



CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL
DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA

ESCUELA DE POSGRADO

**Uso de bacterias endofíticas para el control biológico del Mal de
Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) en el cultivar
Gros Michel (AAA)**

por

Diana Fernanda Lara Fiallos

Tesis sometida a consideración de la Escuela de Posgrado
como requisito para optar por el grado de

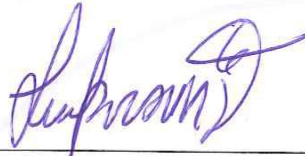
Magister Scientiae en Agricultura Ecológica

Turrialba, Costa Rica, 2009

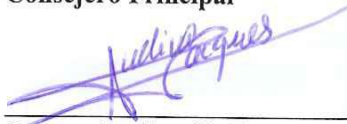
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por la División de Educación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del Estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE EN AGRICULTURA ECOLÓGICA

FIRMANTES:



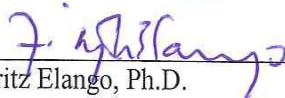
Luis E. Pocasangre, Ph.D.
Consejero Principal



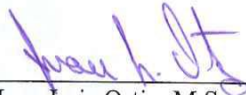
Jacques Avelino, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



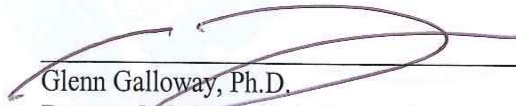
Fernando Casanoves, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



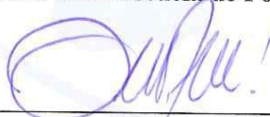
Fritz Elango, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



Juan Luis Ortiz, M.Sc.
Miembro Comité Consejero



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



Diana Fernanda Lara Fiallos
Candidata

DEDICATORIA

A Dios por darme sabiduría y fortaleza para salir adelante.

A mis padres y hermanos por ser el apoyo incondicional en cada experiencia de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Luis Pocasangre por ser mi apoyo y orientación así como por compartir sus valiosos conocimientos.

Al Dr. Fernando Casanoves, Dr. Jacques Avelino, M. Sc. Juan Luis Ortiz y Dr. Fritz Elango por sus valiosas contribuciones como miembros del Comité Consejero.

Al M. Sc. Wilkin Gratereaux por los momentos de alegría y su apoyo incondicional.

A Cindy Castillo y Manrique González, personal del Laboratorio de Fitopatología y Nematología del CATIE, por su ayuda, gracias.

Al personal de la Biblioteca Orton, por su infinita colaboración.

A Ligia Quezada por brindarme su amistad y ayudarme en todo lo que necesitaba.

A mis compañeros (as) y amigos (as) de los que tendré un hermoso recuerdo.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
CONTENIDO.....	V
RESUMEN.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
ÍNDICE DE CUADROS.....	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XI
LISTA DE UNIDADES, ABREVIATURAS Y SIGLAS.....	XIII
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 de banano (<i>Musa</i> spp.).....	4
2.2 Distribución del Mal de Panamá e importancia económica.....	4
2.3 Razas fisiológicas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i>	6
2.4 Biología de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i>	6
2.5 Ciclo y síntomas de la enfermedad.....	6
2.6 Manejo actual de la enfermedad.....	9
2.6.1 Resistencia genética.....	9
2.6.2 Prácticas culturales.....	10
2.6.3 Control biológico.....	10
2.6.3.1 Hongos endofíticos.....	10
2.6.3.2 Bacterias endofíticas.....	11
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
3.1 Ubicación geográfica de la investigación.....	13
3.2 Material experimental.....	13

3.2.1	Aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	13
3.2.2	Bacterias endofíticas	14
3.2.3	Material vegetal	15
3.3	Aislamiento de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> de plantas de banano enfermas	15
3.4	Conservación de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> en criobanco	16
3.5	Identificación morfológica de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	16
3.6	Cultivo y multiplicación de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	16
3.7	Cultivo y multiplicación de bacterias endofíticas.....	17
3.8	Preparación de la suspensión de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> ...	17
3.9	Preparación de la suspensión de células de bacterias endofíticas.....	18
3.10	Bioensayo 1. Prueba de patogenicidad	18
3.10.1	Inoculación de vitroplantas con aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	18
3.10.2	Evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad	19
3.11	Bioensayo 2. Prueba de antibiosis sobre tres aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	20
3.11.1	Cocultivo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> y bacterias endofíticas	20
3.11.2	Evaluación del crecimiento radial de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	21
3.12	Bioensayo 3. Prueba de biocontrol sobre tres aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	21
3.12.1	Protección de vitroplantas con bacterias endofíticas	22
3.12.2	Inoculación de vitroplantas con tres aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	22
3.12.3	Evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad	23
3.13	Métodos estadísticos	23
3.13.1	Bioensayo 1. Prueba de patogenicidad	24
3.13.2	Bioensayo 2. Prueba de antibiosis sobre tres aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	26
3.13.3	Bioensayo 3. Prueba de biocontrol sobre tres aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	27
4	RESULTADOS	29

4.1	Caracterización morfológica de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	29
4.2	Bioensayo 1. Prueba de patogenicidad	30
4.2.1	Incidencia y severidad de la enfermedad	30
4.2.2	Variables de crecimiento	33
4.2.3	Evaluación de los síntomas internos	33
4.2.4	Análisis de ranking	34
4.3	Bioensayo 2. Prueba de antibiosis sobre tres aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	35
4.4	Bioensayo 3. Prueba de biocontrol sobre tres aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	38
4.4.1	Incidencia y severidad de la enfermedad.....	38
4.4.2	Variables de crecimiento	41
4.4.3	Evaluación de los síntomas internos	41
5	DISCUSIÓN	43
5.1	Bioensayo 1. Prueba de patogenicidad	43
5.2	Bioensayo 2. Prueba de antibiosis sobre tres aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	44
5.3	Bioensayo 3. Prueba de biocontrol sobre tres aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	45
6	CONCLUSIONES	48
6.1	Prueba de patogenicidad	48
6.2	Prueba de antibiosis	48
6.3	Prueba de biocontrol	49
7	RECOMENDACIONES.....	50
8	BIBLIOGRAFÍA	51
	ANEXOS	59

LARA FIALLOS, D.F. 2009. USO DE BACTERIAS ENDOFÍTICAS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DEL MAL DE PANAMÁ (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) EN EL CULTIVAR GROS MICHEL (AAA)

Palabras claves: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Mal de Panamá, banano, Gros Michel (AAA), bacterias endofíticas, control biológico.

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue seleccionar bacterias endofíticas para el biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*FOC*). Nueve aislamientos de *FOC* recolectados en sectores ubicados en Turrialba y Talamanca, Costa Rica fueron utilizados en esta investigación. La patogenicidad de los aislamientos de *FOC* fue evaluada en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel en condiciones de invernadero. Adicionalmente la actividad antagonista de bacterias endofíticas sobre *FOC* fue determinada, mediante una prueba de antibiosis y de biocontrol respectivamente. Los resultados obtenidos en el bioensayo de patogenicidad demostraron que ocho aislamientos de *FOC* fueron capaces de infectar las vitroplantas y producir síntomas característicos del Mal de Panamá. El periodo de incubación fue muy similar para los aislamientos de *FOC*, los primeros síntomas de la enfermedad se presentaron después de cuatro semanas de la inoculación con el patógeno y el periodo de desarrollo donde la enfermedad alcanzó el 100% fue a las seis semanas. Los aislamientos *FOC* 4, *FOC* 2 y *FOC* 8 resultaron los más patogénicos. A nivel *in vitro*, diecisiete bacterias endofíticas inhibieron el crecimiento de *FOC* hasta en un 65% en comparación con el testigo. En el bioensayo de biocontrol, el periodo de incubación fue similar en las plantas protegidas con bacterias endofíticas y los testigos referenciales; los primeros síntomas se presentaron después de cuatro semanas de la inoculación con el patógeno. Sin embargo, los resultados demostraron que las bacterias endofíticas, particularmente F7B13, retrasaron el periodo de desarrollo en tres y cuatro semanas y además redujeron la severidad de los síntomas externos. Adicionalmente se detectó que plantas protegidas con las bacterias endofíticas presentaron valores mayores en las variables número de hojas, diámetro del pseudotallo, largo de hoja, peso foliar, peso radical y peso total de planta. Más investigaciones son necesarias para entender la actividad de biocontrol y de promoción de crecimiento de las bacterias endofíticas.

LARA FIALLOS, D.F. 2009. USE OF ENDOPHYTIC BACTERIA FOR THE BIOLOGICAL CONTROL OF THE PANAMÁ DISEASE (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) IN THE CULTIVAR GROS MICHEL (AAA)

Key words: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, Panama disease, banana, Gros Michel (AAA), endophytic bacteria, biological control.

ABSTRACT

The objective of this study was to select endophytic bacteria for biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC). Nine isolates of FOC collected in Turrialba and Talamanca, Costa Rica were used in this study. The effect of isolates of FOC was evaluated in a pathogenicity test under greenhouse conditions. The antagonistic activity of endophytic bacteria towards FOC under *in vitro* and *in vivo* conditions also was studied. Tissue culture plantlets of the cultivar Gros Michel were inoculated with endophytic bacteria before of FOC inoculation. The results of the pathogenicity test reported that eight isolates of FOC were pathogenic. The incubation period was similar between the isolates of FOC, symptoms of Fusarium wilt were observed after four weeks of pathogen inoculation and the disease development period was to six weeks. Under *in vitro* conditions, seventeen endophytic bacteria inhibited the radial growth of FOC in 65% in comparison with the control. The results of biocontrol assay indicated that, the incubation period was similar in plantlets protected with bacteria endophytic and the controls; symptoms of Fusarium wilt were observed after four weeks of pathogen inoculation. However, the results demonstrated that endophytic bacteria, particularly F7B13, delayed the disease development period in three and four weeks and the severity of external internal symptoms was reduced. In addition, plantlets protected with endophytic bacteria had a greater leaf number, pseudostem diameter, leaf length and weight of roots, leaves and plant in comparison with the control. More studies are needed in order to understand biocontrol activity as well as the plant growth promotion of the endophytic bacteria in this pathosystem.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> evaluados en la presente investigación	13
Cuadro 2. Descripción de las bacterias endofíticas evaluadas en esta investigación	14
Cuadro 3. Escala de evaluación de síntomas provocados por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	20
Cuadro 4. Variables evaluadas en los bioensayos de la investigación	24
Cuadro 5. Efecto de diferentes aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> sobre la incidencia y severidad de la enfermedad en seis semanas de evaluación.....	31
Cuadro 6. Efecto de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> sobre el incremento en el crecimiento de las vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel	33
Cuadro 7. Efecto de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> sobre la decoloración del cormo y el peso de las vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel	34
Cuadro 8. Ranking para las variables evaluadas en la prueba de patogenicidad.....	35
Cuadro 9. Efecto de 30 bacterias endofíticas sobre el crecimiento radial, peso fresco y peso seco de tres aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> a los 15 días de evaluación	36
Cuadro 10. Efecto de bacterias endofíticas sobre la incidencia del Mal de Panamá (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>) en ocho semanas de evaluación.....	39
Cuadro 11. Efecto de bacterias endofíticas sobre la severidad del Mal de Panamá (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>) en ocho semanas de evaluación.....	40
Cuadro 12 Efecto de bacterias endofíticas sobre el incremento de las variables de crecimiento de vitroplantas de banano en la prueba de biocontrol.....	41
Cuadro 13. Efecto de las bacterias endofíticas sobre el peso y decoloración del cormo de vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel en la prueba de biocontrol	42

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de la enfermedad Mal de Panamá.	8
Figura 2. Síntomas de Mal de Panamá en el cultivar Gros Michel; a) marchitez en hojas adultas; b) decoloración del pseudotallo.	8
Figura 3. Protocolo para la preparación de suspensión de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	17
Figura 4. Protocolo para la inoculación de vitroplantas de banano con aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	19
Figura 5. Protocolo para el cocultivo de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> y bacterias endofíticas.	21
Figura 6. Protocolo para la protección de vitroplantas de banano con bacterias endofíticas. ...	22
Figura 7. Aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> en Potato Dextrosa Agar al 100% dos semanas después de cultivados.	29
Figura 8. Estructuras reproductivas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> observadas al microscopio a) microconidio, b) macroconidio, c) clamidiospora.	30
Figura 9. Incidencia del Mal de Panamá (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>) en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel en seis semanas de evaluación.	31
Figura 10. Evolución de la severidad de los síntomas externos (amarillamiento) producidos por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel en seis semanas de evaluación.	32
Figura 11. Evolución de la severidad de los síntomas externos (marchitez) producidos por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel en seis semanas de evaluación.	32
Figura 12. Efecto de bacterias endofíticas sobre el crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> en cinco evaluaciones.	37
Figura 13. Bacterias endofíticas que mostraron un mayor efecto de antibiosis sobre tres aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> comparadas con el testigo y con una bacteria que no tuvo efecto de antibiosis.	37

Figura 14. Incidencia del Mal de Panamá con tres aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel en ocho semanas de evaluación.38

LISTA DE UNIDADES, ABREVIATURAS Y SIGLAS

ufc: unidades formadoras de colonias

PDA: *Potato Dextrosa Agar*

1 INTRODUCCIÓN

El banano (*Musa* spp.) es el cuarto cultivo alimenticio más importante en el mundo después del maíz, el arroz y el trigo; con aproximadamente el 15% del volumen total de producción de frutas en el mundo. Su aporte en el desarrollo económico y social de muchos países tropicales e intertropicales es indiscutible; no sólo porque constituye una fuente de divisas y empleos directos e indirectos, sino también porque sirve como complemento de la dieta de gran parte de la población de estos países (FAO 2004).

En este cultivo, las enfermedades y plagas constituyen grandes limitaciones para la producción. La marchitez por *Fusarium* o Mal de Panamá ocasionada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) es una de las enfermedades más destructivas en las musáceas y causante de grandes pérdidas económicas en la mayoría de los países donde se cultivan musáceas (Moore *et al.* 1999, Hwang y Ko 2004, Pérez 2004, Ploetz 2005, Molina 2009).

Entre 1890 y 1960, la producción comercial del cultivar Gros Michel (AAA); principal banano de exportación de aquel entonces, fue afectada por la enfermedad Mal de Panamá provocando la desaparición de más de 80 000 ha en Centro y Sur América (Stover 1962, Ploetz 1994b, Pocasangre y Pérez 2009), lo cual trajo como consecuencia el abandono de las plantaciones y el establecimiento de nuevas áreas de producción en suelos vírgenes. Sin embargo, esto resultó en pocos periodos de producción debido a que estas plantaciones fueron atacadas por *Fusarium*. Finalmente, la variedad Gros Michel (AAA) tuvo que ser reemplazada por variedades del subgrupo Cavendish, junto con importantes transformaciones de la industria de la exportación (Stover 1986, Ploetz 1994b, Ploetz 2005).

En la actualidad el Mal de Panamá continúa siendo un problema, especialmente para pequeños productores que cultivan variedades susceptibles en asocio con café y cacao bajo sistemas agroforestales, así como en pequeñas fincas que producen banano para mercados locales, donde son muy apetecidos por su sabor y aroma (Silagyi 2002, Pocasangre 2009). Adicionalmente, la raza 4 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, que es capaz de atacar a los cultivares Cavendish, representa una grave amenaza para América Latina, principal continente exportador de banano, debido a que casi el 100% de las plantaciones comerciales corresponden a cultivares del subgrupo Cavendish. Por otra parte, constituye una amenaza

para la seguridad alimentaria de los países así como para las personas que dependen económicamente de este cultivo (Ploetz 1994a, Ploetz 2006, Molina 2009).

Desafortunadamente no existen medidas de control químico eficientes de la enfermedad (Ploetz 1994b); prácticas culturales como la inundación y rotación de cultivos tampoco han permitido reducir su incidencia y severidad (Moore *et al.* 1995). Varias investigaciones han centrado sus esfuerzos en la búsqueda de fuentes naturales de resistencia al patógeno en especies y cultivares silvestres; sin embargo, no se ha logrado producir una variedad con características comerciales adecuadas para sustituir las variedades del subgrupo Cavendish. Asimismo, mediante el uso de herramientas biotecnológicas y de ingeniería genética se ha logrado seleccionar plantas que presentan cierta resistencia al patógeno (Matsumoto *et al.* 1999, Cárdenas 2001, Sutherland 2006, Zambrano *et al.* 2007). Por otro lado, el control biológico ha demostrado ser una alternativa al manejo de la enfermedad; hongos endofíticos pertenecientes a cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum* han registrado buenos niveles de control de la enfermedad (Pocasangre 2000, Kidane y Laing 2008). Además se ha comprobado la presencia de bacterias asociadas al sistema radical del banano y su efecto como agentes de biocontrol sobre *FOC* constituyéndose en alternativas promisorias al control de esta enfermedad (Sivamani y Gnanamanickam 1988, Rutherford y Kangire 1998).

La presente investigación se realizó con la finalidad de seleccionar bacterias endofíticas para el biocontrol del Mal de Panamá y consistió de tres bioensayos; el primero correspondió a una prueba de patogenicidad donde se determinó el grado de patogenicidad de aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* sobre vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel en condiciones de invernadero. En el segundo bioensayo, a través de una prueba de antibiosis, se evaluó el efecto de bacterias endofíticas sobre aislamientos de *FOC* en condiciones *in vitro*. Finalmente, en el tercer bioensayo, se evaluó la actividad de bacterias endofíticas como agentes biológicos de control sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, así como su potencial efecto de promoción de crecimiento e inducción de resistencia en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) bajo condiciones de invernadero.

1.1 Objetivos del estudio

1.1.1 Objetivo general

Estudiar el efecto de bacterias endofíticas élite sobre el control biológico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) bajo condiciones de invernadero.

1.1.2 Objetivos específicos

Determinar el grado de patogenicidad de 9 aislamientos de FOC en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) bajo condiciones de invernadero.

Determinar el potencial de antibiosis de 30 bacterias endofíticas sobre 3 aislamientos de FOC en condiciones *in vitro*.

Seleccionar la actividad de biocontrol de 10 bacterias endofíticas sobre 3 aislamientos de FOC en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) en condiciones de invernadero.

1.2 Hipótesis del estudio

Los aislamientos de FOC inoculados en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) son capaces de infectar la planta y desarrollar la enfermedad.

Bacterias endofíticas élite tienen la capacidad de inhibir el crecimiento *in vitro* de los aislamientos de FOC en estudio.

Bacterias endofíticas seleccionadas tendrán un efecto de biocontrol sobre los aislamientos de FOC y promoverán el crecimiento de las vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) en condiciones de invernadero.

2 MARCO CONCEPTUAL

2.1 El cultivo de banano (*Musa spp.*)

El banano (*Musa spp.*) es el cuarto cultivo alimenticio más importante a nivel mundial después del maíz, el arroz y el trigo (FAO 2004). Se ha estimado que en el año 2007 se cosecharon alrededor de cinco millones de hectáreas, con una producción de 85 millones de toneladas (FAOSTAT 2009); siendo América Latina y el Caribe, la región donde se exporta el mayor volumen de fruta. Ecuador es el mayor exportador del mundo y Costa Rica, con la mayor productividad a nivel mundial, ocupa el tercer lugar (Martínez *et al.* 2007, Sandoval y Segura 2009). Asimismo, algunos países productores de banano, como Brasil y La India dedican la mayoría de su producción exclusivamente al autoconsumo.

Hasta el momento, el comercio internacional de banano se basa principalmente en la exportación de bananos pertenecientes al subgrupo Cavendish (*Musa AAA*), los cuales, por su resistencia al Mal de Panamá, sustituyeron al cultivar Gros Michel desde el año 1960 (Stover 1986). Estos bananos son producidos a gran escala por varias compañías multinacionales y por un elevado número de pequeños y medianos productores (Martínez *et al.* 2007, FAO 2004). Por otro lado, existen sistemas de producción donde se siguen cultivando las variedades susceptibles como son el Gros Michel (AAA), el Manzano (AAB), el Prata (AAB) y los bananos de cocción tipo Bluggoe (ABB), los cuales son producidos principalmente por pequeños productores (Pocasangre 2009).

2.2 Distribución del Mal de Panamá e importancia económica

El Mal de Panamá fue descrito por primera vez en Australia en 1874 (Bancroft 1876) y posteriormente fue reportado en Costa Rica y Panamá (1890), Suriname (1906), Cuba, Puerto Rico, Jamaica y América Central (1910), La India (1911) y Colombia (1954). En la actualidad esta enfermedad se encuentra en las áreas donde se cultiva banano a excepción de las Islas del Pacífico Sur incluyendo Papúa Nueva Guinea y las Islas de Borneo, Somalia y países bordeados por el Mediterráneo (Stover y Simmonds 1987). Se ha estimado que entre 1890 y 1960 más de 80 000 ha del cultivar Gros Michel (AAA) fueron destruidas (Pocasangre y Pérez 2009) en Centro y Sur América. Reportes indican 30 000 ha perdidas en el valle de Ulua

en Honduras; 4 000 ha en Suriname; 6 000 ha en el área de Quepos en Costa Rica (Ploetz 2005) y 40 000 ha en México (Orozco *et al.* 2009).

El Mal de Panamá sigue siendo un serio problema para muchos cultivares de banano; éstos incluyen Latundan (Filipinas), Maca (Brasil), Pisang Rastali (Malaysia), Rasthali y Virupakshi (India), Lady finger (Australia), Prata (Brasil), correspondientes al grupo AAB; Chuoi Tay (Vietnam), Kayinga (África del Este), Kluai Namwa (Tailandia), pertenecientes al grupo ABB, además de los cultivares Bluggoe (ABB) y Gros Michel que son ampliamente cultivados (Moore *et al.* 1995, Hinz *et al.* 2009). Es importante destacar que en Costa Rica, el Mal de Panamá es la principal enfermedad presente en los sistemas de producción orgánica, donde se cultiva la variedad Gros Michel en asocio con café y cacao. Estudios realizados en la región de Turrialba demostraron que el 90% de las fincas que cultivan café en asocio con Gros Michel están afectadas por *Fusarium* y en la zona de Talamanca el 40% de las fincas que cultivan cacao en asocio con banano presentaron problemas de *Fusarium* (Silagyi y Pocasangre 2003).

Por otro lado, la raza 4 de *FOC* ha causado importantes pérdidas en plantaciones de Taiwán, Malasia, Indonesia, China, Filipinas y el Norte de Australia (Molina 2009); más de 8 millones de plantas en sistemas tradicionales y más de 5 000 ha de plantaciones comerciales del cultivar Cavendish han sido afectadas, con pérdidas anuales que superan los 75 millones de dólares, afectando además los ingresos de las familias y trabajadores. Hasta el momento, esta raza no ha sido reportada en América, pero se presume que su introducción tendría un importante impacto económico y social en Centro y Sur América así como en África, comparable con los causados por la raza 1 a mediados del siglo pasado (Pérez 2004, Molina 2009, Dita *et al.* 2009). Adicionalmente, dado que la raza 4 afecta a otros grupos importantes de musáceas como los plátanos AAB y bananos de cocción ABB, también amenaza la producción por parte de los pequeños agricultores en América Latina y en África Occidental (Ploetz 2004).

Ante esta problemática, *Bioversity Internacional*, en coordinación con el Organismo Regional Internacional de Sanidad Agropecuaria (OIRSA) y la Red de Investigación y Desarrollo de Plátano y Banano para América Latina y el Caribe (MUSALAC), han venido

desarrollando campañas informativas y de prevención de esta amenaza en América Latina y el Caribe (Pocasangre 2009).

2.3 Razas fisiológicas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* afecta las especies de *Musa* y *Heliconia*; sus cepas se han clasificado en cuatro razas fisiológicas basándose en su poder patógeno sobre los cultivares hospedantes. La raza 1 ataca a Gros Michel (AAA), Silk, Pome y Lady Finger (AAB), Pisang Awak (ABB) y Maqueño (AAB); la raza 2 ataca a los bananos de cocción tipo Bluggoe y clones (ABB) estrechamente relacionados (Stover y Waite 1960); la raza 3 afecta principalmente a *Heliconia* spp. (Waite 1977) y la raza 4 ataca al subgrupo Cavendish (AAA) y a todos los cultivares susceptibles a la raza 1 y raza 2 del patógeno (Ploetz 1990, Ploetz 1994b).

2.4 Biología de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

El agente causal de la enfermedad Mal de Panamá es el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* perteneciente a la sección Elegans del género *Fusarium* (Stover 1959, Nelson 1990). *FOC* es un hongo que habita en el suelo, caracterizado por producir tres tipos de esporas asexuales; microconidios, macroconidios y clamidiosporas. Los microconidios presentan una forma ovalada y están constituidos por una célula, mientras que los macroconidios, ligeramente curvados y relativamente delgados, presentan de 4 a 8 células. Micro y macroconidios se producen sobre cortas monofiálides ramificadas o no ramificadas (Nelson 1981, Burgess *et al.* 1994, Leslie y Summerell 2006). Las clamidiosporas son usualmente globosas y se forman individualmente o en pares; estas esporas constituyen estructuras de resistencia del hongo debido a que pueden permanecer en el suelo durante varios años haciendo imposible volver a sembrar cultivares susceptibles en el mismo lugar (Davis 2005).

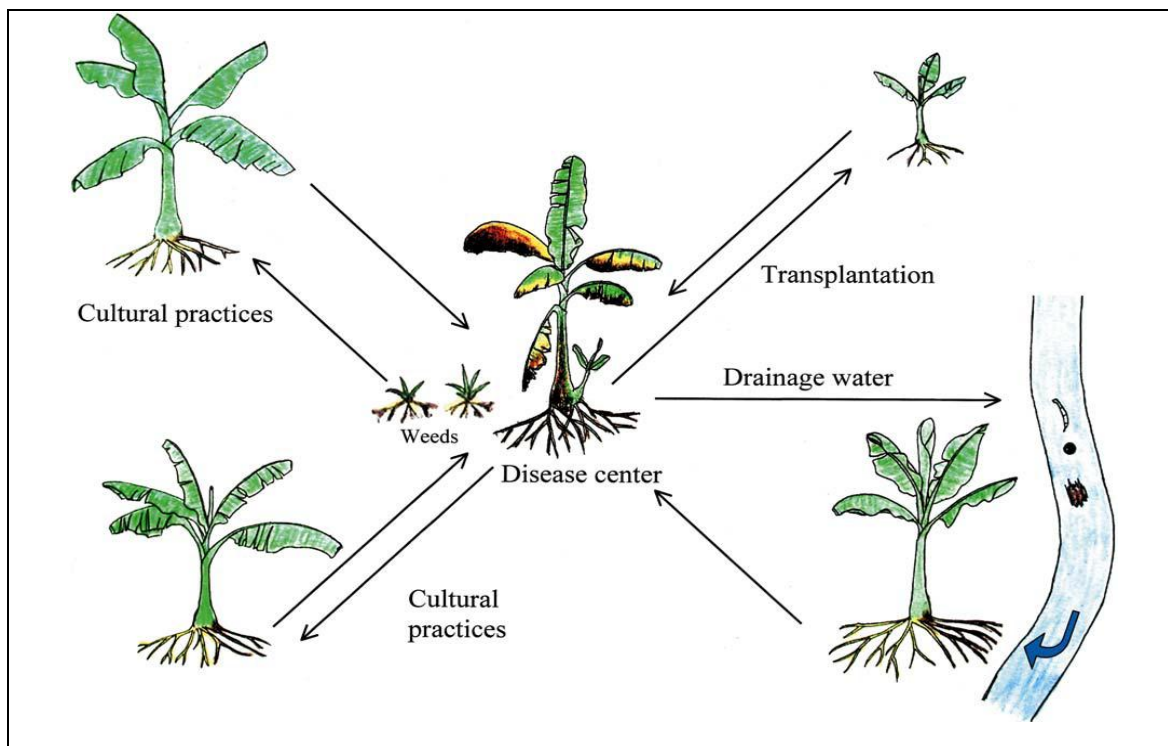
2.5 Ciclo y síntomas de la enfermedad

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* puede permanecer en residuos de banano infectados en forma de clamidiosporas, las cuales germinan estimuladas por secreciones

radicales de las raíces de plantas hospederas y no hospederas o por el contacto con tejido sano de un cultivar susceptible. Micelio y conidios son producidos luego de 6 a 8 horas y nuevas clamidiosporas después de 2 a 3 días (Stover 1968). El hongo penetra a la planta a través de las raíces terciarias pero no por las raíces principales, a menos que haya exposición del cilindro central. A continuación, pasa al sistema vascular del rizoma y pseudotallo e invade los vasos del xilema; el hongo produce conidios los cuales son llevados a lo largo de los haces vasculares donde inician nuevas zonas de infección, ocasionando su obstrucción y como consecuencia el movimiento del agua y nutrientes se reduce. En estados más avanzados de la enfermedad el hongo crece fuera del sistema vascular, en el parénquima adyacente, produciendo grandes cantidades de conidios y clamidiosporas; estas últimas retornan al suelo cuando la planta muere permaneciendo en dormancia eventualmente por varios años. El ciclo se repite cuando las clamidiosporas germinan e infectan nuevamente la planta (Davis 2005, Nel 2005).

El patógeno se dispersa principalmente a través del movimiento de material de propagación y residuos de banano infectados así como por herramientas agrícolas que contengan suelo contaminado, riego y agua de escorrentía (Seshu *et al.* 1998, Tushemereirwe y Bagabe 1998, Davis 2005). Con las lluvias las esporas del patógeno así como el material infectado son transportados hacia los canales de drenaje y a través del agua de riego estas esporas infectan nuevas áreas. Por otra parte, el patógeno puede infectar raíces de ciertas malezas sin provocar síntomas visibles y pueden permanecer en estas plantas en ausencia de banano (Hwang y Ko 2004) (Figura 1).

Los síntomas externos producidos por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* se caracterizan por un amarillamiento de las hojas más adultas a lo largo del margen foliar que continúa hacia la nervadura central hasta quedar las hojas completamente marchitas y de color café; puede o no manifestarse un agrietamiento en la base del pseudotallo (Brandes 1919, Stover 1962, Thurston 1989). En sus inicios este síntoma puede confundirse con los producidos por deficiencia de potasio, especialmente bajo condiciones de sequía y frío (Moore *et al.* 1995). Todas las hojas se agobian en la unión del peciolo con el pseudotallo, quedando colgadas de las plantas (Brandes 1919, Stover 1962) (Figura 2).



Fuente: Hwang y Ko (2004).

Figura 1. Ciclo de la enfermedad Mal de Panamá.



Figura 2. Síntomas de Mal de Panamá en el cultivar Gros Michel; a) marchitez en hojas adultas; b) decoloración del pseudotallo.

Los síntomas internos consisten en una decoloración vascular en el interior del pseudotallo; líneas de color marrón, rojo o amarillo son visibles solamente en las vainas externas o en estado muy avanzado puede alcanzar hasta las vainas internas. En el corno los síntomas son parecidos a los del pseudotallo, estrías necróticas, oscuras o azuladas pueden observarse sobre un fondo blanco (Wardlaw 1961, Stover 1962) (Figura 2).

2.6 Manejo actual de la enfermedad

El Mal de Panamá se encuentra entre las enfermedades de más difícil manejo (Ploetz 2004); no existen medidas de control químico efectivas (Getha y Vikineswary 2002, Pérez 2004, Ploetz 2006). Sin embargo, existen algunas prácticas culturales que a través de la creación de ambientes desfavorables para el patógeno, pueden evitar el desarrollo y la propagación de la enfermedad. Asimismo, el uso de antagonistas en la supresión de *FOC* ha sido reconocido como una alternativa al manejo de esta enfermedad (Getha y Vikineswary 2002, Pérez *et al.* 2003).

2.6.1 Resistencia genética

La utilización de genotipos resistentes y tolerantes al patógeno constituye la manera más efectiva, económica y práctica de combatir la enfermedad (Seshu *et al.* 1998, Rutherford y Kangire 1998). Varios estudios han centrado sus esfuerzos en la búsqueda de fuentes naturales de resistencia al patógeno en especies y cultivares silvestres; a través de la utilización de herramientas biotecnológicas se han seleccionado plantas de banano *in vitro* tolerantes al Mal de Panamá (Morpurgo *et al.* 1994, Matsumoto *et al.* 1999, Cárdenas 2001), así como también se han identificado cultivares resistentes a las razas 1 y 4 de *FOC* (Orjeda 1998), como los FHIA-01, FHIA-03 que pueden reemplazar a variedades susceptibles en algunas áreas de África (Rutherford y Kangire 1998); Tai-Chiao No.1, GCTV-119, GCTCV-216, GCTCV-217 en Taiwán (Hwang 1999) y servir como sustento para la alimentación de sus poblaciones. No obstante, a nivel comercial, estos cultivares no tienen aceptación debido a que sus ciclos de cultivo son excesivamente largos y por la baja calidad de la fruta. Hasta el momento no existe un cultivar resistente que presente la alta calidad organoléptica del subgrupo Cavendish y mucho menos la del cultivar Gros Michel.

McDonald y Linde (2002) relacionaron el potencial evolutivo de varios patógenos con la estructura genética de sus poblaciones, el tipo de reproducción, el flujo de genes y de genotipos y el tamaño de la población. Estos autores determinaron que el poder evolutivo de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* es bajo y como consecuencia el riesgo de que este patógeno pueda romper la resistencia de una planta es mínimo; lo cual resulta positivo en la investigación de genotipos resistentes y tolerantes a *FOC*.

2.6.2 Prácticas culturales

Varias prácticas culturales pueden ser adoptadas para el manejo y/o prevención de la enfermedad. La práctica cultural más extensiva aplicada en los años 60 para el control de la enfermedad fue el barbecho inundado, pero resultó ser muy costoso dada la alta inversión en canales de riego (Stover 1962). La utilización de plantas libres del patógeno provenientes de cultivo de tejidos constituye una buena estrategia para evitar la diseminación del patógeno, sin embargo, en suelos contaminados por *Fusarium*, las vitroplantas son más susceptibles que las plantas provenientes de cormos (Smith 1998). Medidas cuarentenarias y la eliminación de plantas enfermas también son prácticas efectivas que impiden el movimiento de material infectado hacia áreas limpias (Seshu *et al.* 1998, Rutherford y Kangire 1998).

2.6.3 Control biológico

La utilización de microorganismos antagonistas constituye una alternativa para disminuir la incidencia de enfermedades, mejorar la nutrición y la resistencia de las plantas (Pocasangre 2000). Investigaciones han demostrado que existen varios mecanismos de acción de estos antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos, que involucran generalmente antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia (Fernández 2001, Berg y Hallmann 2006).

2.6.3.1 Hongos endofíticos

El biocontrol con hongos endofíticos ha sido objeto de estudio de varias investigaciones en diferentes cultivos. Sivan y Chet (1987), encontraron que *Trichoderma harzianum* redujo la incidencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici* en el cultivo

de tomate bajo condiciones de campo. En concordancia, Pérez *et al.* (2003) informaron de la actividad inhibitoria de *T. harzianum* cepa A34 en tratamientos previos a inoculaciones con *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en plantas susceptibles. Por otra parte, trabajos *in vitro* realizados por Getha y Vikineswary (2002) y Getha *et al.* (2005) demostraron que *Streptomyces violaceusniger* cepa G10 actúo como un agente antagonista sobre diversos hongos patogénicos incluyendo las razas 1, 2 y 4 de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Estos autores informaron además que metabolitos antifúngicos producidos por *S. violaceusniger* en condiciones *in vitro*, produjeron hinchazón, distorsión y una excesiva ramificación de las hifas de *FOC* así como la inhibición de la germinación de esporas. Wu *et al.* (2009), documentaron la actividad de un antibiótico producido por *Streptomyces noursei* contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4. Tarig *et al.* (1998) evaluaron el efecto de aislamientos no patogénicos de *Fusarium* sobre *FOC* raza 1 y 4 y encontraron un aislamiento (*FO4*) que redujo la incidencia de la enfermedad de 79,2 a 30,5%.

2.6.3.2 Bacterias endofíticas

Las bacterias endofíticas forman parte de la gran cantidad de bacterias benéficas presentes en la superficie de las raíces de las plantas, son conocidas por favorecer el crecimiento y desarrollo de las plantas así como por su potencial benéfico como biocontroladores de organismos del suelo que causan enfermedades (Kloepper *et al.* 2004).

Se ha demostrado que bacterias promotoras del crecimiento o PGPR (por sus siglas en inglés, que significan *plant growth promoting rhizobacteria*, o rizobacteria promotora del crecimiento vegetal) influyen positivamente en el crecimiento de las plantas a través de la síntesis de ciertas sustancias reguladoras del crecimiento, giberelinas, citoquininas y auxinas, que estimulan la densidad y longitud de los pelos radicales aumentando la cantidad de raíces en las plantas; otras además están involucradas en procesos de solubilización de fósforo como *Pseudomonas* spp. Adicionalmente, estas bacterias son eficientes en el control de patógenos al producir metabolitos secundarios que funcionan como antagonistas de microorganismos perjudiciales (Sivamani y Gnanamanickam 1988, Rodriguez y Pfender 1997, Van Loon *et al.* 1998, Naik *et al.* 2008, Jha *et al.* 2009).

En la mayoría de los casos, bacterias promotoras del crecimiento que han resultado efectivos agentes de biocontrol de nematodos y enfermedades fungosas, incluyendo al

patógeno *Fusarium oxysporum*, corresponden a los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, las cuales además han sido reportadas como organismos inductores de resistencia sistémica en las plantas (Ramamoorthy *et al.* 2001, Kloepper *et al.* 2004). Sivamani y Gnanamanickam (1988) encontraron que cepas de *Pseudomonas fluorescens* exhibieron antibiosis *in vitro* en aislamientos de las razas 1 y 4 de *FOC*. Plantas de *Musa balbisiana* tratadas con *P. fluorescens* presentaron menor severidad de marchitez y decoloración interna en experimentos en invernadero y adicionalmente como resultado de la supresión de *FOC* las plantas tuvieron un mayor crecimiento radicular y altura de planta.

Por otro lado, Kloepper *et al.* (2004) documentaron que cepas de *Bacillus* provocaron reducciones significativas en la incidencia y severidad de varias enfermedades en diversos hospedantes tanto en pruebas de invernadero como en ensayos a campo abierto, las cuales están asociadas con cambios estructurales y alteraciones citoquímicas en las plantas durante el ataque de patógenos.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Ubicación geográfica de la investigación

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Nematología y Fitopatología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), ubicado en el cantón Turrialba de la provincia de Cartago, Costa Rica. Localizado a 9°52" Norte y 83°38" Oeste, a una altura de 602 msnm, con un rango de temperatura que oscila entre los 22 y 28 °C con precipitación promedio anual de 2 600 mm y 87% de humedad relativa.

3.2 Material experimental

3.2.1 Aislamientos de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*

Se utilizaron nueve aislamientos de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* (FOC) correspondientes a la raza 1 del patógeno, provenientes de plantas enfermas del cultivar susceptible Gros Michel (AAA). Los aislamientos FOC 1 y FOC 2, colectados por el Dr. Harry Stover en Talamanca, Costa Rica, fueron suministrados por el Dr. Randy Ploetz de la Universidad de Florida, USA. Los demás aislamientos fueron recolectados en Turrialba, Costa Rica (Cuadro 1).

Cuadro 1. Aislamientos de Fusarium oxysporum f. sp. cubense evaluados en la presente investigación

Código	Procedencia
FOC 1	Talamanca
FOC 2	Talamanca
FOC 3	Cabiria
FOC 4	Cabiria
FOC 5	Cabiria
FOC 6	Cabiria
FOC 7	Cabiria
FOC 8	La Montaña
FOC 9	La Montaña

3.2.2 Bacterias endofíticas

Se utilizaron 30 bacterias endofíticas correspondientes a los géneros *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. provenientes de fincas comerciales de banano de la Zona Atlántica de Costa Rica (Cuadro 2). Estas bacterias fueron seleccionadas por su actividad biológica como agentes de biocontrol de fitonematodos en pruebas *in vitro* e *in vivo* realizadas en el Laboratorio de Nematología y Fitopatología del CATIE en los años 2006 y 2008 (Núñez 2006, Meusinger 2008).

Cuadro 2. Descripción de las bacterias endofíticas evaluadas en esta investigación

Finca	Código	Género
Duacari 2	P – 52	<i>Pseudomonas</i> spp.
Duacari 2	P – 58	<i>Pseudomonas</i> spp.
El Carmen 2 A	P – 8	<i>Pseudomonas</i> spp.
El Carmen 1	B – 37	<i>Bacillus</i> spp.
El Carmen 1	B – 31	<i>Bacillus</i> spp.
Monte Líbano	B – 23	<i>Bacillus</i> spp.
Duacari 2 A	B – 62	<i>Bacillus</i> spp.
Frutera A	B – 50	<i>Bacillus</i> spp.
Monte Líbano	B – 21	<i>Bacillus</i> spp.
Duacari 2 A	B – 61	<i>Bacillus</i> spp.
Cartagena	F7 – B13	<i>Bacillus</i> spp.
Eresfuerza	F1 – P15	<i>Pseudomonas</i> spp.
San Paulo	F6 – B5	<i>Bacillus</i> spp.
Cartagena	F7 – B10	<i>Bacillus</i> spp.
Orgánica	F.O 19	<i>Bacillus</i> spp.
Eresfuerza	F1 – B7	<i>Bacillus</i> spp.
Calinda	F4 – B40	<i>Bacillus</i> spp.
Cartagena	F7 – B15	<i>Bacillus</i> spp.
San Paulo	F6 – B25	<i>Bacillus</i> spp.
Cartagena	F7 – B6	<i>Bacillus</i> spp.
Carmen	F9 – B62	<i>Bacillus</i> spp.
Cartagena	F7 – B9	<i>Bacillus</i> spp.
Orgánica	F.O 25	<i>Bacillus</i> spp.
Variedades	F2 – PA15	<i>Pseudomonas</i> spp.
Eresfuerza	F1 – B9	<i>Bacillus</i> spp.
Orgánica	F.O 4	<i>Bacillus</i> spp.
Cartagena	F7 – B14	<i>Bacillus</i> spp.
Cartagena	F7 – B3	<i>Bacillus</i> spp.
Palo Verde	F3 – P2	<i>Pseudomonas</i> spp.
Cartagena	F7 – B5	<i>Bacillus</i> spp.

3.2.3 *Material vegetal*

Se utilizaron plantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) provenientes de cultivo de tejidos con ocho a doce semanas de aclimatación en invernadero. Estas plantas fueron obtenidas del Laboratorio de Biotecnología del CATIE.

3.3 Aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* de plantas de banano enfermas

En sectores ubicados alrededor de la finca del CATIE, Turrialba, Costa Rica, se colectaron muestras de tejido vegetal del pseudotallo y corno de plantas enfermas de banano del cultivar Gros Michel (AAA). Las muestras fueron obtenidas de cada planta y fueron colocadas por separado en bolsas plásticas con su correspondiente identificación. Posteriormente fueron transportadas al Laboratorio de Nematología y Fitopatología del CATIE donde se realizó el aislamiento y purificación del hongo.

Las muestras de tejido vegetal fueron cortadas en segmentos e inmediatamente fueron lavados con agua durante tres minutos con agitación constante para remover impurezas adheridas. Posteriormente, bajo condiciones asépticas, se esterilizó la superficie de cada segmento, para lo cual se sumergieron en una solución de hipoclorito de sodio al 1,5% durante tres minutos con agitación constante y seguidamente se hicieron tres lavados con agua destilada esterilizada por tres minutos en cada ocasión. Los segmentos fueron colocados en papel filtro para eliminar el exceso de agua. Cinco segmentos fueron colocados por cada plato Petri de 9 cm de diámetro que contenía *Potato Dextrosa Agar* (PDA) al 100% suplementado con ácido láctico al 85% para prevenir el crecimiento de bacterias. Los platos fueron sellados con *parafilm* y almacenados a 24 °C por tres días.

El micelio de *Fusarium* desarrollado en los segmentos de tejido vegetal fue subcultivado en platos Petri con PDA al 100% y posteriormente estos fueron sellados y almacenados por 7 días a 24 °C. Los aislamientos recolectados fueron identificados con los códigos *FOC 3*, *FOC 4*, *FOC 5*, *FOC 6*, *FOC 7*, *FOC 8* y *FOC 9*.

3.4 Conservación de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en criobanco

Los aislamientos de *FOC* recolectados fueron almacenados en tubos de conservación en criobanco, para lo cual se inocularon asépticamente los tubos de conservación con colonias de cultivos puros de los aislamientos de *FOC*. A continuación se mezcló cuidadosamente el contenido de cada tubo invirtiéndolo constantemente para distribuir completamente el hongo y posteriormente se extrajo el fluido del criopreservativo con una pipeta Eppendorf. Los tubos inoculados fueron almacenados en un congelador a - 20 °C.

3.5 Identificación morfológica de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Para la identificación morfológica de los aislamientos de *FOC* se utilizaron cultivos del hongo de dos semanas de crecimiento en PDA al 100%. Cada aislamiento fue observado macroscópicamente con el objeto de determinar la apariencia del micelio y pigmentación de las colonias. Asimismo, conforme a lo propuesto por Stover (1959) los aislamientos fueron clasificados dentro de los grupos Inodoratum y Odoratum, designados así por la ausencia o presencia de olores aromáticos cuando crecían en PDA.

Las estructuras típicas; microconidios, macroconidios y clamidiosporas fueron observadas y analizadas utilizando un microscopio Olympus BH2 con aumento 40x.

3.6 Cultivo y multiplicación de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Los aislamientos de *FOC* fueron cultivados en PDA al 100%, para lo cual se extrajeron perlas impregnadas con colonias de cultivo puro del hongo de los tubos de conservación en criobanco. Las perlas fueron inoculadas en platos Petri que contenían el PDA y a continuación cada plato fue sellado con *parafilm* y almacenado a 24 °C por dos semanas. Posteriormente se realizó la multiplicación de los aislamientos de *FOC*, para lo cual se tomó una porción de micelio y se pasó a platos Petri que contenían PDA. Los platos se almacenaron a 24 °C por dos semanas.

3.7 Cultivo y multiplicación de bacterias endofíticas

Las bacterias endofíticas fueron cultivadas en Agar Nutritivo al 100%, para lo cual se extrajeron perlas impregnadas con células de las bacterias de los tubos de conservación en criobanco. Las perlas fueron inoculadas en platos Petri que contenían el Agar Nutritivo y a continuación cada plato fue sellado con *parafilm* y almacenado a 24 °C por una semana. Posteriormente se realizó la multiplicación de las bacterias endofíticas, para lo cual se tomó una porción de bacteria utilizando un asa esterilizada y se pasó a platos Petri que contenían Agar Nutritivo realizando un rayado sobre la superficie del agar. Los platos se almacenaron a 24 °C por una semana.

3.8 Preparación de la suspensión de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

La suspensión de esporas se realizó con cultivos de *FOC* de dos semanas de crecimiento en PDA al 100%. A cada plato Petri se agregaron 20 ml de agua y con la ayuda de una espátula plástica se removieron las esporas y el micelio, la solución obtenida se filtró en un *beaker* por medio de una gasa para separar el micelio de las esporas y se llevó a un volumen de 100 ml. Se realizó el conteo de las unidades formadoras de colonias (ufc) utilizando un hematocímetro de Neubauer en un microscopio Olympus BH2 con aumento 40x y finalmente la solución se ajustó a una concentración de 1×10^6 ufc/ml (Figura 3).



Figura 3. Protocolo para la preparación de suspensión de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

3.9 Preparación de la suspensión de células de bacterias endofíticas

La suspensión de células se realizó con cultivos de bacterias endofíticas de una semana de crecimiento en Agar Nutritivo al 100% mediante el procedimiento descrito en el numeral 3.8. Se determinó las ufc utilizando un hematocímetro de Neubauer en un microscopio Olympus BH2 con aumento 40x y finalmente la solución se ajustó a una concentración de 1×10^6 ufc/ml.

3.10 Bioensayo 1. Prueba de patogenicidad

El efecto de nueve aislamientos de *FOC* sobre vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel fue evaluado a través de una prueba de patogenicidad en condiciones de invernadero.

3.10.1 *Inoculación de vitroplantas con aislamientos de Fusarium oxysporum f. sp. cubense*

Vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) de ocho semanas de aclimatación en invernadero fueron inoculadas con suspensiones de esporas de los aislamientos de *FOC*. La inoculación se realizó sumergiendo el sistema radical de las vitroplantas en una suspensión de *FOC* a una concentración de 1×10^6 ufc/ml durante 15 minutos y posteriormente se trasplantaron en contenedores plásticos de 250 cm³ de capacidad con una mezcla esterilizada de tierra y arena en una proporción de 1:1. El sustrato se esterilizó en un horno eléctrico a 300 °C durante 10 horas. Dos semanas después de la primera inoculación se realizó una re inoculación, que consistió en colocar 5 ml de las suspensiones de *FOC* a una concentración de 1×10^6 ufc/ml en tres orificios de 1 a 2 cm de profundidad realizados en el sustrato alrededor del área radical y cercana a la base del rizoma, para lo cual se utilizó una pipeta Eppendorf calibrada. Se estableció un testigo absoluto que consistió en vitroplantas sin inoculación de *FOC*, solamente sumergidas en agua durante 15 minutos. Se realizaron ocho repeticiones por cada tratamiento, las cuales se distribuyeron al azar en el invernadero, donde permanecieron seis semanas a una temperatura de 25 ± 2 °C (Figura 4).



Figura 4. Protocolo para la inoculación de vitroplantas de banano con aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense.

3.10.2 Evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad

El periodo de incubación se determinó cuando se presentó la primera planta con síntomas externos característicos de la enfermedad. La incidencia de la enfermedad se calculó por el número de plantas que presentaron síntomas de la enfermedad y se expresó en porcentaje de plantas enfermas. Las evaluaciones se realizaron de manera semanal hasta el término del ensayo.

La severidad de la enfermedad se evaluó por el grado de daño expresado tanto en síntomas externos como internos, los cuales fueron estimados visualmente según la escala propuesta por Orjeda (1998) (Cuadro 3). Los síntomas externos se evaluaron cada semana mientras que los internos se tomaron al finalizar el ensayo, para lo cual las plantas fueron sacrificadas y se realizaron cortes longitudinales a nivel del cormo.

Adicionalmente se midieron variables de crecimiento de las plantas; número de hojas por planta, altura de planta, diámetro del pseudotallo, largo y ancho de la tercera hoja, longitud del peciolo de la tercera hoja e índice foliar. Estas, se evaluaron cada dos semanas hasta el término del ensayo. Finalmente se tomó el peso radical, foliar y total de la planta.

Cuadro 3. Escala de evaluación de síntomas provocados por *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*

Valor	Síntomas externos		Síntomas internos
	Amarillamiento	Marchitez	
1	Ausencia de síntomas	Ausencia de síntomas	Ausencia de síntomas
2	Amarillamiento en hojas viejas	Marchitez en hojas viejas	Puntos aislados de decoloración en el tejido vascular
3	Amarillamiento en hojas bajas	Marchitez en hojas bajas	Decoloración de hasta 1/3 del tejido vascular
4	Amarillamiento en las hojas jóvenes	Marchitez en las hojas jóvenes	Decoloración de entre 1/3 y 2/3 del tejido vascular
5	Severo amarillamiento	Severa marchitez	Decoloración mayor a los 2/3 del tejido vascular
6	Muerte de la planta	Muerte de la planta	Decoloración total del tejido vascular

Fuente: Orjeda (1998)

3.11 Bioensayo 2. Prueba de antibiosis sobre tres aislamientos de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*

A través de una prueba de antibiosis se midió la capacidad inhibitoria de 30 bacterias endofíticas sobre el crecimiento de tres aislamientos de *FOC* que presentaron los mayores niveles de agresividad en la prueba de patogenicidad.

3.11.1 Cocultivo de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* y bacterias endofíticas

Un disco de agar de 0,5 cm de diámetro conteniendo micelio, microconidios y macroconidios de *FOC* de dos semanas de crecimiento fue colocado al extremo de un plato Petri con PDA al 100% y sin ácido láctico; simultáneamente al extremo opuesto, con la ayuda de una asa esterilizada, se colocó una barrera de bacteria endofítica de una semana de crecimiento en Agar Nutritivo. Cada plato fue identificado, sellado con *parafilm* y almacenado a 24 °C por 15 días. Se establecieron tres testigos referenciales que correspondieron al cultivo

de los tres aislamientos de *FOC* sin la barrera de bacteria endofítica. Se realizaron cuatro repeticiones por cada tratamiento (Figura 5).



Figura 5. Protocolo para el cocultivo de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* y bacterias endofíticas.

3.11.2 Evaluación del crecimiento radial de los aislamientos de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*

Se realizaron mediciones del crecimiento de *FOC* cada tres días por un periodo de 15 días. En cada plato Petri se midió el crecimiento radial del hongo hacia el lado izquierdo y derecho del centro del disco de agar; al finalizar los 15 días de cocultivo se determinó el peso fresco y peso seco de *FOC*, para lo cual se removió el micelio y esporas del hongo con la ayuda de un asa plástica. La cantidad obtenida fue pesada en una balanza de precisión OHAUS modelo GA110 y posteriormente fue colocada en sobres de papel, los cuales se llevaron a un horno de desecación donde permanecieron 24 horas a 70 °C. Finalmente se determinó el peso seco de cada muestra.

3.12 Bioensayo 3. Prueba de biocontrol sobre tres aislamientos de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*

En la prueba de biocontrol se evaluó el efecto de 10 bacterias endofíticas que presentaron mayor actividad de antibiosis sobre tres aislamientos de *FOC* en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel bajo condiciones de invernadero

3.12.1 *Protección de vitroplantas con bacterias endofíticas*

Vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) de 12 semanas de aclimatación en invernadero fueron inoculadas con suspensiones de las bacterias endofíticas que mostraron un mayor efecto de biocontrol en la prueba de antibiosis. La inoculación se realizó sumergiendo el sistema radical de las vitroplantas en una suspensión de bacterias endofíticas a una concentración de 1×10^6 ufc/ml durante 15 minutos. Posteriormente las vitroplantas fueron trasplantadas en contenedores plásticos de 250 cm³ de capacidad que contenían una mezcla esterilizada de tierra y arena en una relación 1:1. El sustrato se esterilizó en un horno eléctrico a 300 °C durante 10 horas. Se realizaron seis repeticiones por cada tratamiento, las cuales se distribuyeron al azar en el invernadero donde permanecieron 11 semanas a una temperatura de 25 ± 2 °C (Figura 6).



Figura 6. Protocolo para la protección de vitroplantas de banano con bacterias endofíticas.

3.12.2 *Inoculación de vitroplantas con tres aislamientos de Fusarium oxysporum f. sp. cubense*

Tres semanas después de la protección de las vitroplantas con las bacterias endofíticas se realizó la inoculación con los tres aislamientos de *FOC* que presentaron mayores niveles de agresividad determinados en la prueba de patogenicidad. La inoculación se realizó aplicando 5 ml de una suspensión ajustada de *FOC* a una concentración de 1×10^6 ufc/ml en tres orificios de 1 a 2 cm de profundidad realizados en el sustrato alrededor del área radical y cercana a la base del rizoma, para lo cual se utilizó una pipeta Eppendorf calibrada. Cuatro semanas después se realizó una segunda inoculación de *FOC* siguiendo el mismo procedimiento.

Se establecieron tres testigos referenciales que correspondieron a plantas sin inoculación de bacterias endofíticas pero con inoculación de los tres aislamientos de *FOC* y un testigo absoluto que consistió en plantas sin inoculación de bacterias endofíticas ni inoculación de los aislamientos de *FOC*.

3.12.3 Evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad

El periodo de incubación así como la incidencia y severidad de la enfermedad fueron determinadas mediante el procedimiento descrito en el numeral 3.10.2. De igual manera se midieron variables de crecimiento cada dos semanas hasta finalizar el ensayo, momento en el cual se tomó el peso radical, peso foliar y peso total de las plantas.

3.13 Métodos estadísticos

Se realizaron Análisis de Varianza de efecto fijo y bajo la óptica de los Modelos lineales generales y mixtos para las variables que se evaluaron en cada uno de los tres bioensayos (Cuadro 4). En los casos en que se rechazó la hipótesis de igualdad de tratamientos se utilizó la prueba de comparación de medias LSD de Fisher. Los datos que no cumplieron con el supuesto de normalidad, evaluada mediante la prueba de Shapiro–Wilks, fueron transformados a rangos. Para evaluar el supuesto de homogeneidad de varianzas se modelaron los datos con varianzas homogéneas y heterogéneas y los modelos resultantes fueron comparados con la prueba del cociente de verosimilitud. Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico InfoStat versión 2009 (Di Rienzo *et al.* 2009).

Cuadro 4. Variables evaluadas en los bioensayos de la investigación

Bioensayo	Variables
Prueba de patogenicidad	<i>Incidencia</i>
Prueba de biocontrol	<i>Severidad</i> Amarillamiento Marchitez Decoloración del cormo
	<i>Crecimiento de la planta</i> Número de hojas Altura de planta Diámetro del pseudotallo Largo de hoja Ancho de hoja Longitud del peciolo Índice foliar Peso radical Peso foliar Peso total
Prueba de antibiosis	<i>Crecimiento radial del hongo</i> <i>Peso fresco</i> <i>Peso seco</i>

3.13.1 Bioensayo 1. Prueba de patogenicidad

En esta prueba se evaluaron 10 tratamientos que consistieron en la inoculación de nueve aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (FOC) y un testigo absoluto que correspondió a plantas sin inoculación de FOC. Se realizaron ocho repeticiones por tratamiento en un arreglo completamente aleatorizado para un total de 80 unidades experimentales.

El modelo estadístico de análisis fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \varepsilon_{ij}$$

donde:

- Y_{ij} = Variable repuesta en el tratamiento i repetición j
 μ = Media general
 T_i = Efecto del i -ésimo tratamiento
 ε_{ij} = Término de error independiente, supuestamente distribuído normal, con media cero y varianza constante

Los datos correspondientes a las variables incidencia y severidad de la enfermedad fueron analizados bajo la óptica de modelos lineales generales y mixtos con varianzas homogéneas para los tratamientos y utilizando el número de evaluación como covariable. Adicionalmente se calcularon índices sintéticos para el amarillamiento y marchitez a través de la fórmula $\sum_{i=0}^5 \frac{i \cdot n_i}{5 \cdot N}$, donde i : fue el nivel observado, n_i el número de plantas en el nivel i , N el número total de plantas y 5 fue el nivel máximo (se restó 1 a la escala propuesta para iniciar en 0). Finalmente con estos índices se hicieron gráficos de evolución de la enfermedad en función del tiempo.

Para el análisis de los datos de crecimiento se calculó la diferencia entre la última evaluación y la primera evaluación en cada una de las variables. Posteriormente se realizó un Análisis de Varianza para las variables altura de planta, número de hojas, diámetro del pseudotallo, largo y ancho de hoja; mientras que las variables longitud del peciolo e índice foliar fueron analizadas bajo la óptica de modelos lineales generales y mixtos con varianzas heterogéneas. Con base a los resultados obtenidos en las variables de crecimiento se calculó un índice de crecimiento global para lo cual se obtuvo el ranking para las medias de cada una de las variables y posteriormente se realizó un Análisis de Varianza con los valores de ranking obtenidos para los distintos tratamientos. Esto permitió evaluar los tratamientos en forma sintética de manera de simplificar la selección de los aislamientos de *FOC* más agresivos.

Las variables peso foliar, peso de planta y decoloración del cormo fueron analizadas bajo modelos lineales generales y mixtos con varianzas heterogéneas mientras que el peso radical fue analizado con un Análisis de Varianza clásico. Finalmente se realizó un análisis de ranking con las variables evaluadas para seleccionar los tres aislamientos más patogénicos.

3.13.2 Bioensayo 2. Prueba de antibiosis sobre tres aislamientos de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*

En esta prueba existieron dos factores en estudio con 3 y 31 niveles respectivamente. El primer factor correspondió a los tres aislamientos de *FOC* que presentaron mayores niveles de agresividad en la prueba de patogenicidad, mientras que el segundo factor comprendió 30 bacterias endofíticas (Cuadro 2) y un control sin bacteria endofítica.

Se utilizó un diseño de bloques completos al azar con un arreglo factorial 3×31 con cuatro repeticiones por tratamiento para un total de 372 unidades experimentales.

El modelo estadístico para este arreglo de tratamientos fue el siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + F_i + E_j + F_iE_j + B_k + \varepsilon_{ijk}$$

donde:

Y_{ijk} = Variable respuesta

μ = Media general

F_i = Efecto del i -ésimo nivel del factor aislamiento de *FOC*

E_j = Efecto del j -ésimo nivel del factor bacteria endofítica

F_iE_j = Efecto de la interacción aislamiento de *FOC* - bacteria endofítica

B_k = Efecto del k -ésimo bloque

ε_{ijk} = Término de error independiente, supuestamente distribuido normal, con media cero y varianza constante

Las variables crecimiento radial, peso fresco y peso seco del hongo fueron analizadas bajo la óptica de modelos lineales generales y mixtos. Los datos del crecimiento radial fueron modelados con varianzas homogéneas para los tratamientos, mientras que los de peso fresco y seco del hongo fueron modelados con varianzas heterogéneas para el factor bacteria.

3.13.3 Bioensayo 3. Prueba de biocontrol sobre tres aislamientos de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*

En la prueba de biocontrol existieron dos factores en estudio con 3 y 11 niveles respectivamente. El primer factor correspondió a los 3 aislamientos de *FOC* que presentaron mayores niveles de agresividad en la prueba de patogenicidad y el segundo factor comprendió las 10 bacterias endofíticas que presentaron mejores resultados en la prueba de antibiosis y un control sin bacteria endofítica. Adicionalmente se estableció un testigo absoluto que correspondió a plantas sin inoculación de bacterias endofíticas ni de los aislamientos de *FOC*.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con un arreglo factorial incompleto de $3 \times 11 + 1$ (3 *FOC* \times 11 bacterias + un testigo absoluto) con seis repeticiones para un total de 204 unidades experimentales.

El modelo estadístico para este arreglo de tratamientos fue el siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

donde:

Y_{ij} = Variable repuesta en el tratamiento i repetición j

μ = Media general

T_i = Efecto del i -ésimo tratamiento

ϵ_{ij} = Término de error independiente, supuestamente distribuido normal, con media cero y varianza constante

Para estudiar la interacción se tomó en primer lugar la estructura factorial completa, *i.e.* 11 bacterias endofíticas por 3 aislamientos de *FOC* bajo el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + F_i + B_j + F_i B_j + \epsilon_{ijk}$$

donde:

- Y_{ijk} = Variable respuesta
 μ = Media general
 F_i = Efecto del i -ésimo nivel del factor aislamiento de *FOC*
 B_j = Efecto del j -ésimo nivel del factor bacteria endofítica
 F_iB_j = Efecto de la interacción aislamiento de *FOC* - bacteria endofítica
 ϵ_{ijk} = Término de error independiente, supuestamente distribuído normal, con media cero y varianza constante

Luego, usando contrastes ortogonales se probó la diferencia entre el testigo absoluto y el resto de los tratamientos.

El análisis de los datos correspondientes a las variables incidencia y severidad de síntomas externos e internos fueron analizados bajo la óptica de modelos lineales generales y mixtos con varianzas homogéneas para los factores evaluados.

Para el análisis de los datos de crecimiento se calculó la diferencia entre la última y la primera evaluación en cada una de las variables y posteriormente se realizaron modelos lineales generales y mixtos con varianzas homogéneas para cada tratamiento.

Las variables peso foliar, peso radical y peso de planta fueron analizadas bajo modelos lineales generales y mixtos con varianzas heterogéneas para el factor bacteria.

4 RESULTADOS

4.1 Caracterización morfológica de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Todos los aislamientos de *FOC* presentaron un abundante micelio con apariencia algodonosa; sin embargo, la coloración de las colonias varió entre ellos. Los aislamientos *FOC 1* y *FOC 2* presentaron una pigmentación amarillenta, *FOC 3*, *FOC 4*, *FOC 5*, *FOC 6*, *FOC 7* y *FOC 8* exhibieron tonos rosados; mientras que el aislamiento *FOC 9* presentó una pigmentación en tono violeta intenso (Figura 7). Todos los aislamientos produjeron olores aromáticos y por tanto fueron clasificados en el grupo Odoratum.

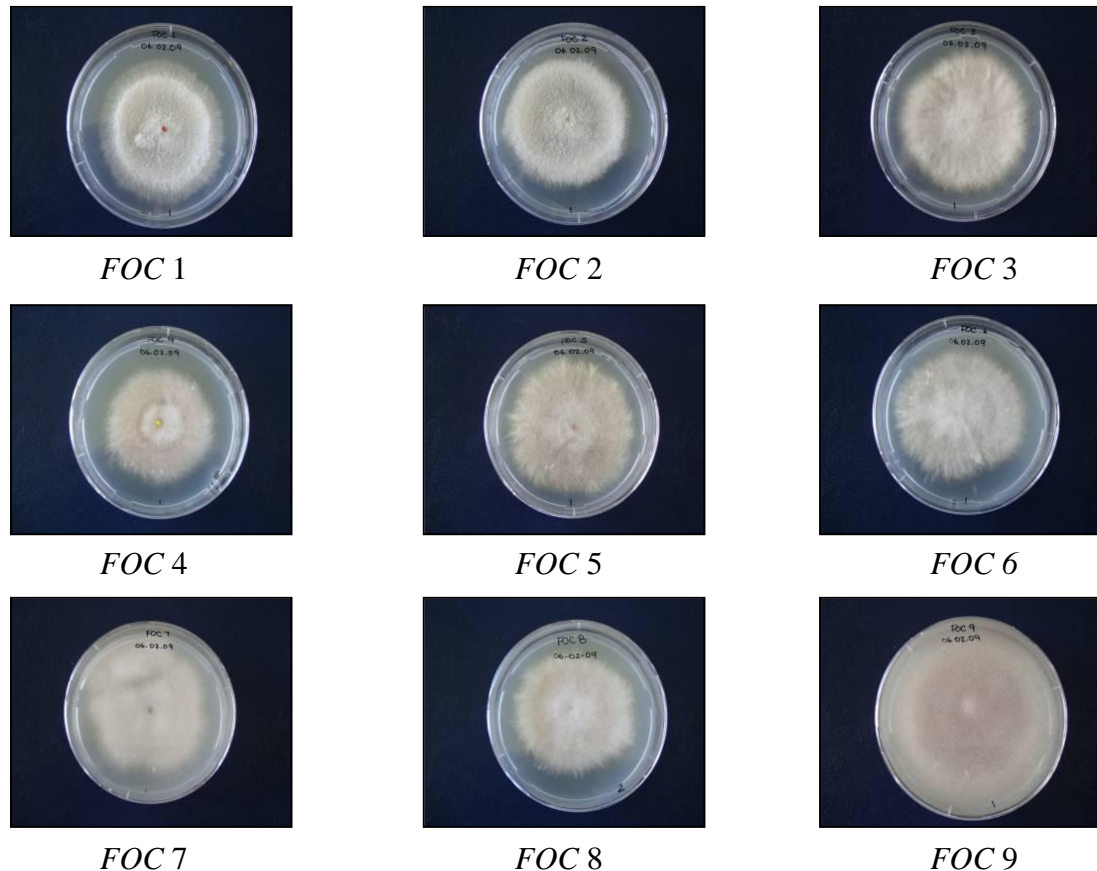


Figura 7. Aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en Potato Dextrosa Agar al 100% dos semanas después de cultivados.

La forma y tamaño de las esporas fue similar entre los nueve aislamientos de *FOC*; los microconidios presentaron una forma ovalada y carecían de septas; los macroconidios fueron

curvados con tres septas, la célula apical fue curvada y la basal puntiaguda; las clamidiosporas fueron redondeadas con doble pared (Figura 8).

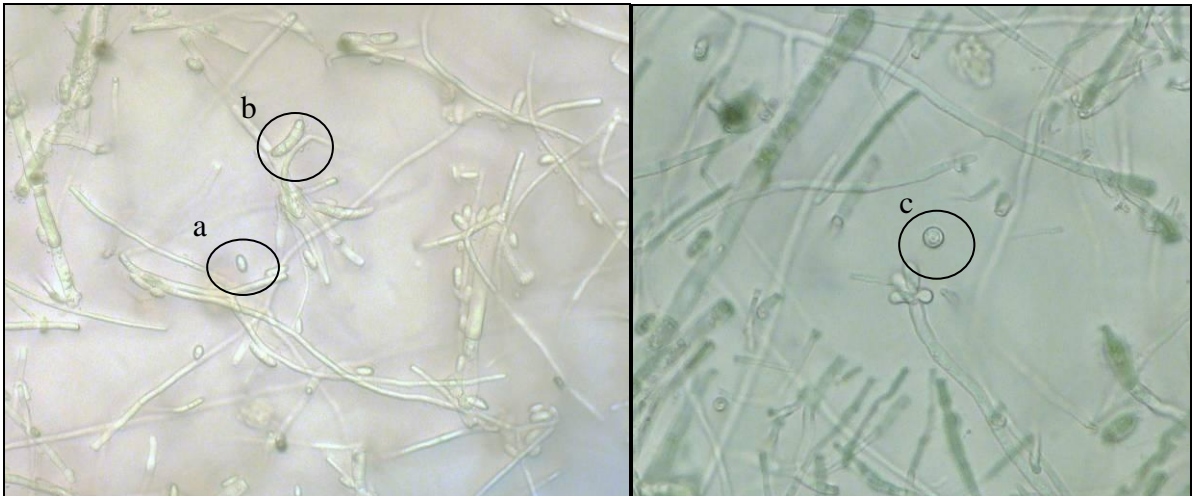


Figura 8. Estructuras reproductivas de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* observadas al microscopio a) microconidio, b) macroconidio, c) clamidiospora.

4.2 Bioensayo 1. Prueba de patogenicidad

4.2.1 Incidencia y severidad de la enfermedad

Todos los aislamientos de *FOC* causaron los primeros síntomas de la enfermedad a partir de la cuarta semana después de la primera inoculación de *FOC* (periodo de incubación); incrementándose en la quinta y sexta semana. Al finalizar el ensayo todas las plantas inoculadas con los aislamientos de *FOC* llegaron a un 100% de incidencia, a excepción de las plantas inoculadas con los aislamientos *FOC* 6 y *FOC* 9 con los cuales se presentaron 88% y 0% de incidencia respectivamente. Plantas testigo, que no fueron inoculadas con *FOC*, permanecieron sanas y libres de síntomas externos e internos de la enfermedad (Figura 9).

El análisis de los resultados detectó diferencias significativas para la incidencia de la enfermedad ($p < 0,0001$). Los aislamientos *FOC* 2, *FOC* 4, *FOC* 1 y *FOC* 7 presentaron valores mayores de incidencia de la enfermedad. Por el contrario; el aislamiento *FOC* 9 presentó 0% de incidencia (Cuadro 5).

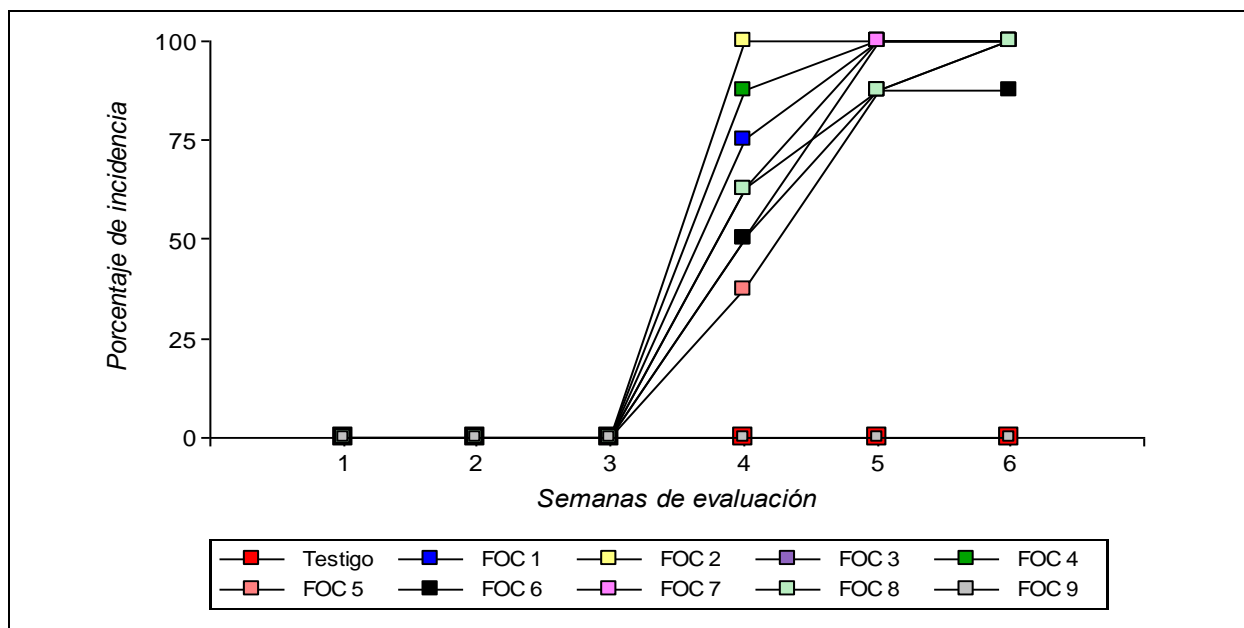


Figura 9. Incidencia del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum f. sp. cubense*) en vitroplantas de banana del cultivar Gros Michel en seis semanas de evaluación.

Respecto a los síntomas externos expresados en amarillamiento y marchitez, los análisis de los resultados registraron diferencias significativas ($p < 0,0001$). La severidad del amarillamiento y la marchitez se incrementaron conforme avanzaron las semanas de evaluación, los aislamientos FOC 4 y FOC 2 presentaron los mayores niveles de amarillamiento y marchitez (Cuadro 5, Figura 10, Figura 11).

Cuadro 5. Efecto de diferentes aislamientos de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* sobre la incidencia y severidad de la enfermedad en seis semanas de evaluación

FOC	% Incidencia		Síntomas externos			
			Amarillamiento		Marchitez	
2	100	d	4,0	d	2,58	d
4	96	cd	4,2	d	3,29	e
1	92	cd	3,2	bc	2,04	bcd
7	88	bcd	3,0	bc	1,88	b
3	83	bc	3,1	bc	2,00	bc
8	83	bc	3,4	c	2,54	cd
6	75	b	2,9	bc	2,00	bcd
5	75	b	2,7	b	1,54	b
9	0	a	1,0	a	1,00	a
Testigo	0	a	1,0	a	1,00	a

Datos corresponden al promedio de tres evaluaciones. Variables sin transformar; letras indican diferencias significativas para las variables transformadas a rangos ($p \leq 0,05$).

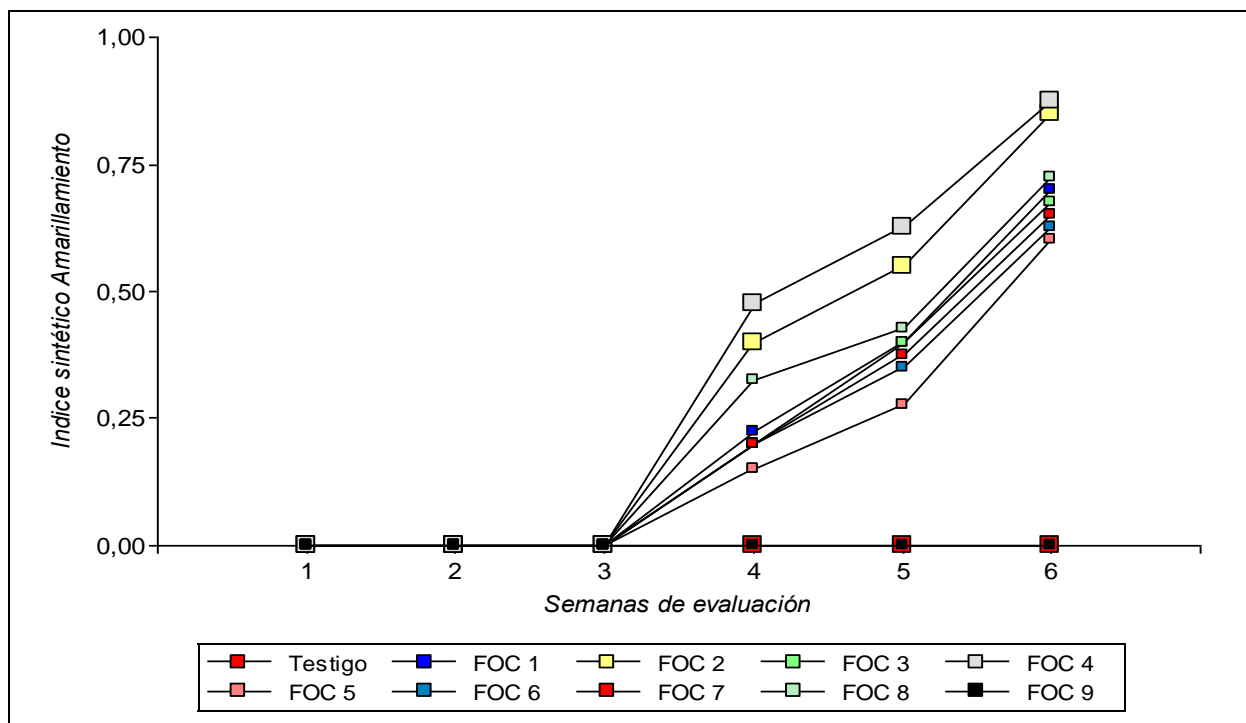


Figura 10. Evolución de la severidad de los síntomas externos (amarillamiento) producidos por *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel en seis semanas de evaluación.

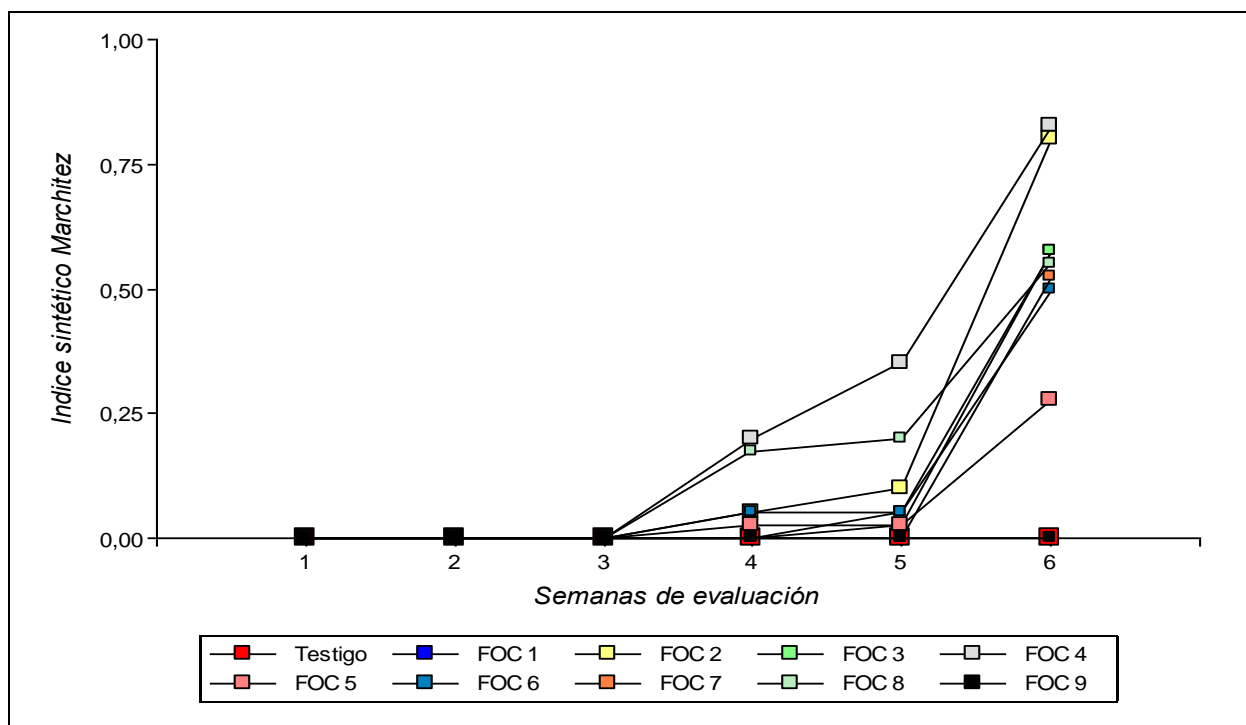


Figura 11. Evolución de la severidad de los síntomas externos (marchitez) producidos por *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel en seis semanas de evaluación.

4.2.2 Variables de crecimiento

Los resultados registraron diferencias significativas para las variables diámetro del pseudotallo ($p=0,0489$), longitud del peciolo ($p<0,0001$), largo de la hoja ($p=0,0015$) e índice foliar ($p=0,0443$); mientras que para las variables altura de planta, número de hojas y ancho de la hoja no se detectaron diferencias significativas entre tratamientos. Respecto al índice de crecimiento global, no se presentaron diferencias significativas, no obstante el aislamiento *FOC 8* provocó el menor índice de crecimiento (Cuadro 6).

Cuadro 6. Efecto de los aislamientos de Fusarium oxysporum f. sp. cubense sobre el incremento en el crecimiento de las vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel

FOC	Altura	No. Hojas	Diámetro pseudotallo	Longitud peciolo	Largo* de hoja	Ancho de hoja	Índice* foliar	Índice crec.
1	0,36	- 0,63	0,59 a	0,88 d	1,11 c	0,65	- 0,25 ab	6,43
2	0,23	- 0,88	0,59 a	0,48 bcd	0,28 a	0,03	0,07 b	5,00
3	0,28	- 0,25	0,69 a	0,65 cd	0,01 a	0,03	- 0,02 ab	5,43
4	0,13	- 0,75	0,45 a	0,30 abcd	0,36 a	0,23	- 0,09 a	4,43
5	0,18	- 0,50	0,66 a	0,28 abc	0,25 bc	0,06	0,03 b	5,71
6	0,31	- 0,63	0,76 a	0,19 ab	0,01 a	0,00	0,01 b	4,43
7	0,29	0,00	0,80 a	0,58 cd	0,04 a	0,04	- 0,04 ab	5,86
8	0,40	- 0,38	0,94 ab	0,00 a	- 0,41 a	- 0,05	- 0,43 a	3,71
9	0,74	0,13	1,00 ab	0,15 ab	0,10 ab	0,05	- 0,02 ab	6,86
Testigo	0,61	0,13	1,51 b	0,03 a	0,09 ab	0,05	- 0,01 ab	7,14

*Variables sin transformar. Letras indican diferencias significativas ($p\leq 0,05$) para la variable transformada a rangos.

4.2.3 Evaluación de los síntomas internos

Respecto a la variable síntomas internos medidos en la decoloración del corno, el análisis de los resultados detectó diferencias significativas ($p<0,0001$); plantas inoculadas con los aislamientos *FOC 4*, *FOC 8*, *FOC 1*, *FOC 3*, *FOC 7*, *FOC 2* y *FOC 5* presentaron síntomas internos más severos; mientras que en plantas inoculadas con el aislamiento *FOC 6* los síntomas fueron menos severos.

Para las variables peso radical, peso foliar y peso total de la planta al final del ensayo, los resultados registraron diferencias significativas ($p<0,0001$). Plantas inoculadas con los

aislamientos *FOC* 4, *FOC* 8, *FOC* 2 y *FOC* 6 presentaron un menor peso radical; mientras que plantas inoculadas con *FOC* 4, *FOC* 2, *FOC* 6, *FOC* 7, *FOC* 8 y *FOC* 3 tuvieron un menor peso foliar. Por otra parte plantas inoculadas con *FOC* 4, *FOC* 2, *FOC* 6 y *FOC* 8 presentaron un menor peso total en comparación con el testigo (Cuadro 7).

Cuadro 7. Efecto de los aislamientos de Fusarium oxysporum f. sp. cubense sobre la decoloración del cormo y el peso de las vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel

<i>FOC</i>	Decoloración cormo*	Peso radical (g)	Peso foliar* (g)	Peso planta (g)
4	5,25 c	2,36 a	3,16 a	5,53 a
8	5,25 c	2,56 a	4,51 ab	7,08 abc
1	5,13 c	4,66 bc	4,61 b	9,28 bc
3	5,13 cb	4,44 bc	4,59 ab	9,03 bc
7	5,00 cb	5,69 cd	4,15 ab	9,84 bc
2	4,88 cb	2,95 ab	3,18 a	6,13 a
5	4,63 cb	5,29 cd	6,21 b	11,50 c
6	4,00 b	3,44 ab	3,41 a	6,85 ab
9	1,00 a	8,69 e	10,95 d	19,64 d
Testigo	1,00 a	6,70 d	9,21 c	15,91 d

*Variables sin transformar. Letras indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para la variable transformada a rangos.

4.2.4 *Análisis de ranking*

En función de los rankings de todas las variables analizadas en las secciones anteriores, se realizó una síntesis (Cuadro 8) donde la suma de los rankings en positivo (mayor ranking mayor patogenicidad), se usó como un indicador global para la selección de los tres aislamientos más agresivos. Estos aislamientos fueron *FOC* 4, *FOC* 2 y *FOC* 8.

Cuadro 8. Ranking para las variables evaluadas en la prueba de patogenicidad

<i>FOC</i>	Incidencia	Amarillamiento	Marchitez	Índice crecim.	Decol. corno	Peso radical	Peso foliar	Peso planta	Suma
1	7	6	5	2	7	4	3	4	38
2	9	8	8	6	4	7	9	8	59
3	5	5	4	5	6	5	4	5	39
4	8	9	9	8	8	9	8	9	68
5	2	2	2	4	3	3	2	2	20
6	3	3	6	7	2	6	7	7	41
7	6	4	3	3	5	2	5	3	31
8	4	7	7	9	9	8	6	6	56
9	1	1	1	1	1	1	1	1	8

4.3 Bioensayo 2. Prueba de antibiosis sobre tres aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

El efecto de las bacterias endofíticas varió con cada aislamiento de *FOC* con el que la bacteria fue cocultivada en las variables crecimiento radial ($p < 0,0001$), peso fresco ($p = 0,0020$) y peso seco del hongo ($p < 0,0001$). Además de estas interacciones, el análisis de los resultados registró diferencias significativas para el factor bacteria endofítica y el factor *FOC* en las tres variables ($p < 0,0001$). Existieron 17 bacterias endofíticas que provocaron menor crecimiento radial de los aislamientos de *FOC* en comparación con el tratamiento testigo (sin bacteria endofítica) (Cuadro 9), de las cuales dos bacterias endofíticas (F6B25 y F1B9) mostraron un claro efecto de antibiosis sobre *FOC* con una reducción del 65% del crecimiento radial del hongo en comparación con el testigo que no fue cocultivado con las bacterias endofíticas (Figura 12, Figura 13).

Respecto a la variable peso fresco del hongo, 21 bacterias endofíticas produjeron un menor peso fresco en comparación con el tratamiento testigo, mientras que 16 bacterias endofíticas provocaron un menor peso seco del hongo en comparación con el testigo que no fue cocultivado con bacteria endofítica (Cuadro 9).

Cuadro 9. Efecto de 30 bacterias endofíticas sobre el crecimiento radial, peso fresco y peso seco de tres aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense a los 15 días de evaluación

Bacteria endofítica	Crecimiento radial*	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
F6B25	1,875 a	0,253 abcd	0,027 a
F1B9	1,917 a	0,274 bcd	0,036 bcd
F7B5	4,358 b	0,332 defg	0,041 defg
F7B9	4,417 b	0,346 defgh	0,038 cdef
F1P15	4,467 bc	0,276 bcd	0,040 cdef
F7B3	4,492 bc	0,315 def	0,047 defg
F2PA15	4,542 bcd	0,230 abc	0,029 ab
F7B13	4,700 cde	0,300 cdef	0,038 cdef
F3P2	4,775 def	0,266 abcd	0,027 a
F7B10	4,842 efg	0,208 a	0,029 ab
P52	4,917 efgh	0,371 fghi	0,048 fg
F7B6	5,008 fghi	0,226 abc	0,035 bcd
F7B14	5,025 fghij	0,289 cde	0,041 cdefg
F04	5,067 ghijk	0,421 hi	0,054 g
P58	5,117 hijkl	0,279 bcd	0,040 cdef
B23	5,125 hijkl	0,287 bcde	0,038 cdef
P8	5,133 hijkl	0,389 hi	0,049 g
B50	5,175 hijklm	0,300 def	0,047 efg
F025	5,217 ijklm	0,442 i	0,052 g
B37	5,233 ijklm	0,421 hi	0,046 defg
B21	5,250 ijklm	0,321 defg	0,040 cdefg
F7B15	5,267 ijklm	0,202 a	0,029 ab
F4B40	5,267 ijklm	0,281 bcd	0,033 abc
B31	5,283 jklm	0,354 defghi	0,046 defg
B62	5,292 klm	0,404 hi	0,047 defg
F9B62	5,317 klm	0,220 ab	0,034 abcd
F1B7	5,325 klm	0,358 efghi	0,051 g
B61	5,325 klm	0,366 fghi	0,046 defg
F6B5	5,333 lm	0,234 abc	0,034 abc
FO19	5,333 lm	0,258 abcd	0,037 bcde
Testigo=sin bacteria	5,433 m	0,395 hi	0,047 efg

*Datos tomados hacia el lado derecho del centro del disco de agar. Letras indican diferencias significativas ($p < 0,05$).

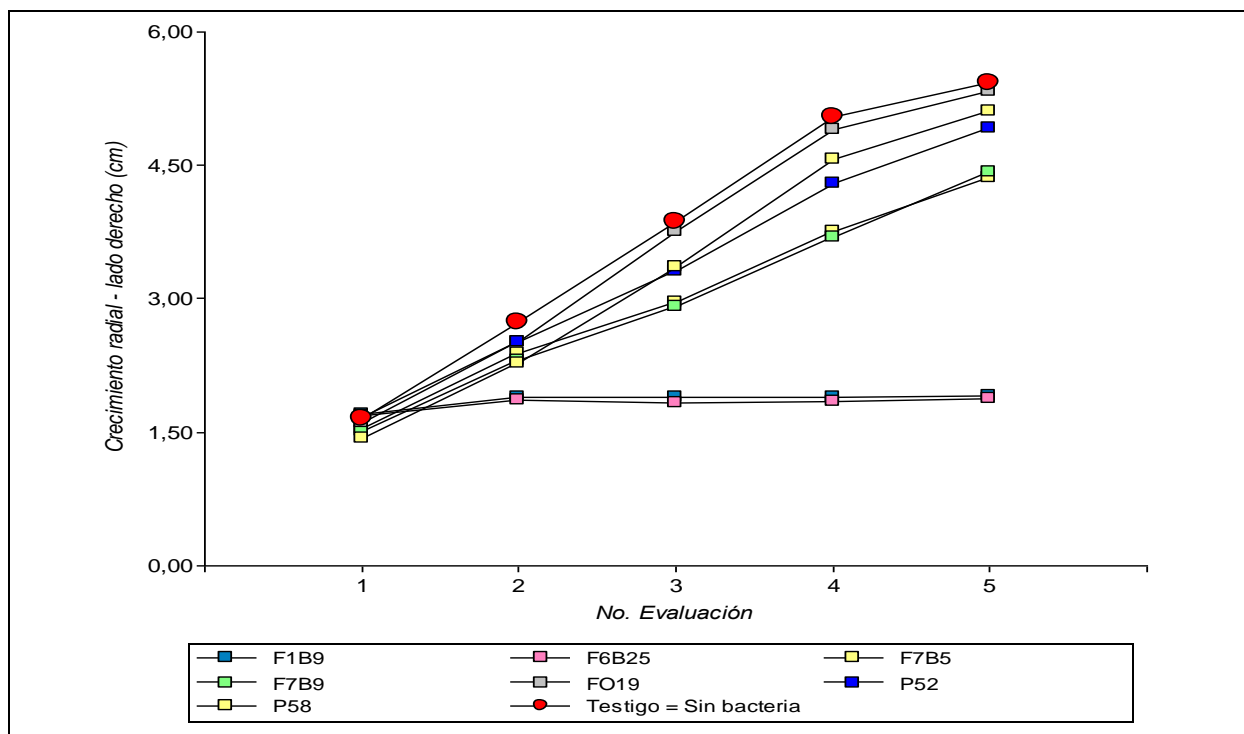


Figura 12. Efecto de bacterias endofíticas sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* en cinco evaluaciones.

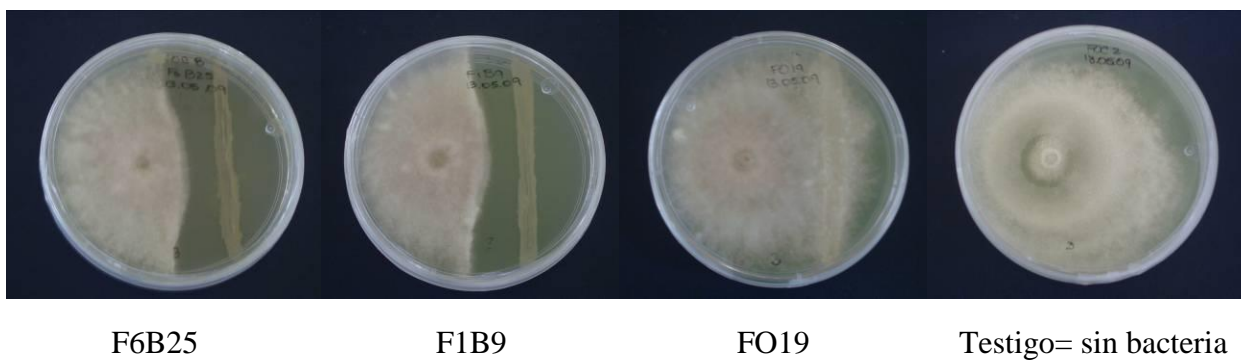


Figura 13. Bacterias endofíticas que mostraron un mayor efecto de antibiosis sobre tres aislamientos de *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* comparadas con el testigo y con una bacteria que no tuvo efecto de antibiosis.

La selección de las 10 bacterias endofíticas con un mayor efecto de antibiosis se realizó tomando como indicador la variable crecimiento radial del hongo, de las cuales cinco bacterias además de producir el menor crecimiento radial del hongo provocaron un menor peso fresco y seco del hongo. Las bacterias seleccionadas fueron F6B25, F1B9, F7B5, F7B9, F1P15, F7B3, F2PA15, F7B13, F3P2, F7B10, las cuales fueron utilizadas posteriormente en el ensayo de biocontrol en condiciones de invernadero.

4.4 Bioensayo 3. Prueba de biocontrol sobre tres aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

4.4.1 Incidencia y severidad de la enfermedad

El periodo de incubación fue igual en todos los tratamientos evaluados, los primeros síntomas externos, expresados en amarillamiento de hojas adultas, se presentaron cuatro semanas después de la inoculación con *FOC*. El periodo de desarrollo fue mayor en los tratamientos que recibieron inoculaciones previas con las bacterias endofíticas en comparación con los tratamientos que no las recibieron (testigos referenciales); las bacterias endofíticas retardaron el apareamiento de los síntomas externos en tres y hasta cuatro semanas. Plantas que no fueron inoculadas con bacterias endofíticas ni con los aislamientos de *FOC* (testigo absoluto) no presentaron síntomas de la enfermedad (Figura 14).

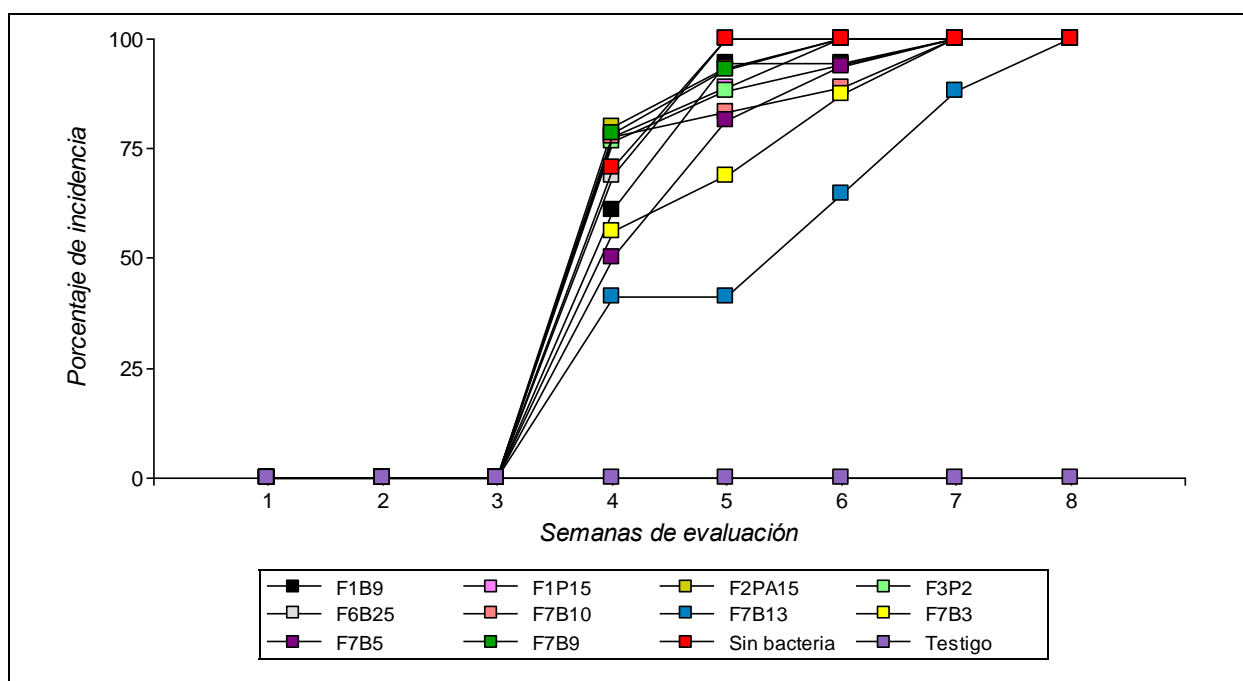


Figura 14. Incidencia del Mal de Panamá con tres aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel en ocho semanas de evaluación.

El análisis de los resultados detectó diferencias significativas de la incidencia de la enfermedad para la interacción bacteria endofítica \times *FOC* ($p=0,0002$), así como para el factor bacteria endofítica ($p<0,0001$). No se presentó diferencias significativas entre los aislamientos

de *FOC*. Las interacciones F7B13 - *FOC* 4; F7B13 - *FOC* 8; F7B5 - *FOC* 4; F7B3 - *FOC* 8 y F7B13 - *FOC* 2 presentaron menores porcentajes de incidencia en comparación con el resto de interacciones y los testigos referenciales (Cuadro 10).

Cuadro 10. Efecto de bacterias endofíticas sobre la incidencia del Mal de Panamá (Fusarium oxysporum f. sp. cubense) en ocho semanas de evaluación

Bacteria	FOC	% Incidencia
F7B10	8	100 a
F1P15	4	100 a
F7B9	2	97 ab
F2PA15	2	97 ab
Sin bacteria	8	97 ab
F3P2	4	97 ab
Sin bacteria	2	96 abc
F3P2	8	96 abc
F7B9	4	96 abc
F7B5	8	96 abc
F6B25	8	96 abc
F7B5	2	96 abc
F2PA15	8	95 abc
F1P15	8	93 abc
F6B25	2	93 abc
F1B9	8	93 abc
F6B25	4	92 abcd
F2PA15	4	92 abcd
F7B3	2	92 abcd
Sin bacteria	4	90 abcd
F1B9	2	90 abcd
F7B10	2	90 abcd
F7B9	8	87 abcde
F1B9	4	87 abcde
F7B3	4	87 abcde
F1P15	2	87 abcde
F3P2	2	83 bcde
F7B10	4	80 cdef
F7B13	2	76 defg
F7B3	8	68 efg
F7B5	4	67 fg
F7B13	8	67 fg
F7B13	4	60 g

Datos corresponden al promedio de cinco evaluaciones. Letras indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

Respecto a la severidad de los síntomas externos, expresados en amarillamiento y marchitez, los resultados del análisis detectaron diferencias significativas en la interacción

bacteria endofítica \times FOC ($p < 0,0001$), así como en los factores individuales ($p < 0,0001$). Doce interacciones presentaron los menores niveles de amarillamiento en comparación con las demás interacciones y los testigos referenciales; dentro de las cuales se destacan las bacterias F7B5, F7B3, F7B13, F1B9 y F3P2. En cuanto a la variable marchitez, todas las interacciones fueron similares a los testigos referenciales (Cuadro 11).

Cuadro 11. Efecto de bacterias endofíticas sobre la severidad del Mal de Panamá (Fusarium oxysporum f. sp. cubense) en ocho semanas de evaluación

Bacteria	FOC	Amarillamiento	Bacteria	FOC	Marchitez
F7B10	2	4,23 a	F7B10	8	3,67 a
F7B10	8	4,17 ab	F7B10	2	3,40 ab
F1B9	8	3,87 abc	F1B9	8	3,27 abc
F7B9	2	3,67 abcd	F7B5	8	2,96 bcd
F7B5	8	3,64 abcde	F7B9	2	2,77 bcde
F6B25	8	3,60 abcdef	F1P15	2	2,60 cdef
F1P15	4	3,57 bcdef	F6B25	8	2,60 cdef
Sin bacteria	8	3,43 cdefg	F1P15	4	2,57 def
F7B5	2	3,40 cdefgh	F2PA15	2	2,43 def
F2PA15	2	3,37 cdefgh	F7B13	8	2,33 defg
F1P15	2	3,27 cdefgh	F6B25	4	2,32 defgh
F1P15	8	3,20 defghi	F7B3	4	2,30 defgh
Sin bacteria	2	3,20 defghij	Sin bacteria	8	2,27 efghi
F6B25	4	3,12 defghijk	F7B5	2	2,20 efghij
F7B3	4	3,03 efghijk	F1P15	8	2,07 fghijk
F6B25	2	2,97 fghijk	Sin bacteria	2	2,04 fghijkl
F7B9	4	2,92 ghijkl	F6B25	2	2,00 fghijkl
F7B13	8	2,87 ghijkl	F3P2	2	2,00 fghijkl
F3P2	2	2,83 ghijklm	Sin bacteria	4	1,97 fghijkl
F2PA15	4	2,80 ghijklm	F7B9	4	1,92 fghijkl
Sin bacteria	4	2,77 hijklm	F2PA15	8	1,90 fghijkl
F2PA15	8	2,75 hijklmn	F7B13	2	1,88 fghijkl
F7B9	8	2,67 hijklmn	F7B9	8	1,87 fghijkl
F7B3	2	2,60 ijklmn	F7B10	4	1,73 ghijkl
F7B13	2	2,60 ijklmn	F3P2	4	1,67 hijkl
F7B10	4	2,57 jklmn	F2PA15	4	1,60 ijkl
F3P2	4	2,53 klmn	F3P2	8	1,60 ijkl
F3P2	8	2,52 klmn	F7B13	4	1,57 jkl
F1B9	2	2,30 lmn	F7B3	2	1,52 jkl
F1B9	4	2,30 lmn	F7B3	8	1,52 jkl
F7B13	4	2,23 mn	F1B9	4	1,50 kl
F7B3	8	2,20 mn	F7B5	4	1,47 kl
F7B5	4	2,13 n	F1B9	2	1,40 l

Datos corresponden al promedio de cinco evaluaciones. Letras indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

4.4.2 Variables de crecimiento

El efecto de las bacterias endofíticas sobre las variables de crecimiento no varió con cada aislamiento de *FOC* y tampoco entre los aislamientos de *FOC* evaluados. Los análisis de los resultados detectaron diferencias significativas para las variables número de hojas ($p=0,0191$), diámetro del pseudotallo ($p=0,0190$) y largo de la hoja ($p=0,0201$) en las diferentes bacterias evaluadas. No se presentaron diferencias significativas para las variables altura de planta, longitud del peciolo, ancho de la hoja e índice foliar. Existieron bacterias endofíticas que tuvieron un efecto significativo en ciertas variables de crecimiento, particularmente las bacterias F3P2 (número de hojas y diámetro del pseudotallo), F1B9 (diámetro del pseudotallo), F7B13 y F1P15 (largo de hoja) (Cuadro 12).

Cuadro 12 Efecto de bacterias endofíticas sobre el incremento de las variables de crecimiento de vitroplantas de banano en la prueba de biocontrol

Bacteria	Altura	No. Hojas	Diámetro pseudotallo	Longitud peciolo	Largo de hoja	Ancho de hoja	Índice foliar
F1B9	1,36	0,22 ab	4,32 c	0,24	0,27 abc	0,17	- 0,05
F3P2	1,31	1,94 c	4,22 c	0,33	0,16 ab	0,08	- 0,01
F7B5	1,16	- 0,06 ab	2,71 a	0,24	0,20 a	0,14	- 0,06
F2PA15	1,08	0,40 bc	3,25 abc	0,33	0,56 bcd	0,14	0,03
F7B9	0,75	0,21 ab	3,61 bc	0,25	0,30 abc	0,24	- 0,08
F7B3	0,94	0,19 ab	2,82 ab	0,44	0,35 abc	0,09	0,02
F6B25	1,01	- 0,25 ab	2,41 abc	0,15	0,23 ab	0,24	- 0,10
F7B13	0,83	0,24 ab	2,94 ab	0,25	0,61 d	0,11	0,05
F1P15	0,82	- 0,61 a	3,09 ab	0,41	0,75 cd	0,25	- 0,01
F7B10	0,52	- 0,76 ab	3,09 abc	0,40	0,24 abc	0,14	- 0,04
Testigo (Sin bacteria)	1,44	- 0,35 ab	72,97 ab	0,38	0,27 abc	0,07	0,01

Variables sin transformar. Letras indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para la variable transformada a rangos.

4.4.3 Evaluación de los síntomas internos

Para la variable síntomas internos medidos en la decoloración del cormo se presentaron diferencias significativas para el factor bacteria ($p=0,0077$); no se presentaron diferencias significativas para la interacción bacteria \times *FOC*, ni para los aislamientos de *FOC*. Las

bacterias endofíticas F2PA15, F3P2, F6B25, F7B13, F7B5, F7B3 y F1P15 presentaron menores niveles de decoloración (Cuadro 13).

Por otra parte, los resultados registraron diferencias significativas para las variables peso foliar ($p=0,0204$), peso radical ($p=0,0058$) y peso total de la planta ($p=0,0048$) para el factor bacteria endofítica. No se presentaron diferencias significativas para la interacción bacteria endofítica \times FOC ni para el factor FOC. Plantas infectadas con FOC y que fueron inoculadas con las bacterias F3P2, F1B9, F2PA15 y F7B13 demostraron un mayor peso radical. Las bacterias F3P2, F1B9, F6B25 y F7B9 fueron más efectivas en presentar un mayor peso foliar; mientras que las bacterias F3P2 y F1B9 presentaron un mayor peso total de planta en comparación con el resto de bacterias y con los tratamientos que no fueron protegidos con bacterias endofíticas (Cuadro 13).

Cuadro 13. Efecto de las bacterias endofíticas sobre el peso y decoloración del cormo de vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel en la prueba de biocontrol

Bacteria	Decoloración del cormo*		Peso radical (g)		Peso foliar (g)		Peso planta (g)	
F2PA15	1,93	a	21,44	abc	7,87	ab	29,31	ab
F3P2	2,06	a	27,36	c	10,58	c	37,94	c
F6B25	2,06	a	20,35	ab	8,86	abc	29,21	ab
F7B13	2,18	a	21,03	abc	7,50	ab	28,53	ab
F7B5	2,19	a	18,35	a	7,40	ab	25,74	a
F7B3	2,22	a	20,30	ab	7,42	ab	27,73	ab
F1P15	2,33	a	17,05	a	6,69	a	23,74	a
F1B9	2,56	ab	26,24	bc	9,33	bc	35,57	bc
Sin bacteria	2,63	ab	20,87	ab	8,25	ab	29,12	ab
F7B9	2,80	ab	19,68	ab	8,75	abc	28,43	ab
F7B10	3,44	b	17,17	a	6,24	a	23,42	a

*Variable sin transformar. Letras indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para la variable transformada a rangos.

5 DISCUSIÓN

5.1 Bioensayo 1. Prueba de patogenicidad

Ocho de los nueve aislamientos de *FOC* evaluados infectaron las plantas de banano y provocaron la enfermedad Mal de Panamá. Consecuentemente se puede afirmar que el aislamiento *FOC* 9 que no fue capaz de desarrollar la enfermedad no corresponde a la forma especial cubense de *Fusarium*, sino a una cepa no patogénica de *Fusarium oxysporum*; por tanto a partir de esta sección este aislamiento será mencionado como *FO* 9. Es importante destacar que el periodo de incubación de los aislamientos fue muy similar y los primeros síntomas externos, expresados en amarillamiento de las hojas adultas, se presentaron a partir de la cuarta semana después de la inoculación del patógeno. Resultados similares fueron encontrados por Cárdenas (2001), quien realizó pruebas de patogenicidad en tres cultivares; Gros Michel, FHIA 03 y Gran Enano y reportó síntomas causados por *FOC*, raza 1, cuatro semanas después de las inoculaciones con el patógeno. De igual forma, Sivamani y Gnanamanickam (1988) encontraron síntomas causados por las razas 1 y 4 de *FOC* en plantas de *Musa Balbisiana* después de 3 y 4 semanas de la inoculación del patógeno. Mientras que Stover y Waite (1960) registraron plantas del cultivar Bluggoe con síntomas del Mal de Panamá después de 50 días de haberlas inoculado con aislamientos de *FOC*, raza 2. Saravanan *et al.* (2007) documentaron síntomas en plantas del cultivar Rasthali luego de tres meses de realizadas las inoculaciones con la raza 1 de *FOC*.

En la presente investigación, la severidad de los síntomas externos e internos varió con cada aislamiento de *FOC*. Los aislamientos *FOC* 4 y *FOC* 2 resultaron ser más patogénicos en producir síntomas externos, mientras que con excepción del aislamiento *FOC* 6, todos los aislamientos fueron severos en ocasionar síntomas internos. Trabajos realizados por Stover (1959), quien realizó los primeros estudios de patogenicidad con aislamientos provenientes de plantas de banano del cultivar Gros Michel, demostraron variabilidad en la patogenicidad de aislamientos de *FOC*. Resultados similares fueron encontrados por Saravanan *et al.* (2007), quienes registraron diferencias en la patogenicidad de cinco aislamientos de *FOC* raza 1 en el cultivar Rasthali.

Con respecto al efecto de los aislamientos de *FOC* sobre el crecimiento de las plantas se detectó una relación entre el efecto del hongo y el crecimiento de la planta; plantas enfermas presentaron menores índices de crecimiento global en comparación con plantas que no fueron inoculadas con el hongo (testigo). Los aislamientos *FOC* 2 y *FOC* 4, que presentaron mayor severidad de síntomas, registraron un menor peso total de la planta. Resultados similares fueron encontrados por Sivamani y Gnanamanickam (1988), quienes documentaron menor altura de plantas de *Musa Balbisiana* inoculadas con *FOC* en comparación con plantas testigo, que no fueron inoculadas con el patógeno.

El aislamiento *FO* 9 no produjo síntomas externos e internos de la enfermedad y además ocasionó un mayor peso total de la planta en comparación con plantas testigo, lo cual sugiere la presencia de un aislamiento no patogénico y posiblemente con un potencial de biocontrol y promoción de crecimiento (Lara *et al.* 2009). Nel *et al.* (2006a) documentaron que plantas de banano son hospedantes de un amplio número de hongos endofíticos, dentro de los cuales *Fusarium oxysporum* no patogénico, ha sido identificado como una especie dominante estableciendo relaciones con plantas de banano como biocontroladores de *FOC* y nematodos (Paparú *et al.* 2008, Nel *et al.* 2006b), así como promotores del crecimiento de las plantas (Tarig *et al.* 1998). Por otra parte, Burgess *et al.* (1994) y Summerell *et al.* (2003) encontraron que poblaciones saprofíticas de *Fusarium* son usualmente colonizadores secundarios de plantas enfermas, particularmente de raíces; Stover (1959) y Fravel (2003) demostraron que morfológicamente los aislamientos patogénicos son indistinguibles de los no patogénicos; lo cual concuerda con los resultados de esta investigación, donde se encontró similitud morfológica del aislamiento no patogénico (*FO* 9) con el resto de aislamientos de *FOC* que resultaron patogénicos.

5.2 Bioensayo 2. Prueba de antibiosis sobre tres aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense

Estudios *in vitro* realizados por Ayyadurai *et al.* (2006) documentaron el potencial de antibiosis de la cepa FP10 de *Pseudomonas aeruginosa* sobre varios hongos que causan la marchitez y necrosis en plantas de banano. Los autores registraron la capacidad de esta bacteria para producir el antibiótico 2,4 diacetilpologlucinol (DAPG) que provocó la deformación y lisis del micelio de *FOC* en análisis realizados bajo microscopio electrónico.

Sivamani y Gnanamanickam (1988) al evaluar el potencial de antibiosis de una cepa nativa de *Pseudomonas fluorescens* sobre las razas 1 y 4 de *FOC* encontraron que bajo condiciones *in vitro* esta cepa inhibía el patógeno. De igual manera, Mohandas *et al.* (2004) demostraron un claro efecto inhibitorio de *Pseudomonas fluorescens* sobre *FOC*. Por el contrario Nel *et al.* (2006b) evaluaron *in vitro* aislamientos de *Pseudomonas fluorescens* y formulaciones comerciales de *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. sobre la raza 4 de *FOC* y encontraron que ninguna de las bacterias mostró una visible inhibición de *FOC* después de 6 días. Los resultados de la presente investigación demostraron interacción entre las bacterias endofíticas y los aislamientos de *FOC*, existieron bacterias que fueron eficientes en la inhibición del crecimiento de los tres aislamientos de *FOC* evaluados, mientras que otras fueron eficientes sobre dos y un aislamiento de *FOC*. A nivel general 17 bacterias endofíticas inhibieron el crecimiento radial de *FOC* y particularmente las bacterias F6B25 y F1B9 presentaron un claro efecto de antibiosis con una reducción del 65% del crecimiento radial del hongo en comparación con el testigo que no fue cocultivado con las bacterias endofíticas.

5.3 Bioensayo 3. Prueba de biocontrol sobre tres aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

El potencial de bacterias y hongos endofíticos como agentes de biocontrol de hongos fitopatógenos del suelo así como organismos promotores del crecimiento de plantas de banano ha sido demostrado en varias investigaciones (Pocasangre 2000, Cao *et al.* 2004, Ting *et al.* 2008). Silva *et al.* (2007) encontraron una reducción de la infección de *FOC* y daños causados en plantas del cultivar Maca previamente inoculadas con el hongo micorrízico arbuscular *Gigaspora margarita*; una dosis de 3 g por planta de este hongo tuvo un efecto significativo sobre una concentración de *FOC* de 10^3 conidios/ml reduciendo de 43 a 7% el índice de la enfermedad. Asimismo, Peng *et al.* (1999) encontraron que suelos supresivos con altos contenidos de actinomicetos y bacterias redujeron la germinación de clamidiosporas de *FOC* en un $41 \pm 4\%$ y más de la mitad de la severidad del Mal de Panamá en plantas de banano del cultivar Cavendish comparado con suelos conducibles o conductivos con alto contenido de hongos filamentosos y levaduras. Por otro lado, trabajos realizados por Pérez (2006) demostraron que inoculaciones de *Trichoderma harzianum* (A34) siete días antes de la inoculación de *FOC* presentaron un 0% de plantas infectadas a nivel de invernadero y en

plantaciones comerciales de los cultivares Burro Cemsa, FHIA 03 y FHIA 23, *T. harzianum* a razón de 20 g/planta con 8×10^9 conidios/g produjo menos del 1% de plantas afectadas en comparación con plantas sin inoculación de *T. harzianum* (100%) y plantas inoculadas con *T. harzianum* en el mismo día de la inoculación del patógeno (40%).

Los resultados de la presente investigación registraron que la bacteria F7B13 retardó la aparición de los síntomas externos en más de tres semanas en comparación con los otros tratamientos. Esto sugiere que la presencia de esta bacteria endofítica pudo haber influido en alguna forma sobre la población del patógeno. Ting *et al.* (2008) encontraron que bacterias endofíticas del género *Serratia* (UPM31P1) y cepas de hongos no patogénicos de la especie *Fusarium oxysporum* (UPM39B3) pre inoculados en plantas de banano del cultivar Cavendish prolongaron la supervivencia y muerte de las plantas causada por *FOC* RT4; los autores registraron que hasta la finalización del ensayo las plantas no colapsaron y permanecieron en las respectivas macetas, mientras que las plantas inoculadas con *FOC* murieron una semana antes. Asimismo, Weber *et al.* (2007) encontraron que bacterias del tipo *Burkholderia* sp. y *Herbaspirillum* redujeron el número de ufc de *FOC* tanto en raíces como en rizomas de plantas del cultivar Maca y además demostraron que plantas inoculadas con una cepa de *Burkholderia* sp. (AB202) presentaron un mayor porcentaje de sobrevivencia, concluyendo que la colonización de las bacterias endofíticas redujo la severidad de la enfermedad.

Por otro lado, Ayyadurai *et al.* (2006) documentaron el potencial de biocontrol de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (cepa FP10) sobre *FOC* en plantas de banano del cultivar Nendram (*Musa* AAA). Plantas tratadas con esta bacteria presentaron una menor decoloración del cormo, 24,49% frente a 98,76% presentada en plantas tratadas con *FOC* y sin bacteria. Thangavelu *et al.* (2003) encontraron que un elevado contenido de compuestos fenólicos producido por *Pseudomonas fluorescens* puede contribuir a la protección de las plantas de banano contra *FOC*. Adicionalmente, Mohandas *et al.* (2004) demostraron que la precolonización con *P. fluorescens* redujo la colonización de *FOC* en un 72% y además encontraron gran cantidad de depósitos de estructuras inusuales en los sitios de entrada del patógeno como mecanismo de defensa para prevenir la propagación del patógeno. En esta investigación existieron bacterias endofíticas que provocaron una menor severidad en el amarillamiento de las plantas (F7B5, F7B3, F7B13, F1B9 y F3P2) así como en la decoloración del cormo (F2PA15, F3P2, F6B25, F7B13, F7B5, F7B3 y F1P15). Esto

posiblemente se deba a la presencia de uno o varios mecanismos de control que pueden estar involucrados en estas bacterias. Trabajos sobre control biológico de *FOC* realizados por Sivamani y Gnanamanickam (1988), demostraron que *Pseudomonas fluorescens* confiere una protección a las plantas de *Musa balbisiana* contra las razas 1 y 4 de *FOC*; las plantas presentaron una mínima decoloración en las raíces y en el cormo en comparación con las plantas no tratadas donde la decoloración de rizoma y raíces fue severa. Los autores además registraron un mayor desarrollo radical y crecimiento, particularmente en altura de plantas tratadas con esta bacteria en comparación con las que fueron inoculadas solamente con *FOC*; así como en plantas inoculadas sólo con la bacteria en comparación con el testigo absoluto.

En la presente investigación varios parámetros del crecimiento de las plantas estuvieron favorecidos por las bacterias endofíticas F3P2, F1B9, F2PA15, F7B13 y F1P15, lo cual podría atribuirse a un potencial para promover el crecimiento de plantas de banano. Estudios realizados por Weber *et al.* (2007) demostraron que cepas de bacterias diazotróficas particularmente *Bukholderia* sp. (AB202) y *Herbaspirillum* (BA234) indujeron incrementos en la biomasa de plantas del cultivar Maca inoculadas con *FOC* luego de cuatro y dos meses de cultivo respectivamente. Ayyadurai *et al.* (2006) documentaron el potencial de promoción del crecimiento de la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* (cepa FP10) en plantas de banano del cultivar Nendram (*Musa* AAA) que fueron inoculadas con *FOC*. Los autores demostraron que este potencial se debió a la producción de la hormona de crecimiento ácido -3- indol acético, sideróforos y la enzima fosfatasa los cuales están involucrados en el potencial de promoción del crecimiento; plantas tratadas con esta bacteria presentaron una mayor altura (30,69 cm) en comparación con plantas tratadas con *FOC* y sin la bacteria (21,81 cm). Por otro lado, investigaciones realizadas por Silva *et al.* (2007) demostraron que plantas inoculadas con *Gigaspora margarita* presentaron una mayor acumulación de materia seca de la parte aérea de la planta mientras que hubo una reducción de ésta en plantas inoculadas solamente con *FOC*.

6 CONCLUSIONES

6.1 Prueba de patogenicidad

- Ocho de los nueve aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* evaluados fueron capaces de infectar las vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel y producir los síntomas característicos de la enfermedad Mal de Panamá.
- El periodo de incubación fue muy similar para los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*; los primeros síntomas externos aparecieron a las cuatro semanas después de las inoculaciones con el patógeno.
- El periodo de desarrollo donde la enfermedad logró la incidencia total fue a las seis semanas después de las inoculaciones con *FOC*.
- El análisis de ranking de todas variables evaluadas detectó que los aislamientos *FOC* 4, *FOC* 2 y *FOC* 8 fueron los más patogénicos, mientras que el aislamiento *FOC* 5 fue el menos patogénico.
- El aislamiento *FO* 9 no fue patogénico y provocó un mayor crecimiento y desarrollo de las plantas en comparación con el testigo absoluto. Este aislamiento posiblemente sea una cepa no patogénica de *Fusarium* que podría tener un potencial de biocontrol y promoción del crecimiento.
- Con excepción de *FO* 9, los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* afectaron el crecimiento y desarrollo de las plantas en comparación con el testigo absoluto que no fue inoculado con el patógeno.

6.2 Prueba de antibiosis

- Diecisiete de las bacterias endofíticas evaluadas provocaron la inhibición del crecimiento radial de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en comparación con el testigo que no fue cocultivado con las bacterias endofíticas.

- Las bacterias endofíticas F6B25 y F1B9 redujeron en un 65% el crecimiento radial de *FOC* en comparación con el testigo que no fue cocultivado con las bacterias endofíticas.
- Veintiún bacterias produjeron un menor peso fresco y dieciséis un menor peso seco en comparación con el testigo.
- Las bacterias endofíticas F6B25, F1B9, F7B5, F7B9, F1P15, F7B3, F2PA15, F7B13, F3P2, F7B10 presentaron el mayor efecto de antibiosis y fueron seleccionadas para evaluarlas a nivel de invernadero.

6.3 Prueba de biocontrol

- El periodo de incubación fue muy similar para los tratamientos evaluados; los primeros síntomas externos aparecieron a las cuatro semanas después de las inoculaciones con *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.
- El periodo de desarrollo donde la enfermedad logró la incidencia total fue a las ocho semanas después de las inoculaciones con *FOC*.
- La bacteria endofítica F7B13 retardó la aparición de los síntomas externos ocasionados por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en más de tres semanas en comparación con los otros tratamientos
- Las bacterias F7B5, F7B3, F7B13, F1B9 y F3P2 produjeron menores niveles de amarillamiento en comparación con los demás tratamientos.
- La bacteria F3P2 tuvo un efecto positivo en las variables número de hojas y diámetro del pseudotallo; F1B9 en el diámetro del pseudotallo; F7B13 y F1P15 en el largo de hoja; F3P2, F1B9, F6B25 y F7B9 en el peso foliar; F3P2, F1B9, F2PA15 y F7B13 en el peso radical y F3P2 y F1B9 en el peso total de planta.

7 RECOMENDACIONES

- Evaluar el efecto de inoculaciones periódicas de bacterias endofíticas para determinar si aplicaciones frecuentes pueden potenciar la actividad de biocontrol de las bacterias sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* o mantener en largo término el efecto del control biológico
- Establecer ensayos *in vitro* e *in vivo* para evaluar combinaciones de las mejores bacterias y la compatibilidad entre estas y así determinar si aplicaciones múltiples podrían dar mejores resultados que aplicarlas individualmente.
- Realizar estudios para establecer los mecanismos a través de los cuales las bacterias endofíticas evaluadas confieren el biocontrol contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.
- Implementar ensayos de biocontrol para comprobar el potencial antagonista del aislamiento no patogénico (FO 9) sobre la enfermedad así como su potencial de promoción del crecimiento de plantas de banano.
- Realizar análisis moleculares para confirmar que el aislamiento FO 9 no pertenece a la forma especial cubense de *Fusarium oxysporum*.
- Se recomienda la bacteria F7B13 para evaluarla en más investigaciones relacionadas con el biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* a nivel de campo.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Ayyadurai, N.; Ravindra N., P.; Sreehari R., M.; Sunish K., R.; Samrat, S.K.; Manohar, M.; Sakthivel, N. 2006. Isolation and characterization of a novel banana rhizosphere bacterium as fungal antagonist and microbial adjuvant in micropropagation of banana. *Journal of Applied Microbiology* 100(5): 926-937.
- Bancroft, J. 1876. Report of board appointed to enquire into the cause of disease affecting livestock and plants. Queensland, 1876. Votes and proceedings 1877: 1011-1138
- Berg, G.; Hallmann, J. 2006. Control of Plant Pathogenic Fungi with Bacterial Endophytes. *In* Microbial Root Endophytes. 2006. Eds. B. Schulz; C. Boyle; T. Sieber. Germany. Springer. 367 p.
- Brandes, E.W. 1919. Banana wilt. *Phytopathology* 9:339-389.
- Burgess, L.W.; Summerell, B.A.; Bullock, S.; Gott, K.P.; Backhouse, D. 1994. Laboratory Manual for *Fusarium* Research. 3 ed. Sydney, University of Sidney. 133 p.
- Cao, L.; Qiu, Z.; Dai, X.; Tan, H.; Lin, Y.; Zhou, S. 2004. Isolation of endophytic actinomycetes from roots and leaves of banana (*Musa acuminata*) plants and their activities against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 20(5):501-504.
- Cárdenas, J. 2001. Selección de vitroplantas provenientes de microsecciones de banana de la variedad Gros Michel (AAA) resistentes a la raza 1 del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*). Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 107 p.
- Davis, R. 2005. *Fusarium* wilt (Panama disease) of banana. Plant Protection Service Secretariat of the Pacific Community. Pest Advisory Leaflet no. 42. 4 p.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.A.; Tablada, M.; Robledo, C.W. 2009. InfoStat, versión 2009, Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Dita, M.A.; Waalwijk, C.; Souza Junior, M.T.; Kema, G.H.J. 2009. Generando conocimientos y herramientas para el control de la raza 4 tropical de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *In* Reunión de grupos de interés sobre los riesgos de la raza tropical 4 de *Fusarium*, BBTV y otras plagas de musáceas para la región del OIRSA, América latina y El Caribe (2009, San Salvador, El Salvador). 2009. Resúmenes. Bioersivity. 71 p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación). 2004. La economía mundial del banano. Eds. P. Arias; C. Dankers; P. Liu; P. Pilkauskas. Roma. 95 p.
- FAOSTAT. 2009. Agricultura. Superficie, producción y rendimiento (en línea). Consultado 21 oct. 2009. Disponible en www.fao.org.

- Fernández-Larrea, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas no. 62:96-100.
- Forysth, L.M.; Smith, L.J.; Aitken, A.B. 2006. Identification and characterization of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* capable of increasing and decreasing Fusarium wilt severity. Mycological Research IIO: 929-935.
- Fravel, D.; Olivian, C.; Alabouvette, C. 2003. *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. New Phytologist 157: 493-502.
- Gheta, K.; Vikineswary, S. 2002. Antagonistic effects of *Streptomyces violaceusniger* strain G10 on *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 4: Indirect evidence for the role of antibiosis in the antagonistic process. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 28(6):303-320.
- Getha, K.; Vikineswary, S.; Wong, W.H.; Seki, T.; Ward, A.; Goodfellow, M. 2005. Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology 32:24-32.
- Hinz, R.H.; Silva, C.M.; Pereira, A.; Tcacenco, F.A. 2009. Análise da diversidade genética de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* no estado de Santa Catarina - Brasil. In Reunión de grupos de interés sobre los riesgos de la raza tropical 4 de Fusarium, BBTV y otras plagas de musáceas para la región del OIRSA, América latina y El Caribe (2009, San Salvador, El Salvador). 2009. Resúmenes. Bioversity.71 p.
- Hwang, C.S. 1999. Recent development on fusarium R&D of banana in Taiwan. In Banana fusarium wilt management: Towards sustainable cultivation. (1999, Malaysia). 2001. Proceedings of the International workshop on the banana fusarium wilt disease. Eds. A.B. Molina; N.H. Nik Masdek; K.W. Liew. Los Baños, Laguna, Philipines, INIBAP. 305 p.
- Hwang, C.S.; Ko, H.W. 2004. Cavendish Banana Cultivars Resistant to Fusarium Wilt Acquired Through Somaclonal Variation in Taiwan. Plant disease 88(6):580-588.
- Jha, B.K.; Grandhi Pragash, M.; Cletus, J.; Raman, G.; Sakthivel, N. 2009. Simultaneous phosphate solubilization potential and antifungal activity of new fluorescent pseudomonad strains, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. plecoglossicida* and *P. mosselii*. World Journal of Microbiology & Biotechnology 25(4):573-581.
- Kidane, G.; Laing, M. 2008. Integrated control of Fusarium wilt of banana. Production. 121 p.
- Kloepper, J.W.; Choong-Min Ryu; Zhang, S. 2004. Induced Systemic Resistance and Promotion of Plant Growth by *Bacillus* spp. Phytopathology 94(11):1259-1266.

- Lara, D.F.; Pocasangre, L.E.; Casanoves, F.; Aguilar, M.A.; Avelino, J.; Elango, F. 2009. Estudios de patogenicidad de aislamientos de raza 1 de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense en Costa Rica. In Reunión de grupos de interés sobre los riesgos de la raza tropical 4 de *Fusarium*, BBTV y otras plagas de musáceas para la región del OIRSA, América latina y El Caribe (2009, San Salvador, El Salvador). 2009. Resúmenes. Bioversity.71 p.
- Leslie, J.F.; Summerell., B.A. 2006. The *Fusarium* Laboratory Manual. USA. Blackwell Publishing. 388 p.
- Martínez, G.; Delgado, E.; Pargas, R.; Manzanilla, E.; Ramírez, H. 2007. Consideraciones generales sobre la producción y el comercio mundial de banano. II: Exportaciones y perspectivas de la oferta y demanda mundial (en línea). CENIAP HOY no. 14:1-10. Consultado 05 abr 2009. Disponible en <http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasTecnicas/ceniaphoy/index.htm>
- Matsumoto, K.; Barbosa, M.L.; Copati Souza, L.A.; Teixeira, J.B. 1999. *In vitro* selection for *Fusarium* wilt resistance in banana. II. Resistance to culture filtrate of race 1 *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense. *Fruits* 54(3):151-157.
- McDonald, B.A.; Linde, C. 2002. Pathogen Population Genetics, Evolutionary Potential, and Durable Resistance. *Annual Review Phytopathology* 40:349–379.
- Meusinger, A. 2008. Screening of endophytic bacteria for biological control of the burrowing nematode *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. *Sin publicar*.
- Mohandas, S.; Manamohan, M.; Rawal, R.D.; Chakraborty, S.; Sreekantappa, H.; Manjula, R.; Lakshmikantha, H.C. 2004. Interaction of *Fusarium oxysporum* f.sp. cubense with *Pseudomonas fluorescens* precolonized to banana roots. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* (20):651-655.
- Molina, A. 2009. Estado de la incidencia en Asia del marchitamiento por raza tropical 4 de *Fusarium* en el cultivo de banano. In Reunión de grupos de interés sobre los riesgos de la raza tropical 4 de *Fusarium*, BBTV y otras plagas de musáceas para la región del OIRSA, América latina y El Caribe (2009, San Salvador, El Salvador). 2009. Resúmenes. Bioversity.71 p.
- Moore, N.Y.; Bentley., S.; Peeg, K.G.; Jones, D.R. 1995. Marchitamiento del banano ocasionado por *Fusarium*. Hoja Divulgativa No. 5. Montpellier, Francia, INIBAP (Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano) 4 p.
- Moore, N.Y.; Pegg, K.G.; Smith, L.J.; Langdon, P.W.; Bentley, S.; Smith, M.K. 1999. *Fusarium* wilt of banana in Australia. In *Banana fusarium wilt management: Towards sustainable cultivation*. (1999, Malaysia). 2001. Proceedings of the International workshop on the banana fusarium wilt disease. Eds. A.B. Molina; N.H. Nik Masdek; K.W. Liew. Los Baños, Laguna, Philipines, INIBAP. 305 p.

- Morpurgo, R.; Lopato, S.V.; Azfa, R.; Novak, F.J. 1994. Selection parameters for resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1 and race 4 on diploid banana (*Musa acuminata* Colla). *Euphytica* 75: 121-129.
- Naik, P.R.; Sahoo, N.; Goswami, D.; Ayyadurai, N.; Sakthivel, N. 2008. Genetic and Functional Diversity among Fluorescent Pseudomonads Isolated from the Rhizosphere of Banana. *Microbial Ecology* 56(3):492-504.
- Nel, B. 2005. Management of Fusarium wilt of banana by means of biological and chemical control and induced resistance. Tesis Mag. Sc. Petroria, Sur África, University of Petroria. 68 p.
- Nel, B.; Steinberg, C.; Labuschagne, N.; Viljoen, A. 2006a. Isolation and characterization of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* isolates from the rhizosphere of healthy banana plants. *Plant Pathology* 55:207-216.
- Nel, B.; Steinberg, C.; Labuschagne, N.; Viljoen, A. 2006b. The potential of nonpathogenic *Fusarium oxysporum* and other biological control organisms for suppressing fusarium wilt of banana. *Plant Pathology* 55:217-223.
- Nelson, P.E. 1981. Life cycle and epidemiology of *Fusarium oxysporum*. In *Fungal wilt disease of plants*. 1981. Eds. Mace, M.E.; Bell, A.A.; Beckman, C.H. Academic Press, New York, United States. p. 51-80.
- Nelson, P.E. 1990. Taxonomy of Fungi in the Genus *Fusarium* with emphasis on *Fusarium oxysporum*. In *Fusarium wilt of banana*. Ed. Ploetz, R.C. Minnesota, United States. The American Phytopathological Society. 140 p.
- Núñez P., C. 2006. Estudio de poblaciones de bacterias endofíticas de la rizosfera del banano para el biocontrol del nematodo barrenador *Radopholus similis*. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 62 p.
- Orjeda, G. 1998. Evaluation of Musa germplasm for resistance to Sigatoka diseases and Fusarium wilt. Montpellier, Francia. INIBAP (International Network for Improvement of Banana and Plantain). p. 19-29.
- Orozco Santos, M.; García Mariscal, K.; Vázquez Jiménez, J.L. 2009. Estado actual del Mal de Panamá en Musáceas en México. In *Reunión de grupos de interés sobre los riesgos de la raza tropical 4 de Fusarium, BBTV y otras plagas de musáceas para la región del OIRSA, América Latina y El Caribe (2009, San Salvador, El Salvador)*. 2009. Resúmenes. Bioversity. 71 p.
- Paparu, P.; Dubois, T.; Gold, C.S.; Niere, B.; Adipala, E.; Coyne, D. 2008. Greenhouse and Field Persistence of Nonpathogenic Endophytic *Fusarium oxysporum* in Musa Tissue Culture Plants. *Microbial Ecology* 55(3):561-568.
- Peng, H.X.; Sivasithamparam, K.; Turner, D.W. 1999. Chlamyospore germination and Fusarium wilt of banana plantlets in suppressive and conducive soils are affected physical and chemical factors. *Soil Biology and Biochemistry* 31(10):1363-1374.

- Pérez, L. 2004. Fusarium Wilt (Panama disease) of bananas: An Updating Review of the Current Knowledge in the disease and its Causal Agent. *In XVI REUNIÓN INTERNACIONAL ACORBAT* (16, 2004, Oaxaca, México). 2004. Memorias. Eds. M. Orozco; J. Orozco; M. Robles; J. Velázquez; V. Medina; J.A. Hernández. 312 p.
- Pérez, L. 2006. Status of Banana Fusarium Wilt R&D in Cuba (diapositivas). Kuala, Malaysia. 20 diapositivas.
- Pérez, L.; Battle, A.; Fonseca, J. 2003. *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* en Cuba: biología de las poblaciones, reacción de los clones híbridos de la FHIA y biocontrol. *In Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras enfermedades asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos* (2003, Guayaquil, Ecuador). 2004. Actas. Eds. G. Rivas; F. Rosales. Montpellier, Francia. INIBAP (Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y Plátano).192 p.
- Ploetz, R.C. 1990. Population biology of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. *In Fusarium wilt of banana*. 1990. Ed. Ploetz, R.C. Minnesota, United States. The American Phytopathological Society. 140 p.
- Ploetz, R.C. 1994a. Panama disease: return of the first banana menace. *International journal of pest management* 40(4):326-336.
- Ploetz, R.C. 1994b. Fusarium Wilt and IMTP Phase II. *In The Improvement and Testing of Musa: a Global Partnership* (1994, Honduras). 1994. Proceedings of the First Global Conference of the International Musa Testing Program held at FHIA. Eds. D.R. Jones. Montpellier, France. INIBAP (International Network for Improvement of Banana and Plantain). 303 p.
- Ploetz, R. 2004. Enfermedades y plagas: Un análisis de su importancia y manejo. *Infomusa* 3(2):11-16.
- Ploetz, R.C. 2005. Panama Disease: And old Nemesis Rears its Ugly Head. Part 1: The beginnings of the Banana Export Trades. *American Phytopathological Society*. 13 p.
- Ploetz, R.C. 2006. Fusarium wilt of bananas is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. *Phytopathology* 96(6):653-656.
- Pocasangre, L. 2000. Biological enhancement of banana tissue culture plantlets with endophytic fungi for the control of the burrowing nematode *Radopholus similis* and the Panamá disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*). Ph. D. thesis. University of Bonn. 95 p.
- Pocasangre, L. 2009. Estado actual y manejo del Mal de Panamá en América Latina y El Caribe. *In Reunión de grupos de interés sobre los riesgos de la raza tropical 4 de Fusarium, BBTV y otras plagas de musáceas para la región del OIRSA, América Latina y El Caribe* (2009, San Salvador, El Salvador). 2009. Resúmenes. Bioversity. 71 p.

- Pocasangre, L.; Pérez, V. 2009. Impacto potencial de la entrada de la raza tropical 4 del mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*) en la industria bananera y platanera de América Latina y el Caribe. In Reunión de grupos de interés sobre los riesgos de la raza tropical 4 de Fusarium, BBTV y otras plagas de musáceas para la región del OIRSA, América Latina y El Caribe (2009, San Salvador, El Salvador). 2009. Resúmenes. Bioversity. 71 p.
- Ramamoorthy, V.; Viswanathan, R.; Raguchander, T.; Prakasam, V.; Samiyappan, R. 2001. Induction of systemic resistance by plant growth promoting rhizobacteria in crop plants against pests and diseases. *Crop protection* 20(1):1-11.
- Rodriguez, F.; Pfender, W.F. 1997. Antibiosis and antagonism of *Sclerotinia homoeocarpa* and *Drechslera poae* by *Pseudomonas fluorescens* Pf-5 *in vitro* and in planta. *Phytopathology* 87(6):614-621.
- Rutherford, M.A.; Kangire, A. 1998. Prospects for the management of Fusarium wilt of banana (Panama disease) in África. In *Mobilizing IPM for sustainable banana production in Africa* (1998, Nelspruit, South Africa). 1999. Proceedings of a workshop on banana IPM held. Eds. E.A. Frison; E.B. Karamura; R.A. Sikora. Montpellier, France. INIBAP (International Network for the Improvement of Banana and Plantain). 356 p.
- Sandoval, J.A.; Segura, R. 2009. Investigación, desarrollo e innovación en la producción de banano (Musa AAA) en Costa Rica. In Reunión de grupos de interés sobre los riesgos de la raza tropical 4 de Fusarium, BBTV y otras plagas de musáceas para la región del OIRSA, América Latina y El Caribe (2009, San Salvador, El Salvador). 2009. Resúmenes. Bioversity. 71 p.
- Saravanan, T.; Muthusamy, M.; Ebenezer, E.G.; Bhaskaran, R. 2007. Desarrollo de un método adecuado para evaluar la virulencia del *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 (E.F. Smith) en el banano. *Infomusa* 16(1): 16-18.
- Seshu Reddy, K.V.; Ngode, L.; Ssenyonga, J.W.; Wabule, M.; Onyango, M.; Adede, T.O.; Ngoze, S. 1998. Management of pests and diseases of banana in Kenya: a status report In *Mobilizing IPM for sustainable banana production in Africa* (1998, Nelspruit, South Africa). 1999. Proceedings of a workshop on banana IPM held. Eds. E.A. Frison; E.B. Karamura; R.A. Sikora. Montpellier, France. INIBAP (International Network for the Improvement of Banana and Plantain). 356 p.
- Silagyi, A.J. 2002. A survey of the disease incidence and severity of *Fusarium* wilt, also known as Panama disease, in the banana cultivar Gros Michel caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in small-scale organic farms within 2 regions of Costa Rica: Talamanca (Limón Province) and Turrialba (Cartago Province). University of Florida. 12 p.
- Silagyi, A.J.; Pocasangre, L.E. 2003. Current status of fusarium wilt on Gros Michel in smallholdings in Costa Rica. In 2nd International symposium on fusarium wilt on banana (2, 2003, Salvador de Bahia, Brazil). 2003. Programme and abstracts. Eds. C. Picq; A. Vézina. Salvador de Bahia, Brazil. 39 p.

- Silva B., A.J. da; Vilar T., A.; Mateos, A.P. de; Silva P., M. da. 2007. Redução do mal-do-panamá em bananeira-maçã por inoculação de fungo micorrízico arbuscular. *Pesquisa agropecuária brasileira* 42(1):35-41.
- Sivamani, E.; Gnanamanickam, S.S. 1988. Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* in banana by inoculation with *Pseudomonas fluorescens*. *Plant and Soil* 107(1):3-9.
- Sivan, A.; Chet, I. 1987. Biological control of Fusarium crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions. *Plant Disease* 71(7):587-692.
- Smith, M.K. 1998. A review of factors influencing the genetic stability of micropopagated bananas. *Fruits* 43(4):219-223
- Stover, R.H. 1959. A rapid and simple Pathogenicity Test for Detecting Virulent Clones of *Fusarium oxysporum* f. *cubense* using Seedlings of *Musa balbisiana*. *Nature* 184(14): 1591-1592.
- Stover, R.H. 1962. Fusarium wilt (Panama disease) of bananas and other *Musa* species. Commonwealth Mycological Institute Phytopathological Paper no. 4. 117 p.
- Stover, R.H. 1968. Banana Root Diseases Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, *Pseudomonas solanacearum*, and *Radopholus similis*: A Comparative study of Life Cycles in Relation to Control. *In* International Symposium on Factors Determining the Behavior of Plant Pathogens in Soil. (1968, London, England). 1970. Proceedings. Eds. T.A. Toussoun; R.V. Bega; P.E., Nelson. Los Angeles, London. University of California. 252 p.
- Stover, R.H. 1986. Disease management strategies and survival of the banana industry. *Annual Review of Phytopathology* 24:83-91.
- Stover, R.H.; Waite, B.H. 1960. Studies on Fusarium Wilt of Bananas. IV. Pathogenicity and Distribution of. *F. Oxysporum* f. *cubense* races 1 and 2. *Canadian Journal of Botany* 38:51-61.
- Stover, R.H.; Simmonds, N.W. 1987. Bananas. 3 ed. Longmans Scientific and Technical, Harlow, Essex, UK. 468 p.
- Summerell, B.A.; Salleh, B.; Lesile, J.F. 2003. A Utilitarian Approach to *Fusarium* Identification. *Plant Disease* 87(2):117-128.
- Sutherland, R. 2006. Genetic modification of Cavendish Bananas (*Musa* spp.) in South Africa. Tesis Mag. Sc. Petroria, South África, Univeristy of Pretoria. 54 p.
- Tarig, S.A.; Sariah, M.; Sijam, K.; Marziah, M. 1998. Enhancement of growth and disease suppression by PGPF, *Fusarium Oxysporum*. *In* First national banana seminar at Awana Genting and country resort (1998, Awana Genting, Pahang, Malaysia). 2000. Proceedings. Malaysia.University Putra Malaysia. 343 p.

- Thangavelu, R.; Palaniswami, S.; Doraiswamy, S.; Velazhahan, R. 2003. The effect of *Pseudomonas fluorescens* and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* on induction of defense enzymes and phenolics in banana. *Biologia Plantarum* 46(1):107-112.
- Thurston, H.D. 1989. Enfermedades de cultivos en el trópico. Trad. J.J. Galindo. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. p. 113-123.
- Ting, A.S.Y.; Meon, S.; Kadir, J.; Radu, S.; Singh, G. 2008. Endophytic microorganisms as potential growth promoters of banana. *Biocontrol* 53(3):541-553.
- Tushemereirwe, W.K.; Bagabe, M. 1998. Review of disease distribution and pest status in Africa. *In* Mobilizing IPM for sustainable banana production in Africa (1998, Nelspruit, South Africa). 1999. Proceedings of a workshop on banana IPM held. Eds. E.A. Frison; E.B. Karamura; R.A. Sikora. Montpellier, France. INIBAP (International Network for the Improvement of Banana and Plantain). 356 p.
- Van Loon, L.C.; Bakker, P.A.H.M.; Pieterse, C.M.J. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36:453-483.
- Waite, B.H. 1977. Inoculation studies and natural infection of bananas varieties with races 1 and 2 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense*. *In* Plant Disease Reporter 61(1):15-19.
- Wardlaw, C.W. 1961. Banana diseases, including plantains and abaca. Longmans, Green and Co. London. 648 p.
- Weber, O.B.; Muniz, C.R.; Vitor, A.O.; Freire, F.C.O.; Oliveira, V.M. 2007. Interaction of endophytic diazotrophic bacteria and *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* on plantlets of banana 'Maça'. *Plant Soil* 298 (1-2):47-56.
- Wu, X.; Huang, H.; Guangying, C.; Qianguang, S.; Peng, J.; Zhu, J.; Bao, S. 2009. A novel antibiotic produced by *streptomyces noursei* Da07210 *Antonie van Leeuwenhoek* 96(1):109-112.
- Zambrano, A.Y.; Martínez, G.; Gutiérrez, Z.; Manzanilla, E.; Vicente-Villardón, J.L.; Demey, J.R. 2007. Marcador RAPD asociado a la resistencia de *Fusarium oxysporum* en *Musa*. *Interciencia* 32(11):775-779.

ANEXOS

Anexo 1. Modelos lineales generales y mixtos para la incidencia del Mal de Panamá en vitroplantas de banano cv. Gros Michel en la prueba de patogenicidad

Variable dependiente:RANG_Incidencia

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
240	2262,75	2334,02	-1110,38	32,88	0,68	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	3222,65	<0,0001
FOC	9	44,54	<0,0001
No.Evaluacion	1	36,70	<0,0001
FOC:No.Evaluacion	9	2,67	0,0058

Anexo 2. Modelos lineales generales y mixtos para la severidad de los síntomas externos (amarillamiento y marchitez) causado por Fusarium oxysporum f. sp. cubense en vitroplantas de banano cv. Gros Michel en la prueba de patogenicidad

Variable dependiente:RANG_Amarillamiento

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
240	2355,58	2426,84	-1156,79	40,61	0,67	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	2113,36	<0,0001
FOC	9	32,81	<0,0001
No.Evaluacion	1	116,75	<0,0001
FOC:No.Evaluacion	9	3,57	0,0004

Variable dependiente:RANG_Marchitez

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
240	2354,54	2425,80	-1156,27	40,51	0,58	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	2123,40	<0,0001
FOC	9	13,32	<0,0001
No.Evaluacion	1	135,84	<0,0001
FOC:No.Evaluacion	9	5,78	<0,0001

Anexo 3. Análisis de varianza para el incremento del diámetro del pseudotallo de vitroplantas de banano cv. Gros Michel inoculadas con los aislamientos de Fusarium oxysporum f. sp. cubense

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Incremento diámetro	80	0.21	0.10	74.75

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	6.50	9	0.72	2.03	0.0489
FOC	6.50	9	0.72	2.03	0.0489
Error	24.95	70	0.36		
Total	31.45	79			

Anexo 4. Modelos lineales generales y mixtos para el incremento de la longitud del peciolo de vitroplantas de banano cv. Gros Michel inoculadas con los aislamientos de Fusarium oxysporum f. sp. cubense

Variable dependiente: Incremento.Longitud

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
80	95.17	140.14	-27.58	0.78	0.33	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	50.71	<0.0001
FOC	9	4.94	<0.0001

Anexo 5. Modelos lineales generales y mixtos para el incremento del largo de hoja de vitroplantas de banano cv. Gros Michel inoculadas con los aislamientos de Fusarium oxysporum f. sp. cubense

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
RANG Incremento Largo	80	0.31	0.22	42.70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	9274.19	9	1030.47	3.45	0.0015
FOC	9274.19	9	1030.47	3.45	0.0015
Error	20933.31	70	299.05		
Total	30207.50	79			

Anexo 6. Modelos lineales generales y mixtos para el incremento del índice foliar de vitroplantas de banano cv. Gros Michel inoculadas con los aislamientos de Fusarium oxysporum f. sp. cubense

Variable dependiente: RANG_Incremento.Indice

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
80	667.88	712.85	-313.94	34.18	0.14	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	582.98	<0.0001
FOC	9	2.07	0.0443

Anexo 7. Análisis de varianza para el peso radical de vitroplantas de banano cv. Gros Michel inoculadas con los aislamientos de Fusarium oxysporum f. sp. cubense

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso radical	80	0.57	0.51	37.71

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	287.80	9	31.98	10.28	<0.0001
FOC	287.80	9	31.98	10.28	<0.0001
Error	217.84	70	3.11		
Total	505.64	79			

Anexo 8. Modelos lineales generales y mixtos para el peso foliar de vitroplantas de banano cv. Gros Michel inoculadas con los aislamientos de Fusarium oxysporum f. sp. cubense

Variable dependiente: RANG_Peso.foliar

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
80	610.45	655.42	-285.22	6.26	0.57	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	4375.93	<0.0001
FOC	9	44.83	<0.0001

Anexo 9. Modelos lineales generales y mixtos para el peso de vitroplantas de banano cv. Gros Michel inoculadas con los aislamientos de Fusarium oxysporum f. sp. cubense

Variable dependiente: *Peso.planta*

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
80	419.72	464.69	-189.86	1.42	0.62	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	920.32	<0.0001
FOC	9	13.05	<0.0001

Anexo 10. Modelos lineales generales y mixtos para la severidad de los síntomas internos (decoloración del cormo) causado por Fusarium oxysporum f. sp. cubense en vitroplantas de banano cv. Gros Michel en la prueba de patogenicidad

Variable dependiente: *RANG_Decoloracion.de*

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
80	625,23	649,96	-301,61	15,51	0,57	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	545,68	<0,0001
FOC	9	10,51	<0,0001

Anexo 11. Modelos lineales generales y mixtos para el crecimiento radial de Fusarium oxysporum f. sp. cubense en la prueba de antibiosis

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma
372	507,091	858,270	-156,546	0,330

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	79595,264	<0,0001
Bacteria	30	78,271	<0,0001
FOC	2	26,088	<0,0001
Bloque	3	1,303	0,2737
Bacteria:FOC	60	2,437	<0,0001

Anexo 12. Modelos lineales generales y mixtos para el peso fresco de Fusarium oxysporum f. sp. cubense en la prueba de antibiosis

Variable dependiente: *Peso.fresco*

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma
372	-205,205	254,586	229,603	0,083

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	5651,090	<0,0001
Bacteria	30	10,382	<0,0001
FOC	2	114,873	<0,0001
Bloque	3	31,918	<0,0001
Bacteria:FOC	60	1,721	0,0020

Anexo 13. Modelos lineales generales y mixtos para el peso seco de Fusarium oxysporum f. sp. cubense en la prueba de antibiosis

Variable dependiente: *Peso.seco*

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma
372	-1347,085	-887,294	800,543	0,017

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	6738,646	<0,0001
Bacteria	30	8,932	<0,0001
FOC	2	6,716	0,0014
Bloque	3	18,343	<0,0001
Bacteria:FOC	60	2,384	<0,0001

Anexo 14. Modelos lineales generales y mixtos para la incidencia de la enfermedad Mal de Panamá en vitroplantas de banano cv. Gros Michel en la prueba de biocontrol

Variable dependiente: *Incidencia*

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2
910	8226,46	8631,98	-4027,23	27,58	0,31

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	9407,74	<0,0001
Bacteria	10	7,41	<0,0001
FOC	2	2,48	0,0844
Bacteria:FOC	20	2,56	0,0002
FOC:Evaluacion	12	15,95	<0,0001
Bacteria:Evaluacion	40	1,35	0,0752

Anexo 15. Modelos lineales generales y mixtos para la severidad de los síntomas externos (amarillamiento y marchitez) causado por Fusarium oxysporum f. sp. cubense en vitroplantas de banano cv. Gros Michel en la prueba de biocontrol

Variable dependiente:Amarillamiento

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
910	3032,53	3256,32	-1469,26	1,20	0,31	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	5803,47	<0,0001
Bacteria	10	6,79	<0,0001
FOC	2	15,48	<0,0001
Evaluacion	1	180,70	<0,0001
Bacteria:FOC	20	5,11	<0,0001
Bacteria:Evaluacion	10	0,14	0,9992
FOC:Evaluacion	2	0,66	0,5187

Variable dependiente:Marchitez

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
910	3149,93	3373,73	-1527,97	1,28	0,34	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	2599,05	<0,0001
Bacteria	10	5,62	<0,0001
FOC	2	13,94	<0,0001
Evaluacion	1	245,61	<0,0001
Bacteria:FOC	20	5,31	<0,0001
Bacteria:Evaluacion	10	0,42	0,9374
FOC:Evaluacion	2	0,87	0,4191

Anexo 16. Modelos lineales generales y mixtos para el incremento del número de hojas de vitroplantas de banano cv. Gros Michel en la prueba de biocontrol

Variable dependiente:RANG_Incr.No.Hojas

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
181	1708,57	1810,47	-820,28	51,16	0,24	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	597,23	<0,0001
Bacteria	10	2,23	0,0191
FOC	2	1,92	0,1502
Bacteria:FOC	20	0,98	0,4923

Anexo 17. Modelos lineales generales y mixtos para el incremento del diámetro del pseudotallo de vitroplantas de banano cv. Gros Michel en la prueba de biocontrol

Variable dependiente:RANG_Incr.Diametro.m

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
173	1615,89	1715,91	-773,95	50,18	0,23	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	542,87	<0,0001
Bacteria	10	2,24	0,0190
FOC	2	2,00	0,1390
Bacteria:FOC	20	0,80	0,7132

Anexo 18. Modelos lineales generales y mixtos para el incremento del largo de hoja de vitroplantas de banano cv. Gros Michel en la prueba de biocontrol

Variable dependiente:RANG_Dif.Largo.hoja

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
144	1245,28	1337,40	-588,64	39,19	0,30	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	534,20	<0,0001
Bacteria	10	2,24	0,0201
FOC	2	2,02	0,1381
Bacteria:FOC	20	1,11	0,3480

Anexo 19. Modelos lineales generales y mixtos para el peso radical de vitroplantas de banano cv. Gros Michel en la prueba de biocontrol

Variable dependiente: *Peso.radical*

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
185	1252,42	1385,47	-582,21	6,84	0,21	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	1049,58	<0,0001
Bacteria	10	2,61	0,0058
FOC	2	1,13	0,3250
Bacteria:FOC	20	1,16	0,2997

Anexo 20. Modelos lineales generales y mixtos para el peso foliar de vitroplantas de banano cv. Gros Michel en la prueba de biocontrol

Variable dependiente: *Peso.foliar*

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
185	993,81	1126,86	-452,90	3,60	0,19	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	849,48	<0,0001
Bacteria	10	2,20	0,0204
FOC	2	2,31	0,1028
Bacteria:FOC	20	0,89	0,6005

Anexo 21. Modelos lineales generales y mixtos para el peso de vitroplantas de banano cv. Gros Michel en la prueba de biocontrol

Variable dependiente: *Peso.planta*

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
185	1351,58	1484,63	-631,79	10,03	0,21	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	1057,07	<0,0001
Bacteria	10	2,68	0,0048
FOC	2	1,56	0,2138
Bacteria:FOC	20	1,08	0,3799

Anexo 22. Modelos lineales generales y mixtos para la severidad de los síntomas internos (decoloración del cormo) causados por Fusarium oxysporum f. sp. cubense en vitroplantas de banano cv. Gros Michel en la prueba de biocontrol

Resultados para el modelo: modelo004_RANG_Decoloracion.de_REML

Variable dependiente:RANG_Decoloracion.de

Medidas de ajuste del modelo

N	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2	0
185	1746,07	1848,88	-839,03	50,13	0,25	

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	684,55	<0,0001
Bacteria	10	2,53	0,0077
FOC	2	2,89	0,0584
Bacteria:FOC	20	0,92	0,5674