tratamientos evaluados. Las primeras lesiones en estadio seis (E6), se logra observar 35 días después de la inoculación en todos los tratamientos, exceptuando el mismo T4, quien alcanza el E6 al día 40 de evaluación. En términos generales, los resultados obtenidos, muestran un desarrollo paulatino de la enfermedad en todas las plantas inoculadas con el patógeno, destacándose el comportamiento

observado por el T4 (*F. oxysporum*) quien solo cinco días más tarde alcanzó el último estadio de desarrollo de la enfermedad (Anexo 17).

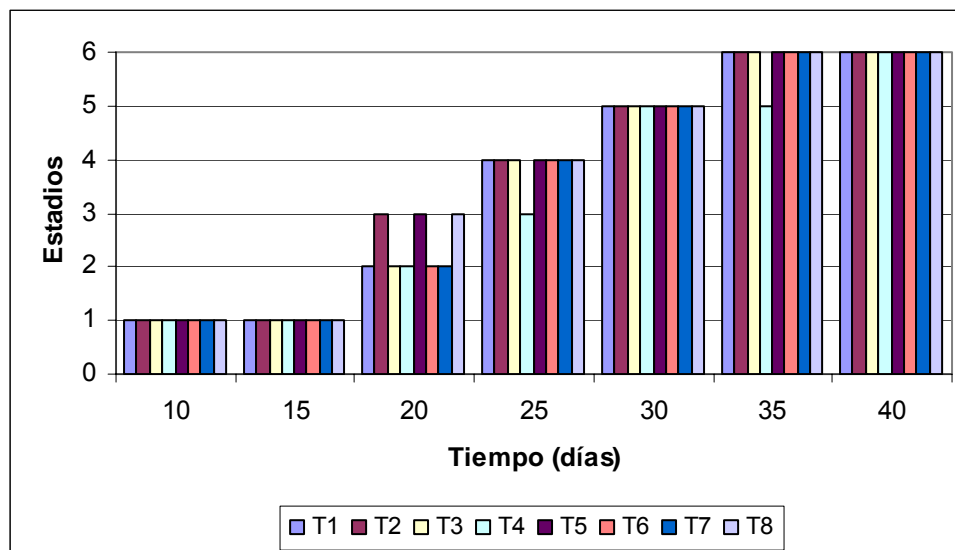


Figura 9: Desarrollo de síntomas de la enfermedad, Sigatoka negra, en la hoja No.2 de vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón) inoculadas bajo condiciones controladas de invernadero. Escala de Fouré (1985).

Los resultados anteriormente presentados, son consistentes con los obtenidos mediante la escala de grados propuesta por Romero (2005), quien reporta un desarrollo de síntomas y avance de la enfermedad a lo largo de 70 días de evaluación en vitroplantas de plátano tolerantes y susceptibles a *M. fijiensis*, inoculadas artificialmente y evaluadas bajo condiciones controladas de invernadero. El objetivo de dicho estudio, fue desarrollar y validar una metodología a nivel de invernadero, mediante la implementación de una Escala que debió ser ajustada, luego de múltiples lecturas del seguimiento de síntomas de la enfermedad. Esta escala muestra diferencia con la diseñada a nivel de campo por Fouré (1985), donde la inoculación del patógeno ocurre en forma natural.

En la figura 10, se observa para todos los tratamientos las primeras lesiones ($\leq 3\%$) de la enfermedad 15 días después de la inoculación de *M. fijiensis*. Para el día 20, se observa un avance de la enfermedad hasta el Grado dos (G2: $\leq 7\%$) en los tratamientos, exceptuando el T4 quien únicamente muestra el G1 ($\leq 3\%$). Al día 25, todos los tratamientos en conjunto, presentan un grado G4 ($\leq 20\%$) en el desarrollo de la enfermedad, aumentando para el día 30 al grado G6 ($\leq 40\%$), a excepción del T1 y T4 quienes alcanzan un grado G5 ($\leq 30\%$). A los 35 días, se observa un grado G7 ($\leq 50\%$) para la mayoría de los tratamientos evaluados, llegando

al grado G8 (>50%) de lesión a los 40 días después de la inoculación del patógeno, en tanto que, el T4 solo alcanza un G6 a los 35 días y el máximo grado de lesión (G8) al día 40.

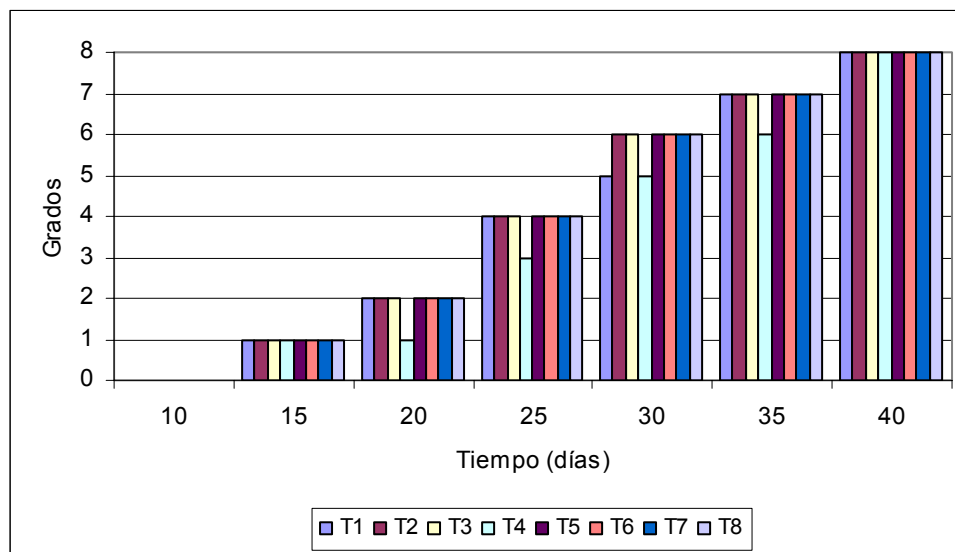


Figura 10: Desarrollo de síntomas de la enfermedad, Sigatoka negra, de acuerdo a la escala de Romero (2005), en la hoja No. 2 de vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Harton) inoculadas bajo condiciones controladas de invernadero.

Aunque, en este estudio no se logró evidenciar en forma clara una respuesta de inducción de resistencia para el control de la enfermedad, si es claro que en otros cultivos donde se han realizado investigaciones empleando HE mutualistas inoculados a nivel radical, estos activan mecanismos de defensa en la planta, protegiéndola contra el ataque de plagas y/o enfermedades (Dubois *et al.* 2006; Harman *et al.* 2004; Benítez *et al.* 2004).

Mandeeel y Baker (1991), demostraron en campo, que cepas de *Fusarium oxysporum* no patogénico inoculadas a nivel radical en plantas de *Cucumis sativa*, reducen notablemente el daño y la incidencia de marchitez causada por *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum*. Duijff *et al.* (1998), mostraron un efecto supresivo a la marchitez de *Fusarium* causada por *F. oxysporum* f.sp. en plantas de tomate que fueron inoculadas a nivel radical con aislamientos de *F. oxysporum* no patogénico, comportamiento atribuido a la activación de mecanismos de defensa de la planta, vía inducción de resistencia.

En los últimos años, investigaciones realizadas con *Trichoderma*, han mostrado entre sus distintos modos de acción que, la inducción de resistencia juega un papel fundamental en el control de plagas y enfermedades en varios cultivos de importancia económica (Harman 2006; Benítez *et al.* 2004; Howell 2003). Dentro de este género, sobresale la especie *harzianum*, la cual ha mostrado un efecto en el control de enfermedades mediante inducción

de resistencia. En el caso del cultivo de banano (en trabajos de investigación realizados en el CATIE), cuando este endofítico fue inoculado en la raíz de la planta, en presencia de un sustrato de broza de café, mostró una inducción de resistencia para el control de *M. fijiensis* tanto a nivel de invernadero como en campo con reducciones importantes en el control de la Sigatoka negra comparado con el testigo (Gutiérrez 1996; Camacho 1997). En frijol, este mismo endofítico, indujo resistencia para el control de *Botrytis cinerea*, reduciendo en un 42% el área foliar afectada y disminuyendo el número de lesiones causado por este patógeno (Bijirimana *et al.* 1997). En tomate, mostró 3 meses después de su inoculación en la raíz de la planta, inducción de resistencia contra *Alternaria solani*, reduciendo en un 80% los síntomas de la enfermedad (Seaman 2003), mientras que en maíz, la respuesta de protección se evidenció 14 días después de su inoculación en la raíz de la planta, reduciendo en un 44% el daño de la enfermedad causada por *Colletotricum graminicola* (Harman *et al.* 2004).

4.3.2 Periodos de desarrollo de la enfermedad

Con la información obtenida mediante la escala de Fouré (1985), se determinaron los periodos de la enfermedad (Cuadro 7). De acuerdo con el análisis de varianza no se encontró diferencia significativa para el Periodo de Latencia (PL) ($p=0.9668$), Tiempo de Evolución de Síntomas (TES) ($p=0.5934$) y Tiempo de Desarrollo de la Enfermedad (TDE) ($p=0.5934$). Los resultados obtenidos muestran un Periodo de Incubación (PI) de 10 días para el conjunto de tratamientos evaluados, tiempo para el cual se observa la aparición de las primeras pizcas-lesiones (E1) que dan inicio a la enfermedad. El PL, tiempo en el que se observa la aparición de las estrías (E3) hasta las primeras manchas en estadio E6 fue de 13 días para la mayoría de los tratamientos, a excepción de los T4 y T5 que tardaron 2 días más en alcanzar el E6. Para el TES, se tuvo en cuenta el número de días transcurrido desde la aparición del estadio E1 hasta el estadio E6, siendo de 30 días para el tratamiento T4 y de 25 días para el testigo T8, lo que sugiere un efecto del endofítico *F. oxysporum* en el retraso de la evolución de los síntomas en 5 días a favor del endofítico con relación al tratamiento testigo.

Cuadro 7: Periodos y Tiempos de desarrollo de la enfermedad, basados en la escala de Fouré (1985), en la hoja No.2 de vitroplantas de plátano inoculadas con *M. fijiensis* bajo condiciones de invernadero.

Tratamientos	Periodos y Tiempos (días)			
	PI	PL	TES	TDE
T1	10.0 a	13.0 a	26.0 ab	36.0 ab
T2	10.0 a	13.0 a	25.0 ab	35.0 ab
T3	10.0 a	13.0 a	24.0 a	34.0 a
T4	10.0 a	15.0 a	30.0 b	40.0 b
T5	10.0 a	15.0 a	26.0 ab	36.0 ab
T6	10.0 a	13.0 a	25.0 ab	35.0 ab
T7	10.0 a	13.0 a	26.0 ab	36.0 ab
T8	10.0 a	13.0 a	25.0 ab	35.0 ab

Nota: medias seguidas de la misma letra no tienen diferencia significativa ($p \leq 0.05$) de acuerdo con el Test LSD.

El TDE, registra el número de días entre el momento de la inoculación y la aparición de las primeras manchas en estadio E6, siendo de 40 días para el tratamiento T4 (aislamiento de *F. oxysporum*) y de 35 días para el testigo T8. Comportamiento similar observado en el TES, donde la acción del endofítico retrasó el desarrollo de la enfermedad 5 días con relación al testigo T8. Asimismo, el T3 registró el menor TDE (34 días) comparado con los demás tratamientos (Figura 11).

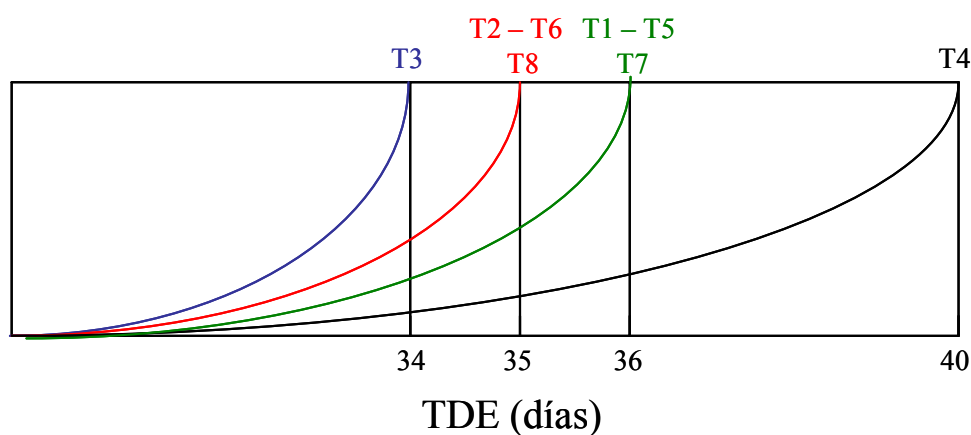


Figura 11: Tiempo de Desarrollo de la Enfermedad (TDE), basado en la escala de Fouré (1985), en vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón) inoculadas con *M. fijiensis* bajo condiciones controladas de invernadero.

Como se mencionó anteriormente, los resultados obtenidos durante el estudio no evidencian claramente inducción de resistencia para el control de *M. fijiensis* por parte de los hongos endofíticos utilizados en la investigación. Diferentes autores, mencionan entre los modos de acción de *Trichoderma*: competencia por nutrientes y espacio en la rizosfera, antibiosis, micoparasitismo e inducción de resistencia (Harman 2006; Benítez *et al.* 2004; Howell 2003). De acuerdo a los modos de acción antes mencionados, estos mismos autores, coinciden en adjudicar a ciertos aislados especialización para un modo de acción en particular; de tal manera que, si un determinado aislado, es exitoso como promotor de crecimiento, este mismo, no necesariamente funciona eficientemente como controlador biológico o inductor de resistencia. Lo anterior, posiblemente se debe a la inversión en el costo energético para optimizar una respuesta en particular.

En el caso de cepas de *Trichoderma atroviride* y *Fusarium oxysporum*, la literatura aún no reporta con claridad un modo de acción basado en la inducción de resistencia. Por tal razón, es posible que, en nuestro caso, está sea la razón por la cual no se evidenció control de la enfermedad vía inducción de resistencia por parte de los aislamientos evaluados en este estudio.

4.3.3 Unidades SPAD de clorofila

A partir del día 10 después de la inoculación de las vitroplantas con *M. fijiensis* y hasta el día 40, se tomaron lecturas diarias de unidades SPAD de clorofila en la hoja No. 2 de cada planta. En la figura 12, se observa los promedios diarios de clorofila tomados en 8 plantas por tratamiento observándose un comportamiento constante y homogéneo al inicio del estudio, independientemente del tratamiento evaluado. Este comportamiento en los valores de clorofila se mantiene estable hasta el día 25 después de la inoculación, tiempo en el cual comienza rápidamente la coalescencia del tejido, llegando a tener valores de unidades SPAD menores de 14.0 para el día 40, lo que se explica por la presencia de necrosis en desarrollo, ocasionando alteraciones importantes en la fisiología de los cloroplastos llevándolos paulatinamente a la destrucción.

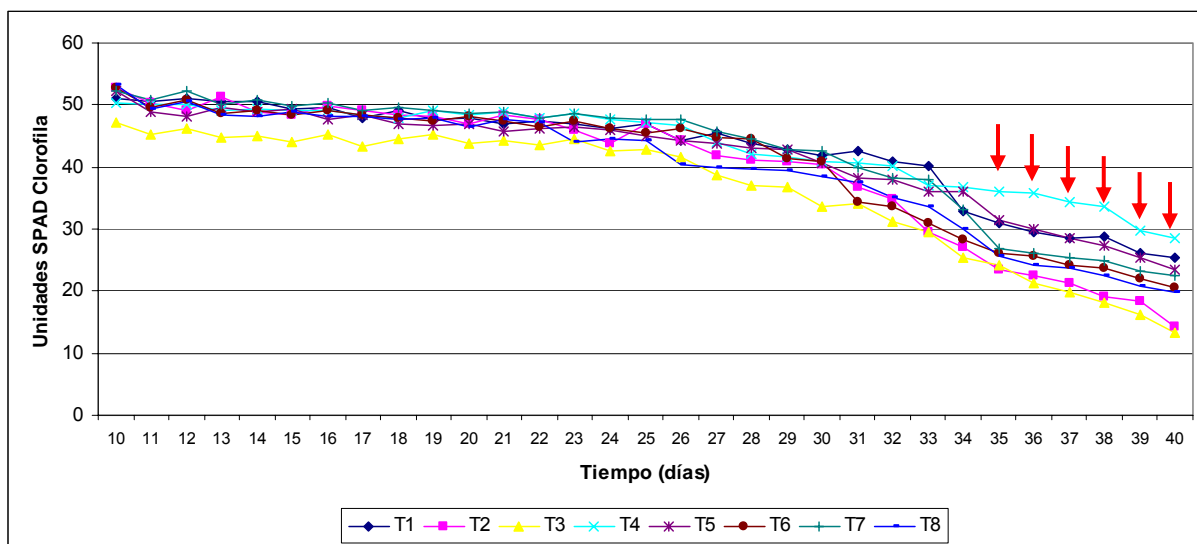


Figura 12: Unidades SPAD de clorofila tomada en la hoja No.2 de vitroplantas de plátano inoculadas con *M. fijiensis* bajo condiciones controladas de invernadero. ▼▼▼: Valores en T4.

Estos resultados son consistentes con los anteriores de lectura de síntomas, donde el T4 reveló un retraso en el desarrollo de la enfermedad en el tiempo, coincidiendo con la cuantificación de unidades SPAD, donde justamente este tratamiento presenta los valores de clorofila más altos respecto al testigo T8 y demás tratamientos evaluados. Corroborando el efecto positivo de este endofítico en la fisiología de la planta igualmente observado en el TES y TDE (30 y 40 días, respectivamente) donde retrasó 5 días el desarrollo de síntomas de la enfermedad comparado con el testigo T8.

El tratamiento T3 correspondiente a uno de los aislamientos de *F. oxysporum*, mostró a lo largo de toda la investigación los valores mas bajos de clorofila coincidiendo con los TES y TDE más cortos (24 y 34 días, respectivamente), lo que sugiere la reducida efectividad de esta cepa para el control de la enfermedad.

Cuando se relaciona los valores de clorofila con el avance de la enfermedad se observa que a partir del día 25, todos los tratamientos evaluados presentaron un estadio E4 de acuerdo a la escala de Fouré (1985) y un Grado cuatro (G4: $\leq 20\%$) de acuerdo a la escala de Romero (2005), momento en el cual los tejidos de las hojas se encuentran afectados con signos de necrosis originados por *M. fijiensis*. Similares resultados fueron encontrados por Romero (2005), quien reporta un comportamiento similar en vitroplantas de plátano del cv. Curraré inoculadas con *M. fijiensis* bajo condiciones de invernadero. Busogoro (1999) y Lepoivre *et al.* (2003), observaron en plantas de banano inoculadas con *M. fijiensis* que las toxinas

producidas por el hongo, provocan agregación de los cloroplastos, generando disminución en los niveles de clorofila en las plantas tratadas.

Atendiendo el tipo de daño que produce *M. fijiensis* en las hojas, y que caracteriza a la Sigatoka negra, éste compromete el aparato fotosintético limitando el proceso fotoquímico de las hojas, disminuyendo la actividad fotosintética en la planta, lo que repercute en la calidad y el peso del racimo (Cayon 2004). Lo anterior nos permite considerar de gran importancia el conocer los valores de concentración de clorofila, dado que esta juega un papel predominante en la relación cloroplasto sano – vs. – cloroplasto deforme, modificado y finalmente colapsado, por un proceso de oxidación o Redox celular que ocasiona, finalmente, la muerte de tejido.

4.4 Conclusiones

Plantas inoculadas con el aislamiento de *Fusarium oxysporum* T4, registran valores más altos de TES y TDE, retardando 5 días el desarrollo y avance de la enfermedad comparado con el testigo; así como, los niveles más altos y estables de clorofila a lo largo de todo el estudio.

Entre los días 25 y 30 se presentan los estadios y grados de la enfermedad más críticos para todos los tratamientos evaluados, llegando a su máxima expresión entre los días 35 y 40 después de la inoculación del patógeno.

La escala de Romero (2005) fue más consistente para la evaluación de síntomas de la enfermedad a nivel de invernadero comparada con la de Fouré (1985). Destacándose la importancia de establecer esta escala para evaluar a nivel de invernadero la resistencia y el desarrollo de síntomas de la Sigatoka negra.

Los resultados no detectaron un efecto de inducción de resistencia para los tratamientos evaluados, a excepción de una tendencia en retraso de la enfermedad para el T4 (*F. oxysporum*).

4.5 Bibliografía

- Belálcazar, S. 1998. El cultivo del plátano en el trópico. Manual de asistencia técnica No. 50. Quindío, Colombia. 290 p.
- Benítez, T; Rincón, AM; Limón, MC; Codón, AC. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*, Vol. 7, 249-260.
- Bigirimana, J. 1997. Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. *Med. Fac.Landbouww. Univ. Gent*, Vol. 62, 1001–1007
- Busogoro, JP. 1999. Selección de bananos con respecto a su resistencia a la Sigatoka negra. *Infomusa*, Vol. 8, No.2, 68 p.
- Camacho, JC. 1997. Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento e inductores de resistencia a Sigatoka negra (*M. fijiensis*) en banano (*Musa* sp.) y algunas observaciones sobre la gutación. Tesis MSc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 122 p
- Cayon, G. 2004. Ecofisiología del plátano (*Musa* AAB Simmonds). En: ACORBAT 2004. Publicación especial. Memorias del XVI Reunión Internacional Acorbat. México. 172-183 p
- Dubois, T; Gold, CS; Paparu, P; Athman, S; Kapindu, S. 2006. Tissue culture and the *in vitro* environment. Enhancing plants with endophytes: potential for ornamentals? In: Floriculture, Ornamental and Plant Biotechnology: Advances and Tropical Issues. 1ra. Ed. Global Science Books, London. Teixeira Da Silva, J. (ed.)
- Duijff, BJ; Pouhair, D; Olivain, C; Alabouvette, C; Lemanceau, P. 1998. Implication of systemic induced resistance in the suppression of fusarium wilt of tomato by *Pseudomonas fluorescens* WCS417r and non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47. *European Journal of Plant Pathology*, Vol. 104, 903-910
- FAO. 2006. Base de datos estadísticos (en línea). Consultado 14 sep. 2006. Disponible en <http://apps.fao.org/>
- Gutiérrez, FA. 1996. Estudio de factores en la inducción de resistencia a *Mycosphaerella fijiensis* y promoción de crecimiento en plantas de banano. Tesis MSc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 91 p
- Gúzman, M. 2006. Estado actual y perspectivas futuras del manejo de la Sigatoka negra en América Latina. En: Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil. Bananicultura: un negocio sostenible. Soprano, E; Tcacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds.) Editorial, Epagri, Estación experimental de Itajaí, SC, Brasil. p. 83-91
- Harman, GE. 2006. Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma harzianum* spp. *Phytopatology*, Vol. 96, 190-194.
- Harman, GE; Howell, RH; Viterbo, A; Chet, I; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 2, 43-56.
- Howell, CR. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease*, Vol. 87, No.1, 4-10.

- Larco, ES. 2004. Desarrollo y evaluación de lixiviados de compost y lombricompost para el manejo de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en plátano. Tesis MSc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 77 p
- Lepoivre, P; Acuña, CP; Riveros, AS. 2003. Screening procedures for improving resistance to banana black leaf streak disease. En: Breeding banana and plantain for resistance to diseases and pest. International network for the improvement of banana and plantain, Montpellier, France. 213-220 p.
- Mandeel, Q; Baker R. 1991. Mechanisms involved in biological control of *Fusarium* wilt of cucumber with strains of non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology*, Vol. 81, 462-469
- Marin, D; Romero, R; Guzmán, M; Sutton, T. 2003. Black Sigatoka and increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease*, Vol. 87. No.3.
- Orozco-Santos, M; Orozco-Romero, J. 2006. Manejo sustentable de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano: conocimiento del patosistema, prácticas culturales y control químico. En: Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil. Bananicultura: un negocio sostenible. Soprano, E; Tcacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds.) Editorial, Epagri, Estación experimental de Itajaí, SC, Brasil. p. 100-116
- Patiño, LF; Salazar, LM; Collazos, JC; Piedrahita, RA; Bustamante, E. 2006. Bacterias liticas y sustratos en la filósfera de banano y plátano para el control de Sigatoka negra. En: Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil. Bananicultura: un negocio sostenible. Soprano, E; Tcacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds.) Editorial, Epagri, Estación experimental de Itajaí, SC, Brasil. p. 133-140
- Riveros, A; Giraldo, A; Gamboa, A. 2002. Microbiological control of black leaf streak diseases in *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. INIBAP. San José, Costa Rica. 287-297 p.
- Romero, RA. 2006. Caracterización y manejo de la resistencia a fungicidas de *Mycosphaerella fijiensis* en bananos. En: Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil. Bananicultura: un negocio sostenible. Soprano, E; Tcacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds.) Editorial, Epagri, Estación experimental de Itajaí, SC, Brasil. p.92-99
- Romero, JE. 2005. Evaluación de dos metodologías de diagnóstico de resistencia temprana a la Sigatoka negra en cultivares de plátano. Trabajo de grado. Biblioteca Rafael Parga Cortés, Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia. 84 p
- Seaman, A. 2003. Efficacy of OMRI-approved products for tomato foliar disease control. New York State Integrated Pest Management Program publication 129, 164–167 (New York State Integrated Pest Management Program, New York).

5 Recomendaciones generales

Evaluar concentraciones de inóculo más altas de las cepas de *Fusarium oxysporum* y dar un tiempo más prolongado en la inmersión del sistema radical, con el fin de aumentar su poder de colonización y permanencia en los tejidos de la planta.

Realizar varias inoculaciones de hongos endofíticos en el tiempo, para asegurar mayor poder de colonización a nivel radical, y un avance significativo a la parte aérea de la planta, proporcionando mayor concentración de sustancias que actúen como inductores de señales de defensa a distancia.

Estimar bajo condiciones controladas de invernadero, los valores del PI, PL, TES y TDE empleando como base la escala de grados de Romero (2005), definiendo en forma clara, los tiempos y periodos de desarrollo con base a esta escala.

Retomar investigaciones realizadas con aislamientos de *Trichoderma harzianum* en presencia de sustratos de broza de café, sumado a una fuente de energía, con el fin de desarrollar una alternativa al control de la Sigatoka negra mediante mecanismos de inducción de resistencia.

Poner a interactuar simultáneamente hongos endofíticos con rizobacterias promotoras de crecimiento u hongos endofíticos con hongos micorrizicos, como alternativa en el aporte de respuesta en promoción de crecimiento y control a distancia de la Sigatoka negra.

Realizar estudios con cepas de hongos endofíticos aisladas del filoplano de plantas sanas de cultivos de plátano, establecidas en áreas con alta incidencia “sitios calientes” de la enfermedad.

6 Anexos

Anexo 1: Análisis de varianza para la variable Porcentaje de Colonización en “Raíz” de vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón).

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Model	6	42.87	7.15	4.26	0.0059
Error	21	35.26	1.68		
Total	27	78.13			
CV = 20.37					

Anexo 2: Análisis de varianza para la variable Porcentaje de Colonización en “Cormo” de vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón).

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Model	6	25.10	4.18	3.20	0.0217
Error	21	27.47	1.31		
Total	27	52.57			
CV = 20.52					

Anexo 3: Análisis de varianza para la variable Porcentaje de Colonización en “Pseudotallo” de vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón).

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Model	6	9.63	1.60	0.80	0.5799
Error	21	42.05	2.00		
Total	27	51.67			
CV = 53.10					

Anexo 4: Análisis de varianza para la variable Porcentaje de Colonización en “Hoja” de vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón).

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Model	6	22.69	3.78	4.41	0.0049
Error	21	18.01	0.86		
Total	27	40.70			
CV = 100.99					

Anexo 5: Análisis de varianza para la variable de Promoción de Crecimiento “Área Foliar” en vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón).

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Model	7	615087.6832	87869.6690	31.79	<.0001
Error	32	88436.3632	2763.6363		
Total	39	703524.0436			
CV = 18.89					

Anexo 6: Análisis de varianza para la variable de Promoción de Crecimiento “Altura” en vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón).

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Model	7	100.1400000	14.3057143	2.78	0.0223
Error	32	164.5410000	5.1419062		
Total	39	264.6810000			
CV = 11.09					

Anexo 7: Análisis de varianza para la variable de Promoción de Crecimiento “Diámetro Pseudotallo” en vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón).

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Model	7	0.30419938	0.04345705	3.30	0.0093
Error	32	0.42132000	0.01316625		
Total	39	0.72551937			
CV = 7.77					

Anexo 8: Análisis de varianza para la variable de Promoción de Crecimiento “Peso Total Planta” en vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón).

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Model	7	2266.557938	323.793991	6.31	0.0001
Error	32	1642.278000	51.321187		
Total	39	3908.835937			
CV = 16.42					

Anexo 9: Análisis de varianza para la variable de Promoción de Crecimiento “Peso Aéreo Planta” en vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón).

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Model	7	1008.180938	144.025848	5.47	0.0003
Error	32	843.284000	26.352625		
Total	39	1851.464938			
CV = 17.23					

Anexo 10: Análisis de varianza para la variable de Promoción de Crecimiento “Peso Radical” en vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón).

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Model	7	262.5040000	37.5005714	4.54	0.0013
Error	32	264.0350000	8.2510938		
Total	39	526.5390000			
CV =					

Anexo 11: Análisis foliar completo (FQO) en vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón) 60 días después de la inoculación con los hongos endofíticos.

Tratamientos	Ca	Mg	K	P	Cu	Zn	Mn	Fe
	----%----				----mg/kg----			
T1	0,37	0,29	2,72	0,07	10,15	18,27	3244,53	127,11
T2	0,34	0,31	2,80	0,10	10,51	19,74	3165,75	149,03
T3	0,34	0,29	2,75	0,07	10,44	19,25	3941,21	139,99
T4	0,34	0,34	2,40	0,11	10,88	19,21	2800,22	163,13
T5	0,35	0,37	2,46	0,10	11,39	19,31	2766,87	186,63
T6	0,37	0,33	2,61	0,11	11,18	19,90	3051,01	161,03
T7	0,35	0,34	2,35	0,13	11,63	19,36	2920,21	167,55
T8	0,45	0,36	2,15	0,08	10,01	22,66	3451,59	134,66

Anexo 12: Programas de nebulización en las cámaras de incubación para optimizar la germinación de conidias y penetración de *M. fijiensis* y desarrollo de síntomas de la enfermedad.

PROGRAMA # 1: (0-3 DDI)

	Inicia	Detiene
1	7:00 a.m.	7:30 a.m.
2	8:30 a.m.	9:00 a.m.
3	10:00 a.m.	10:30 a.m.
4	11:30 a.m.	12:00 m.d.
5	1:00 p.m.	1:30 p.m.
6	2:30 p.m.	3:00 p.m.
7	4:00 p.m.	4:30 p.m.
8	5:30 p.m.	6:00 p.m.
9	7:00 p.m.	7:30 p.m.
10	8:30 p.m.	9:00 p.m.
11	10:00 p.m.	10:30 p.m.
12	11:30 p.m.	12:00 p.m.
13	1:00 a.m.	1:30 a.m.
14	2:30 a.m.	3:00 a.m.

PROGRAMA # 2: (4-10 DDI)

	Inicia	Detiene
1	7:00 a.m.	7:15 a.m.
2	10:00 a.m.	10:15 a.m.
3	1:00 p.m.	1:15 p.m.
4	4:00 p.m.	4:15 p.m.
5	7:00 p.m.	7:15 p.m.

Anexo 13: Lectura de Unidades SPAD de clorofila tomadas con un Clorofilometro en cuatro puntos diferentes en la hoja No.2 de las vitroplantas de plátano (cv. Dominco-Hartón).



Anexo 14: Análisis de varianza para la variable de Resistencia a la Sigatoka negra “Periodo de Latencia (PL)” en vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón).

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Model	7	46.50	6.64	0.26	0.9668
Error	56	1432.50	25.58		
Total	63	1479.00			
CV = 37.81					

Anexo 15: Análisis de varianza para la variable de Resistencia a la Sigatoka negra “Tiempo de Evolución de Síntomas (TES)” en vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón).

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Model	7	122.36	17.48	0.80	0.5934
Error	56	1228.88	21.94		
Total	63	1351.23			
CV = 18.29					

Anexo 16: Análisis de varianza para la variable de Resistencia a la Sigatoka negra “Tiempo de Desarrollo de la Enfermedad (TDE)” en vitroplantas de plátano (cv. Dominico-Hartón).

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Model	7	122.36	17.48	0.80	0.5934
Error	56	1228.88	21.94		
Total	63	1351.23			
CV = 13.16					

Anexo 17: Avance de la enfermedad, Sigatoka negra, en la hoja No.2 inoculadas con *M. fijiensis* cepa CRPE01 en las vitroplantas de plátano (cv. Dominco-Hartón), tratamiento T4 –vs- T8.

T4: *Fusarium oxysporum* (Fo2)



Día 10

Día 15

Día 20

Día 25

Día 30

Día 35

Día 40

T8: Testigo

Barrios 2006



Día 10

Día 15

Día 20

Día 25

Día 30

Día 35

Día 40