CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA

PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION

ESCUELA DE POSGRADUADOS

Biblioteca Central
CATIE
4 DIC 2001
RECIBIDO
Turrialba, Costa Rica

EFECTO DE UNA FUENTE DE ENERGÍA, TRES INDUCTORES DE RESISTENCIA Y UN SUSTRATO FOLIAR SOBRE SIGATOKA NEGRA EN BANANO

POR

LUIS FERNANDO PATIÑO HOYOS

CATIE

Turrialba, Costa Rica
2001

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA

PROGRAMA DE EDUCACIÓN PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACIÓN

ESCUELA DE POSGRADUADOS

Biblioteca Conmemorativa
ORTON - IICA - CATIE
4 DIC 2001
RECIBIDO
Turrialba, Costa Rica

EFECTO DE UNA FUENTE DE ENERGÍA, TRES INDUCTORES DE RESISTENCIA Y UN SUSTRATO FOLIAR SOBRE SIGATOKA NEGRA EN BANANO

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

Magíster Scientiae

por

Luis Fernando Patiño Hoyos

Turrialba, Costa Rica

2001

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

MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:

Elkin Bustamante, Ph.D.
Consejero Principal

Alba Stella Riveros, Ph.D
Miembro Comité Consejero

Nelly Vásquez, M.Sc.
Miembro Comité Consejero

Ali Moslemi, Ph.D
Director Escuela de Posgrado

Luis Fernando Patiño Hoyos
Candidato

DEDICATORIA

A mis hijos Santiago y Luis Felipe, a mi esposa Adiela, a mi padre y a toda mi familia.

AGRADECIMIENTOS

A la vida por haberme dado esta oportunidad.

A Don Elkin por sus enseñanzas.

A la Asociación de Bananeros de Colombia (AUGURA) por su respaldo.

A Omar Corrales por el gran apoyo.

A Syngenta por su interés y participación.

Al Dr. Douglas Marín por su disposición y gran colaboración

A Don José Francisco Rodríguez por su amable y valiosa ayuda.

A todo el equipo de trabajo del área de fitopatología de Del Monte – Bandeco.

A Arturo Gamboa por compartir sus experiencias.

A Nelly Vásquez por sus recomendaciones y espíritu positivo.

A Ethel Sánchez por su sencillez y cálida atención.

Al M.Sc. Pablo Acuña por su colaboración.

CONTENIDO

Página

DEDICATORIA iii
AGRADECIMIENTOS iv
CONTENIDO v
LISTA DE FIGURAS vii
LISTA DE TABLAS ix
LISTA DE ANEXOS x
SUMMARY xi
RESUMEN xii

1. INTRODUCCIÓN 1

1.1 OBJETIVOS 2
1.1.1 Objetivo general 2
1.1.2 Objetivos específicos 2
1.2 HIPÓTESIS 3

2. REVISIÓN DE LITERATURA 4

2.1 ORIGEN Y DISEMINACIÓN DE LA ENFERMEDAD 4
2.2 CARACTERÍSTICAS DEL PATÓGENO Y DE LA ENFERMEDAD 4
2.3 CONTROL QUÍMICO Y BIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD 6
2.3.1 Control químico 6
2.3.2 Control biológico 7
2.4 RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA (SAR) 11
2.4.1 Inducción de SAR por BTH 13
2.4.2 Otros inductores sintéticos de resistencia hacia Sigatoka negra 16
2.5 INDUCCIÓN DE RESISTENCIA POR MICROORGANISMOS 16
2.6 COMPOST E INDUCCIÓN DE RESISTENCIA 20
2.7 INDUCTORES DE RESISTENCIA DERIVADOS DE *Mycosphaerella* spp. 21
2.8 AZÚCAR E INDUCCIÓN DE RESISTENCIA 22
2.9 MARCADORES HISTOLÓGICOS DE LA INDUCCIÓN DE RESISTENCIA 23
2.10 ENERGÍA E INDUCCIÓN DE RESISTENCIA 24

3. MATERIALES Y MÉTODOS 27

3.1 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO 27
3.2 MATERIAL VEGETAL 27
3.3 TRATAMIENTOS 27
3.3.1 Aislamiento de rizobacteria 29
3.3.2 Aplicación de Asm 30
3.3.3 Sustrato Foliar 31
3.3.4 Inductor derivado de *M. fijiensis* 31
3.3.5 Fuente de Energía 31
3.3.6 Aislamiento del patógeno 32
3.3.7 Inoculación de las plantas 32

3.4 VARIABLES DE RESPUESTA..... 34
3.4.1 Microscopía electrónica.....36
3.4.2 Prueba de sensibilidad a Asm 36
3.5 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN..... 37

4. RESULTADOS 39
4.1 Fase de invernadero.....39
4.1.1 Ensayo 1.....39
4.1.2 Ensayo 2.....46
4.1.2.1 Inoculación artificial.....46
4.1.2.2 Inoculación natural.....49
4.2 Fase de campo.....53
4.2.1 Área Bajo la Curva de Desarrollo de la Enfermedad.....57
4.2.2 Microscopía electrónica.....60
4.2.3. Prueba de sensibilidad a Asm.....62

5. DISCUSIÓN 63

6. CONCLUSIONES 73

7. LITERATURA CITADA 75

8. ANEXOS 85

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1. Severidad de Sigatoka negra en los cultivares Gran Enano y FHIA 23. I 50 días después de inoculación (DDI), II 60 DDI. Ensayo 1 de invernadero..... 40

Figura 2. Interacción lombricompost por tratamientos, para severidad de Sigatoka negra. I 50 DDI. II 60 DDI Ensayo 1 de invernadero.....41

Figura 3. Interacción melaza por tratamientos, para severidad de Sigatoka negra. I 50 DDI. II 60 DDI. Ensayo 1 de invernadero.....42

Figura 4. Altura de plantas (cm) medida 50 DDI. Ensayo 1 de invernadero.....43

Figura 5. Interacción lombricompost por tratamientos, para altura de plantas. Ensayo 1 de invernadero 43

Figura 6. Interacción melaza por tratamientos, para altura de plantas. Ensayo 1 de invernadero.....44

Figura 7. Aposiciones fluorescentes en tejido de hoja de banano.....45

Figura 8 Interacción fuente de energía por tratamientos, para índice de aposiciones fluorescentes. 14 DDI natural. Ensayo 1 de invernadero.....46

Figura 9. Interacción lombricompost por tratamientos, para severidad de Sigatoka negra, 50 DDI artificial. Ensayo 2 de invernadero.....47

Figura 10. Interacción lombricompost por tratamientos, para severidad de Sigatoka negra, 50 DDI artificial. Ensayo 2 de invernadero.....48

Figura 11. Efecto de los componentes del sustrato foliar sobre la severidad de Sigatoka negra para el cultivar Gran Enano, ensayo 2 de invernadero 50DDI artificial..... 48

Figura 12. Interacción lombricompost por tratamientos, para severidad de Sigatoka negra 50 DDI natural. Ensayo 2 de invernadero.....50

Figura 13. Interacción lombricompost por tratamientos, para índice de aposiciones fluorescentes 14 DDI natural. Ensayo 2 de invernadero..... 51

Figura 14. Interacción lombricompost por tratamientos, para altura de plantas. Ensayo 2 de invernadero..... 51

Figura 15. Efecto de los componentes del Sustrato Foliar sobre la severidad de Sigatoka negra para el cultivar Gran Enano, ensayo 2 de invernadero 50ddi natural.....52

Figura 16. Interacción fuente de energía con tratamientos, para severidad de Sigatoka negra bajo condiciones de campo 54

Figura 17 Interacción fuente de energía con tratamientos, para índice de severidad de Sigatoka negra bajo condiciones de campo 55

Figura 18. Interacción fuente de energía con tratamientos, para periodo total de Sigatoka negra bajo condiciones de campo 56

Figura 19. Interacción fuente de energía con tratamientos, para hojas totales bajo condiciones de campo 56

Figura 20. Curva del desarrollo de la enfermedad para severidad de Sigatoka negra en ausencia (E0) y presencia (E1) de la fuente de energía bajo condiciones de campo..... 58

Figura 21. Interacción fuente de energía con tratamientos, para Área Bajo la Curva de desarrollo de la enfermedad bajo condiciones de campo..... 59

Figura 22. Interacción fuente de energía con tratamientos, para altura de plantas bajo condiciones de campo 59

Figura 23. Corte transversal de hoja de banano tratada con Asm.....60

Figura 24. Efecto de Asm sobre células de hoja de banano.....61

Figura 25. Curva de respuesta de *M. fijiensis* a Asm 62

LISTA DE TABLAS

Página

Tabla 1. Efecto del lombricompost usado como fuente de energía sobre la altura y la acción de tres inductores de resistencia en dos cultivares de banano.....53

LISTA DE ANEXOS

Página

Anexo 1. Análisis de varianza para severidad de Sigatoka negra y altura de plantas ensayo 1 de invernadero. Análisis de parcelas divididas....85

Anexo 2. Análisis de varianza para Severidad de Sigatoka negra y altura de plantas, ensayo 1 de invernadero. Análisis factorial....85

Anexo 3. Análisis de varianza para índice de aposiciones fluorescentes ensayo 1 de invernadero. Análisis factorial....85

Anexo 4. Análisis de varianza para severidad de Sigatoka negra y altura de plantas ensayo 2 de invernadero. Análisis de parcelas divididas....86

Anexo 5. Análisis de varianza para Severidad de Sigatoka negra y altura de plantas ensayo 2 de invernadero. Análisis factorial....86

Anexo 6. Análisis de varianza para índice de aposiciones fluorescentes ensayo 2 de invernadero. Análisis factorial....86

Anexo 7. Comparación entre Severidad de Sigatoka negra, medida a través de inoculación natural e inoculación artificial.... 87

Anexo 8. Condiciones climáticas durante la inoculación natural del ensayo 1 de invernadero.... 87

Anexo 9. Condiciones climáticas durante la inoculación natural del ensayo preliminar donde se evaluó la dosis de 0.2 cc de i.a. de Asm.... 87

Anexo 10. Condiciones climáticas durante la inoculación natural del ensayo 2 de invernadero.... 88

Anexo 11. Análisis de suelo utilizado durante la fase de invernadero....88

Anexo 12. Análisis químico y microbiológico de Lombricompost....88

Anexo 13. Composición de la melaza final de caña.... 89

Anexo 14. Sistema de operación estándar utilizado por Bandeco, dentro del cual se evaluaron los tratamientos durante la ensayo de campo.... 90

Anexo 15. Análisis de varianza para variable severidad, índice de severidad, periodo total, hojas totales y ABCDE. Cultivar Gran Enano bajo condiciones de campo.... 90

Anexo 16. Metodología para la observación por microscopía de muestras de tejido de campo tratado con Asm....91

Patiño, LF. 2001. Effect of an energy source, three resistance inductors and a foliar substrate on black Sigatoka on banana.

Keywords: induced resistance, Asm, *Pseudomonas fluorescens,* spore germination fluid, fluorescent appositions, chitin, glucan, calcium, molasses, vermicompost, *Mycosphaerella fijiensis.*

ABSTRACT

Banana cultivars Gran Naine and FHIA 23 were evaluated under greenhouse conditions with three resistance inductors and a foliar substrate against black Sigatoka disease, in absence and presence of an energy source. The induced resistance was higher in FHIA 23 than Gran Naine. Vermicompost had a significant effect on resistance expression, besides it showed also resistance induction. The induction capacity was affected by inoculation conditions. High induction was produced by Asm in both cultivars, rhizobacteria can induce resistance in FHIA 23 when the energy source was present. Spore germination fluid just induced resistance in FHIA 23 with energy source was present after artificial inoculation was used. High control of the disease was given by the foliar substrate.

Under field conditions for Gran Naine cultivar, Asm incremented the disease control of standard fungicides. Vermicompost and phosphorus did not have effect on improvement of induction by Asm. Fungicides rotation with foliar substrate offered less control than the standard operation practice. In the presence of the energy source, combination of fungicides with Asm in rotation with foliar substrate had a similar control level than the standard chemical control.

Patiño, LF. 2001. Efecto de una fuente de energía, tres inductores de resistencia y un sustrato foliar sobre Sigatoka negra en banano.

Palabras claves: resistencia inducida, Asm, *Pseudomonas fluorescens,* fluido de esporas en germinación, aposiciones fluorescentes, quitina, glucano, calcio, melaza, lombriompost, *Mycosphaerella fijiensis.*

RESUMEN

Los cultivares de banano Gran Enano y FHIA 23 fueron evaluados bajo condiciones de invernadero con tres inductores de resistencia y un sustrato foliar contra la enfermedad Sigatoka negra, en ausencia y presencia de una fuente de energía. La resistencia inducida fue mayor en FHIA 23 que en Gran Enano. El lombricompost mostró efecto significativo sobre la inducción de la resistencia, además de que este también mostró incremento en defensa. La capacidad de inducción resultó afectada por las condiciones de inoculación. Asm produjo alta inducción de resistencia en ambos cultivares, la rizobacteria pudo inducir resistencia en FHIA 23 cuando la fuente de energía estuvo presente. El fluido de esporas en germinación indujo resistencia en FHIA 23 en presencia de la fuente de energía, luego de inoculación artificial. Se obtuvo un alto control de la enfermedad mediante la aplicación del sustrato foliar.

En condiciones de campo para el cultivar Gran Enano, Asm incrementó el control de la enfermedad ofrecido por el sistema estándar. El lombricompost y la fuente de fósforo no mostraron efecto sobre la inducción vía Asm. La rotación de fungicidas con el sustrato foliar produjo menos control que el sistema estándar de control. En presencia de la fuente de energía, la combinación de fungicidas con Asm en rotación con el sustrato foliar presentó un nivel de control similar al control químico estándar.

1. INTRODUCCIÓN

Los bananos junto con los plátanos son cultivados en cerca de 100 países en el mundo dentro de las regiones tropical y subtropical, donde estas plantas constituyen una fuente principal de alimento para miles de personas y son también fuente valiosa de ingresos a través del comercio local e internacional. El cultivo de estas musáceas ocupa en el mundo aproximadamente 10 millones de hectáreas, con una producción anual alrededor de 88 millones de toneladas métricas; constituyéndose en el cuarto cultivo alimenticio más importante a nivel mundial después del arroz, trigo y el maíz, en términos de valor de producción bruta. En América Latina y el Caribe los cultivos de banano y plátano son importantes como alimento y generador de ingresos para cerca de 200 millones de personas (Frison y Sharrock 1999).

Se considera que la enfermedad foliar más destructiva para los cultivos de banano y plátano es la Sigatoka negra causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, estado perfecto de *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deigthon. Esta enfermedad ataca las hojas de las plantas, produciendo un rápido deterioro del área foliar cuando no se controla. También, produce una reducción en la calidad de la fruta, al favorecer la maduración prematura de los racimos, causa principal de pérdidas debida a ésta enfermedad (Marín y Romero 1992).

En Costa Rica el control de Sigatoka negra representa un costo de alrededor de 1.050 US$/ha/año, en un total de cerca de 47,982 has en producción registradas para finales del año 2000, lo cual equivale aproximadamente a US$50 millones/año con un promedio de 39 aplicaciones de fungicidas al año (CORBANA 2000; CORBANA 2001).

En Colombia se cultiva el banano en dos regiones agroecológicas diferentes. La zona bananera de Urabá con 28,000 hectáreas, donde el control químico de la Sigatoka negra cuesta aproximadamente US$ 800 / ha /año, y la zona de Santa Marta con 14,000 hectáreas con una inversión en control químico de US$ 500 /ha /año; para un total en este país de cerca de US $30 millones por año con un promedio de 25 ciclos de fungicidas. Esta situación tiende a

agravarse ante el reducido número de grupos químicos actualmente empleados para controlar la enfermedad, y a la capacidad demostrada del hongo para desarrollar resistencia a los fungicidas sistémicos (Romero y Sutton 1998; Wirz y Chin 2000).

Se considera necesario generar investigación que contribuya a disminuir el problema creciente de la resistencia de *M. fijiensis* a fungicidas; además de satisfacer la necesidad sentida y presionada de buscar alternativas ecológicas para controlar la enfermedad. En CATIE se ha generado información sobre el efecto de microorganismos que alteran la pared celular del patógeno, y otros que promueven el crecimiento y los mecanismos de resistencia en la planta de banano. La investigación sobre esta enfermedad también reporta otras maneras diferentes de control como la adquisición de resistencia a través de la aplicación de sustancias químicas sintéticas, algunas de éstas ya comerciales. Con la experimentación de estas alternativas de control se busca satisfacer las exigencias de calidad de los consumidores actuales y disminuir los impactos negativos de las descargas de fungicidas sintéticos al ambiente en las zonas de influencia donde se cultiva el banano y plátano en el mundo.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo General

Contribuir al desarrollo de tecnologías alternativas para el control de Sigatoka negra en plantas de banano por medio de inductores de resistencia de origen biótico y sintético, conjuntamente con la acción de una fuente de energía y un sustrato foliar que altera el establecimiento del patógeno.

1.1.2 Objetivos Específicos

a. Determinar la capacidad inductora de resistencia del Acibenzolar-s-metil, al igual que la rizobacteria del grupo fluorescente de *Pseudomonas* y un inductor derivado de esporas de *M. fijiensis*; sobre un cultivar altamente susceptible y sobre otro tolerante a la enfermedad.

b. Estimar en condiciones de invernadero el efecto de una fuente de energía en la posible expresión de resistencia sistémica promovida por los inductores de resistencia.
c. Analizar en condiciones de invernadero la acción de un sustrato foliar sobre la severidad de la Sigatoka negra.
d. Evaluar en condiciones de campo el efecto de una fuente de energía sobre la acción de Asm y un sustrato foliar.

1.2 HIPÓTESIS

a. Los inductores de resistencia de origen biótico y sintético estimulan significativamente la expresión de resistencia de plantas de banano a la Sigatoka negra.
b. La expresión de resistencia se fortalece con la presencia de la fuente de energía.
c. El sustrato foliar reduce la severidad de *M. fijiensis* y se genera interacción positiva de éste con los inductores de resistencia.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 ORIGEN Y DISEMINACIÓN DE LA ENFERMEDAD

La Sigatoka negra fue registrada como enfermedad importante por primera vez en el valle de Sigatoka dentro de la isla de Fiji en 1963 (Rhodes 1964). El agente causal se diseminó velozmente, desplazando e invadiendo el área que ocupaba la otra variante de la enfermedad conocida como Sigatoka amarilla (*M. musicola*), la cual es menos severa. Para 1970, la enfermedad se encontraba presente en todas las islas del Pacífico del Sureste Asiático, Singapur, Indonesia, Tailandia y Malasia (Meredith 1970).

El ingreso de la enfermedad a América Latina, se reportó en 1972 en ataques a plantaciones de banano en Honduras (Stover y Dickson 1976). Rápidamente la enfermedad alcanzó proporciones epidémicas en los países centroamericanos; registrándose por primera vez en Costa Rica a mediados de 1979 (Gonzalez y Jaramillo 1979). El patógeno continuó con su desplazamiento y para finales del año 1980 ya se encontraba en todas las áreas bananeras costarricenses. Para éste mismo año, la enfermedad se reportó en México (Orozco-Santos 1998). En las islas del Caribe, se registró en Cuba en 1992, Jamaica (1994) y Republica Dominicana (1996). En Sur América se encontró por primera vez en Colombia en octubre de 1981, en la zona bananera de Urabá. Ocho años después, se detectó en la segunda zona bananera de este país, distante 400 kms de la primera (Mayorga, 1994). Posteriormente se observó en Ecuador (1986), Venezuela (1992), Perú (1994). Bolivia (1997) (Tejerina *et al.* 1997); Brasil (1998) (Maciel *et* al. 1998); y el hallazgo más reciente es en Australia (2001) ([1]Guzmán; Comunicación personal, Julio 2001).

2.2 CARACTERÍSTICAS DEL PATÓGENO Y DE LA ENFERMEDAD

El hongo que causa la Sigatoka negra tiene la característica de reproducirse tanto sexual como asexualmente durante su ciclo de vida. La fase asexual, que corresponde al género *Paracercospora* se presenta en el desarrollo de las primeras lesiones de la enfermedad (pizca, estría), observándose la presencia

[1] Guzmán, M. 2001. Taller Internacional sobre Sigatoka negra. (Comunicación personal).CATIE. San José, CR. CORBANA.

de conidióforos que salen principalmente de los estomas de la superficie inferior de las hojas (Meredith y Lawrence 1969).

Una vez termina la producción de conidióforos en el desarrollo de la lesión, se inicia la fase sexual (*Mycosphaerella fijiensis*) sobre el primer estado de mancha, con producción de gran cantidad de ascosporas en estructuras llamadas peritecios, los cuales se forman sobre los estomas de la parte superior e inferior de la mancha foliar (Pons 1987; Marín y Romero 1992).

La característica del patógeno de reproducirse repetitivamente durante el curso de la epidemia, hace que la Sigatoka negra se considere una enfermedad policíclica, es decir, con una secuencia sin fin de infección, colonización, esporulación y dispersión, y de infección ramificada porque existen dos formas de esporas aunque no necesariamente en forma alterna (Zadoks y Schein 1979).

Como producto de la gran capacidad reproductiva del hongo, éste ha alcanzado una amplia variedad genética y patogénica que le ha permitido adaptarse a diversas condiciones ambientales y del cultivo en casi todas las áreas productoras de banano en el mundo. La presión de selección ejercida por los fungicidas sistémicos utilizados para combatirlo, también es otro factor generador de variabilidad (Stover 1980; Romero y Sutton 1997).

En plantaciones de plátano en Costa Rica, se encontró que el número de conidiosporas fue del orden de 10-100 veces menor que el de ascosporas, indicando que las conidiosporas son de significado secundario para la reproducción y dispersión de *Mycosphaerella fijiensis* (Gauhl 1990).

El período desde inoculación hasta formación de peritecios está determinado por el vigor de la planta, cantidad de inóculo y condiciones climáticas. En banano los primeros síntomas aparecen alrededor de los 17 días después de inoculaciones artificiales y en plátano después de 29 días. El tiempo desde la aparición de los primeros síntomas hasta formación de la mancha es de 10 y 17 días respectivamente. El ciclo de la enfermedad es completado en cerca de

50 días en banano y 75 días para plátano. En banano la variación del ciclo puede ser de 32 a 102 días (Mayorga 1986).

El vuelo de ascosporas ocurre en días libres de lluvia solamente después de las horas de mayor precipitación de rocío, y el vuelo de este tipo de esporas estuvo correlacionado positiva y significativamente con la lluvia. Las ascosporas son liberadas con 0.1 mm o más de lluvia por hora. En los meses con menor lluvia se registran pequeñas cantidades de ascosporas a diferencia de la estación lluviosa. Igualmente se encontró que en tiempos de menor lluvia el desarrollo de síntomas duró mas, mientras que en los de mucha lluvia el desarrollo fue mas corto (Gauhl 1990).

Pasberg-Gauhl (1991), a través de inoculación natural durante 2 días, y posterior incubación de la enfermedad bajo condiciones apropiadas en invernadero y campo, evaluó la Sigatoka negra en plantas jóvenes derivadas de rizoma o de cultivo de tejido, sin encontrar diferencia entre estos dos tipos de materiales. Este resultado señaló que la reacción de la enfermedad sobre diferentes cultivares puede ser observada adecuadamente en plantas muy jóvenes (1 a 3 meses de edad), donde la clasificación de los materiales con base en su respuesta a la enfermedad fue siempre la misma en comparación con plantas de 3-8 meses de edad.

2.3 CONTROL QUÍMICO Y BIOLÓGICO DE LA ENFERMEDAD

2.3.1 Control Químico

El uso de fungicidas es el método de control más utilizado contra la Sigatoka negra. De acuerdo a Marín y Romero (1992), los fungicidas para el control de esta enfermedad se pueden agrupar en tres categorías con base en su modo de acción: fungicidas de contacto o protectores, de acción sistémica local y fungicidas sistémicos.

Los primeros son productos que permanecen en la superficie de la hoja, incluyen varios productos con los ingredientes activos mancozeb y clorotalonil. Su acción es de contacto sobre la producción de conidias en lesiones de la hoja y sobre las conidias y ascosporas depositadas en la hoja, evitando su

germinación y por consiguiente nuevas infecciones. Se consideran fungicidas multisitio porque actúan en diferentes momentos del proceso de crecimiento del hongo y por esta razón el patógeno tiene una escasa probabilidad de desarrollar resistencia a la acción de estos fungicidas (Ramírez 1998).

Los fungicidas con acción sistémica local pertenecen al grupo de las morfolinas, éstos penetran en las hojas pero no se traslocan al resto de la planta. Su modo de acción se ubica entre los inhibidores de la biosíntesis del ergosterol, actuando en dos etapas diferentes de la ruta biosintética del hongo, por lo que la generación de cepas resistentes a este grupo de fungicidas es menos probable (Marín y Romero 1992).

Finalmente están los fungicidas sistémicos, los cuales presentan una actividad fuertemente curativa sobre los primeros estados de la infección, luego de atravesar la cutícula y entrar al flujo respiratorio de la planta. Estas moléculas realizan el control de la enfermedad en el interior de la hoja, siendo los grupos mas utilizados en banano los benzimidazoles, triazoles y estrobilurinas (Shillingford 1989; Pérez-Vicente *et al.* 2000; Wirz y Chin 2000).

2.3.2.Control biológico

Entre los trabajos pioneros sobre el control biológico de la Sigatoka negra, se tiene el estudio realizado por Jiménez *et al.* (1985), que reporta el efecto antagonista a nivel *in vitro* de 12 cepas de *Pseudomonas sp.* Una de estas presentó un antagonismo superior al clorotalonil en plantas de invernadero. Posteriormente Esquivel (1992), referencia cinco hiperparásitos de *M. fijiensis*, siendo el más común *Hansfordia pulvinata*, asociado con la fase anamorfa del patógeno.

La división Eumicota, dentro de la cual estan los ascomicetos se caracteriza por poseer en su pared celular galacto-mano-proteína y α-glucano como polímeros solubles en álcali y β-glucano y quitina como polímeros insolubles en álcali (Bartnicki-Garcia 1968; Griffin 1994). Este hecho se ha constituído en la base para el desarrollo del control biológico aplicado de Sigatoka negra.

Existen microorganismos capaces de digerir la quitina presente en la pared celular de hongos fitopatógenos (Michell y Alexander 1962). De igual forma, se ha reportado que la aplicación de quitina coloidal aumenta la sobrevivencia y población de esta clase de microorganismos, mejorando el control de patógenos foliares (Ploper *et al.* 1991; Kokalis-Burelle *et al.* 1991; Okumoto y Bustamante 1993). La combinación de quitina y una cepa de *Bacillus cereus* redujo en un 60 % el número de manchas foliares causadas por *Cercospora arachidicola*, encontrando además que la quitina actuaba como barrera física a la germinación y penetración del hongo (Kokalis-Burelle *et al.* 1991).

Gonzalez *et al.* (1996), evaluaron mediante aplicación semanal por el haz y envés de las hojas de banano, la acción de microorganismos quitinolíticos sobre Sigatoka negra, encontrando que *Serratia marcescens* es compatible con los fungicidas protectantes y sistémicos comunmente utilizados para controlar la enfermedad. Sin embargo, la adherencia de la bacteria se vió reducida por los coadyudantes químicos como Silwet L75 y NP7. La quitina sola resultó ser el mejor tratamiento, inhibiendo la enfermedad en un 90 % bajo condiciones de invernadero. En condiciones de campo la aplicación de fungicidas controló en un 60 % la enfermedad, mientras que los tratamientos con quitina y quitinolíticos solos o en mezcla controlaron la enfermedad en un 40%, sin existir diferencias entre estos últimos. Miranda (1996), reportó que el aceite agrícola y los coadyudantes Silwet L-77 y Nu-Film 17 mostraron compatibilidad con microorganismos antagonistas a la Sigatoka negra.

Vallecillo (1996), reportó control de Sigatoka negra bajo condiciones de campo, mediante la aplicación terrestre de *Serratia marcescens* en suspensión acuosa con aproximadamente 110 litros de solución bacterial/ha, registrando mayor número de hojas por planta, mayor posición de la hoja más joven manchada, menor número de hojas infectadas y menor porcentaje ponderado de infección, con relación a plantas sin tratamiento. Se indicó que la aplicación de la bacteria tuvo una efectividad del 50% en el control de la enfermedad; permitiendo contar con los parámetros fisiológicos y de cosecha necesarios para cumplir con los requerimientos comerciales de exportación de la fruta.

Otro de los componentes principales de la pared celular de los hongos ascomicetos es el glucano, un polisacárido con enlaces glucosídicos beta. Este hecho propició también la exploración de la actividad glucanolítica de bacterias, encontrando que algunas de ellas pertenecientes al género *Bacillus* mostraron efecto antagónico sobre ascosporas de *M. fijiensis,* llegando a inhibir su germinación hasta en un 25% y la longitud de su tubo germinativo en un 47%. Estas cepas también mostraron en el laboratorio compatibilidad con los fungicidas más utilizados para controlar Sigatoka negra en banano. En condiciones de campo, las bacterias glucanolíticas también han mostrado diferencias significativas, logrando reducir la severidad de la enfermedad hasta en un 58.5% en promedio (Talavera *et al.* 1998).

Una de las limitaciones en la aplicación de microorganismos para el control de patógenos foliares, es su baja efectividad causada por exposición a las condiciones ambientales (Spurr y Knudsen 1985). Blakeman y Fukkema (1982), plantearon que la capacidad competitiva de los microorganismos antagonistas, la habilidad de multiplicación y la persistencia en la superficie foliar, pueden ser mejoradas con el manejo de las condiciones nutricionales.

Andrews (1992), indica que las aproximaciones con mayor potencial para mejorar el control biológico de patógenos foliares son: mejoramiento drástico en formulación, uso de cepas mejoradas, uso de endófitos y el redireccionamiento de los esfuerzos de control biológico al estado saprofítico en la hoja. La colonización por un antagonista es un requerimiento general para el control biológico; por esta razón éste debe encaminarse a promover la acividad de bacterias residentes de ocurrencia natural o aplicadas exógenamente (Blakeman y Fokkema 1982).

En microbiología existe un adagio que dice: "los microorganismos están en todas partes, el ambiente los selecciona"(Andrews y Harris 2000), y los sustratos foliares constituyen una alternativa para establecer este ambiente selectivo; además el uso de esta tecnología disminuye los riesgos potenciales asociados a la aplicación masiva de controladores biológicos en el campo.

Ruiz-Silvera *et al.* (1997), evaluaron el efecto de sustratos y bacterias antagonistas sobre *M. fijiensis* en banano. En condiciones de invernadero se encontró que la leche y melaza mostraron un efecto positivo en la multiplicación de *S. marcescens*. No obstante, en condicones de campo no se detectaron diferencias entre los sustratos y el testigo sin protección.

Talavera *et al.* (1998), estudiaron la actividad glucanolítica de cepas bacterianas aisladas de la filosfera de plantas de banano. En condiciones de laboratorio, cuatro de estas cepas inhibieron en un 16% en promedio la germinación de esporas de *M. fijiensis*, y la elongación de su tubo germinativo fue reducida en un 40 %. La aplicación de estas bacterias y glucano en condiciones de campo controlaron la enfermedad en un 58.5%.

Arango (2000), reporta que la aplicación de quitina favoreció el crecimiento de colonias de bacterias de color amarillo, blanco nacar y amarillo estriado clasificadas como quitinolíticas. El glucano fue menos eficiente que la quitina en su efecto sobre la densidad y dinámica de poblaciones de estos microorganismos, aunque favoreció la estabilidad de las colonias amarillas y de una bacteria fluorescente con alta capacidad de consumir glucano. No obstante este sustrato presentó menor diversidad de colonias al final del ensayo y el menor efecto sobre el desarrollo de la enfermedad

Un sustrato foliar compuesto de leche, melaza y quitina presentó mayor capacidad de favorecer la multiplicación y diversidad de colonias de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas a nivel del filoplano, mostrando compatibilidad con fungicidas tradicionalmente utilizados para el control de la enfermedad. La utilización de este sustrato, al igual que otro a base de quitina, glucano y calcio en rotación con fungicidas, exhibieron un control estadísticamente similar al control ejercido por un programa basado solamente en control químico (Arango 2000).

El calcio ha sido reportado como un componente que puede potenciar la acción de los sustratos foliares, su efecto se fundamenta en que puede incrementar la eficacia de los agentes de control biológico, presumiblemente por afectar

directamente la germinación de las esporas y metabolismo del patógeno e indirectamente por no alterar el metabolismo normal del organismo biocontrolador (Wisniewski *et al.* 1995).

El tratamiento de tejido vegetal con este mineral también induce un incremento en el contenido de calcio dentro del tejido mediante un entrecruzamiento de polímeros poligalacturonatos, resultando en una disminución de enfermedades como las causadas por *Botrytis cinerea* (Conway *et al.* 1991). Adicional a este efecto, el calcio también inhibe la enzima poligalacturonasa de los hongos, enzima esencial para los procesos de infección (Biggs *et al.* 1997; Chardonnet *et al.* 2000).

2.4 RESISTENCIA SISTÉMICA ADQUIRIDA

El fenómeno natural del desarrollo de resistencia en respuesta a la infección de un patógeno, fue primeramente reconocido en 1901 por Ray y Beauverie. Treinta años después, Carbonne y Kalaljev, confirmaron estos estudios y mostraron que la resistencia adquirida también dependía del estado (fitness) de la planta hospedera (Kessmann *et al.* 1994).

En 1933, Chester revisó cerca de 200 publicaciones que describían un fenómeno que él denominó inmunidad fisiológica adquirida (Ryals *et al.*1994). Dentro de este concepto, se incluían al menos, tres procesos diferentes reconocidos actualmente como: protección cruzada viral, antagonismo (o control biológico), y resistencia sistémica adquirida (SAR, por su sigla en inglés).

En términos generales, se puede expresar que cuando las plantas reconocen que están siendo invadidas por un patógeno, se pueden inducir una variedad de respuestas inducidas por un factor llamado "elicitor" (Kiba *et al.* 1996).

Dentro de estas respuestas de defensa se incluyen la muerte celular programada, la cual restringe el progreso del patógeno (respuesta hipersensible), el fortalecimiento de la pared celular como resultado de la lignificación y la formación de aposiciones en la pared celular (papilas) en sitios

de intento de entrada de patógenos; el entrecruzamiento de las proteínas de la pared celular, y la producción de compuestos antimicrobiales como fitoalexinas y proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR's).

Se reporta que luego de la inducción, las partes de la planta no inducidas directamente desarrollan una resistencia incrementada (sensibilización) a posteriores infecciones patogénicas. (Vernooij *et al.*1994; Sticher *et al.*1997).

El Ácido Salicílico (AS) fue propuesto como una señal que conduce a SAR, esta hipótesis se fundamenta en estudios donde se purificó una proteína que se enlaza al AS y a sus análogos, inhibiendo la actividad catalasa de la enzima. Este hecho ha llevado a la especulación de que el AS puede mediar una inhibición de la catalasa; ya que esta enzima convierte el H_2O_2 en H_2O y O_2. La inhibición resultaría en una acumulación de especies reactivas de oxígeno que puede actuar como mensajeros secundarios para inducir la expresión de los genes responsables de SAR (Chen *et al.* 1993).

La hipótesis de la inhibición de la catalasa no ha sido reconocida como el principal modo de acción del AS en la inducción de defensa. Se ha encontrado que la inducción de ciertas PR's no es producto de la acumulación del H_2O_2 sino del AS directamente, además la actividad de la enzima no decrece con el tratamiento de AS. Otro argumento en contra de la hipótesis es que los niveles de AS dentro del tejido son muy bajos como para inhibir la catalasa, y el H_2O_2 en altos niveles también puede inducir la producción de AS (Mauch-Mani y Métraux 1998).

Actualmente se ha identificado un gen regulador durante la transducción de la señal de SAR, conocido como NIM1/NPR1; éste codifica una proteína que controla la expresión de varios eventos de los genes de defensa, actuando como factor esencial en la regulación de la inducción de resistencia a enfermedades (Cao *et al.* 1997).

Resulta interesante que este gen regulador de SAR muestre homología en su secuencia con un factor de transducción que está implicado en la respuesta de

resistencia en un rango de organismos desde *Drosophila* hasta mamíferos; sugiriendo que la vía de señalamiento de SAR puede representar un mecanismo de defensa antiguo en organismos superiores (Ryals *et al.* 1997).

2.4.1 Inducción de SAR por BTH

El benzothiadiazole (BTH), es un inductor de SAR que ha mostrado actividad en plantas como trigo, arroz y tabaco. Este compuesto prácticamente no tiene efecto antifungal y conduce a la acumulación de genes SAR. La mayoría de estudios sobre SAR han sido llevados a cabo con plantas dicotiledóneas; sin embargo BTH ha mostrado inducción de SAR en plantas monocotiledóneas (Delaney 1997; Friedrich *et al.* 1996;Gorlach *et al.*1996; Ukness *et al.* 1992; Vernooij *et al.* 1994; Ward *et al.* 1991).

El BTH inhibe las dos principales enzimas degradadoras del H_2O_2, catalasa y ascorbato peroxidasa; siendo considerado mejor inhibidor de la catalasa que el ácido salicílico, sugiriendo que cambios en los niveles de H_2O_2 o en el estado redox de la célula pueden estar involucrados en la activación de ciertas respuestas de defensa (Wendehenne *et al.*1997) .

Este compuesto al igual que su molécula derivada Acibenzolar-s-metil (Asm), simulan el modo de acción del ácido salicílico (AS). Ambos inducen el promotor PR-1a (Friedrich *et al.* 1996). Du y Klessig (1997), encontraron que el BTH compite muy exitosamente con el AS para unirse a la proteína de enlace con el AS (SABP2) y que la habilidad de los análogos del AS, como BTH y Asm, para competir con el AS y enlazarse a dicha proteína está correlacionado con su habilidad de activar la expresión de los genes de defensa e incrementar la resistencia. BTH además de activar PR's también induce la formación de compuestos fenólicos y de residuos de β-glucósido (Benhamou y Bélanger 1998b).

Existe evidencia derivada de estudios citológicos, que muestra que el efecto de protección ejercido por BTH, puede explicarse por su reducción en el grado de colonización fungal en tejidos radicales, asociada con acumulación masiva de aposiciones de la pared que actúan como barreras estructurales. Este proceso

de reforzamiento mediado por la deposición temprana de calosa y fenoles, probablemente conduce a cambios dramáticos tanto en la rigidez como en la vulnerabilidad de las células y tejidos (Benhamou 1996).

A nivel foliar (Görlach *et al.* 1996), reportan que la tasa de penetración de *Erysiphe graminis* fsp *tritici* en tejido tratado con BTH, disminuyó en un 30 % comparada con las plantas control. Una posible explicación para la obstaculización de la entrada del hongo fue también el incremento en la formación de papilas efectivas (directamente sobre la hifa de penetración) en tejido tratado. Se ha encontrado también que la expresión de las reacciones de defensa en plantas tratadas con Asm ocurre con mayor magnitud después del contacto con el hongo (Benhamou y Bélanger 1998a).

La evidencia de la función de la calosa o de la lignina en la resistencia no es conclusiva, es así como otros reportes sugieren la no relación entre dificultad o fracaso de la penetración y la formación de papilas (Aist 1976). Aunque esta relación no debe negar la validez de la clasificación de este tipo de sustancias como respuestas de resistencia, no ha sido demostrado una función definitiva de las papilas en la resistencia a enfermedades en plantas (Smedegaard-Petersen y Tolstrup 1985).

En cultivos comerciales de banano en la Provincia de Limón-Costa Rica, se encontró que plantas de banano respodieron a la activación de resistencia al ser tratadas con CGA 245704 = Acibenzolar-s-metil (Asm). Se reporta que la inclusión de la molécula en los programas de manejo de la Sigatoka negra reducen entre un 15-18% el número de ciclos necesarios para tener un buen control (Madrigal *et al.*, 1998).

BTH ha mostrado inducción de resistencia hacia el mildíu velloso de las crucíferas, encontrando efecto directo de la dosis (desde 1.5 –250 gr de i.a/litro) sobre la inducción de resistencia; del genotipo de las accesiones y la dosis sobre la altura de las plantas. La duración del efecto protector se extendió hasta 15-30 días después del tratamiento (Godard *et al.* 1999).

Este compuesto sintético también ha mostrado reducción significativa de la incidencia del virus de la marchitez manchada del tomate TSWV en plantas de tabaco, causando toxicidad en las plantas y disminución significativa en la altura al inicio del cultivo, pero sin diferencias al final del mismo (Pappu *et al.* 2000). También se reporta efecto de BTH sobre la replicación del *Virus del Mosaico del Pepino* (Anfoka 2000).

Una implicación del uso del BTH, es su efecto sobre la fisiología de la planta, es así como plántulas de tabaco resultaron muy sensibles a la fitotoxicidad del producto, y se encontró mediana toxicicidad en plantas jóvenes. La toxicidad estuvo acompañada de clorosis, la cual fue corregida por la aplicación de nitrato de calcio, sugiriendo un posible desvío de la disponibilidad de nitrógeno hacia el metabolismo inducido por SAR (Cole 1999).

La activación de resistencia a través de BTH en plantas de pimentón (*Capsicum annum* L), resultó independiente de la presencia o ausencia de genes mayores en los cultivares inducidos. Bajo condiciones de campo el uso de Asm solo o en combinación con cobre, mostró un control de la mancha bacterial similar al tratamiento estándar de cobre más maneb (Romero *et al.* 2001). Sin embargo la inclusión del inductor en programas estándares de control, aumentó la efectividad del mismo en plantas de tabaco (Cole 1999; Alexander y Graves 2001)

2.4.2 Otros inductores sintéticos de resistencia hacia Sigatoka negra

Actualmente se encuentra en evaluación un inductor sintético de naturaleza proteíca conocido como Harpin, para el control de diferentes enfermedades dentro de las cuales se encuentra Sigatoka negra en banano. La proteína fue originalmente aislada de *Erwinia amylovora*, e induce una respuesta hipersensitiva en el tejido tratado (Wei *et al.* 1992).

Otro compuesto sintético reportado como inductor de resistencia hacia Sigatoka negra es el Triciclazole, un inhibidor de la biosíntesis de melanina en *M. fijiensis*, el cual causó en el hongo acumulación del metabolito 2,4,8-

trihidroxytetralone (2,4,8-THT). La activación temprana del metabolismo de esta sustancia está relacionada con el nivel de resistencia a Sigatoka negra, a través de la formación de micro lesiones necróticas y la inducción de reacciones de defensa post-infeccionales que condujeron a la incompatibilidad entre el patógeno y sus plantas hospederas (Hoss *et al.* 2000).

Los inductores de resistencia no son necesariamente un reemplazo de los fungicidas o bactericidas tradicionales. Su utilización alternada o en conjunto con estos pesticidas puede llegar a reducir el número de aplicaciones o quizás la dosis de aplicación (Ortega *et al.*1998). Igualmente, este tipo de productos puede ayudar a extender la durabilidad de la resistencia en cultivares con genes de resistencia a razas de los patógenos (Romero *et al.* 1998). Además, la activación de diferentes mecanismos de defensa disminuyen el riesgo de desarrollar resistencia a este tipo de productos (Tally *et al.* 1999; citados por Romero *et al.*2001).

2.5 INDUCCIÓN DE RESISTENCIA POR MICROORGANISMOS

Kloepper y Schroth (1978) reportaron que ciertas bacterias que colonizan las raíces podían promover el crecimiento de plantas de pepino, denominándolas "Rizobacterias Promotoras del Crecimiento de las Plantas (PGPRs por su sigla en inglés) (Liu *et al.* 1995). Pero dentro de este grupo se encuentran algunas bacterias pertenecientes principalmente a especies fluorescentes del género *Pseudomonas*, que actuan como agentes biológicos de inducción de resistencia sistémica (ISR, por su sigla en inglés). Esta inducción es producida por medio de determinantes bacteriales como sideróforos, AS y lipopolisacáridos (Van Loon, *et al.* 1998).

Hoffland *et al.* (1996), evaluaron una cepa de *P. fluorescens* para inducir resistencia sistémica contra *Fusarium oxysporum* en varias especies de plantas; se encontró que la resistencia fue inducida sin propiciar la síntesis de PRs; demostrando también que una sola cepa de PGPR puede inducir resistencia contra múltiples patógenos, inclusive aquellos que atacan las hojas, y el nivel de protección fue tan alto como el llevado a cabo por la acción de un patógeno necrotizante e inductor de síntesis de PRs.

A pesar de que la resistencia debida a *P. fluorescens* ha sido demostrada en varias especies (Van Peer *et al.* 1991; Pieterse *et al.* 1996; Leeman *et al.* 1995; Wei *et al.* 1991; Maurhofer *et al.* 1995); se conoce poco acerca de cómo este tipo de microorganismos pueden inducir la resistencia sistémica (Mauch-Mani y Métraux 1998).

Pietersé *et al.* (1998), proponen un modelo para explicar la vía del señalamiento de ISR por rizobacterias no-patogénicas, en el cual para el caso de *P. fluorescens* se activa una vía independiente del SA hacia SAR, donde participan respuestas del jasmonato (JA) y del etileno para generar una reacción de resistencia sistémica que al igual que SAR es dependiente de la proteina reguladora NPR1. La vía de ISR comparte eventos de señalamiento que son iniciados en presencia del patógeno pero no asociada con expresión de genes PR o Pdf1.2. En este trabajo se plantea que *P. fluorescens* activa una vía novedosa de señalamiento y que la resistencia inducida involucra la producción de compuestos de defensa desconocidos.

Con relación a la influencia del tipo de cultivar sobre la capacidad de inducción, van Loon *et al.* (1998), hacen un recuento donde se muestran resultados contrastantes, desde no dependencia de diferentes niveles de resistencia en plantas de rábano, pasando por incremento significativo en cultivares de clavel con resistencia moderada, hasta limitación en la capacidad inductora en cultivares de pepino con niveles altos de resistencia. Lo anterior sugiere la existencia de un límite por encima del cual la inducción biológica no puede adicionar protección a la expresada por la resistencia heredable.

Un factor adicional que puede modificar la resistencia inducida a través de rizobacterias, es la presencia de hierro en el suelo, el cual en altas concentraciones reduce la inducción al afectar determinantes bacteriales como los sideróforos y el AS. Se plantea que una rizobacteria puede inducir resistencia mediante diferentes mecanismos, dependiendo de las condiciones locales que se presenten en la rizosfera (van Loon *et al.* 1998; Press *et al.* 2001).

La promoción del crecimiento de las plantas por parte de las rizobacterias, es el otro componente de las bacterias con capacidad inductora de resistencia. Alexander (1977) indica que la mayor contribución de la microflora bacterial a las plantas que coloniza es el proveer productos excretados que sirven de fuente de carbón, nitrógeno o reguladores de crecimiento; además la cantidad de CO_2 liberado por las bacterias produce ácido carbónico, que ayuda a la solubilización de nutrientes inorgánicos no disponibles, lo que favorece la asimilación de fósforo, potasio, magnesio y calcio.

Otros mecanismos que se tienen para explicar la promoción del crecimiento, es el efecto que ocurre como consecuencia indirecta al cambiar el balance microbial en la rizosfera, lo que favorece las poblaciones de microorganismos benéficos para la planta. Dependiendo de las condiciones fisiológicas y ambientales, se estima que más del 20% del peso seco de la planta es liberado de las raíces al suelo; las rizobacterias pueden favorecer la liberación de exudados en mas del 100 % a través de reguladores de crecimiento, vitaminas, toxinas, enzimas celulolíticas u otros compuestos, o a través de la alteración de la disponibilidad de nutrientes (Kluepfel 1993). Según Foster (1986), las rizobacterias también pueden liberar nutrientes tanto orgánicos como inorgánicos, particularmente el fósforo insoluble.

Jaizme-Vega *et al.*(2000), reportaron que tanto la micorriza *Glomus manihotis* como la rizobacteria *Bacillus subtilis* en forma individual o conjunta, incrementaron significativamente el crecimiento de microplántulas de banano comparados con los controles sin inocular.

Los microorganismos formulados en sustratos como cachaza y broza de café lograron promover el crecimiento del área foliar en banano con una correlación significativamente negativa entre promoción de crecimiento y porcentaje de infección de Sigatoka negra (Gutierrez 1996). Los tratamientos con *S. marcescens* y *P. fluorescens* exhibieron los porcentajes mayores de nitrógeno y calcio en hojas de banano. El tratamiento con *P. fluorescens* produjo significativamente mayor número de hojas en condiciones de campo.

Camacho (1997), reportó que *P. fluorescens* promovió el crecimiento de plantas de banano y causó un menor índice de severidad de Sigatoka negra.

Tanto SAR como el control biológico de fitopatógenos se espera que puedan ser usados en combinación y estos dos fenómenos pueden interactuar en forma inesperada e impredecible. Este hecho llevó a Chen *et al.* (1996) a evaluar la compatibilidad de estas dos alternativas de control, encontrando en plantas de tabaco que la inducción de SAR mediante aplicaciones de ácido salicílico o INA suprimieron el efecto de patógenos oomicetos, pero no alteraron el crecimiento de la bacteria antagonista *Bacillus cereus* UW85 sobre las raíces, y la combinación de los dos tratamientos resultó en una supresión aditiva de la enfermedad.

Las interacciones entre la planta hospedera, el agente de control biológico y el patógeno parecen ser significativas en la actividad de *B. cereus* UW85, donde el potencial de SAR para influenciar cambios en la composición de la dinámica y comunidad microbial mediada por agentes de control biológico, puede contribuir significativamente a la supresión de enfermedades desde una perspectiva ecológica (Chen *et al.* 1996).

2.6 COMPOST E INDUCCIÓN DE RESISTENCIA

Tränker (1992) observó que el mildíu polvoso del trigo y cebada fue menos severo en suelos enmendados con compost con relación a suelos sin este sustrato. Situación similar fue reportada para enfermedades fungosas y bacterianas en tomate (Roe *et al.* 1993). Zhang *et al.*(1996), registraron que mezclas de compost elaborado a base de especies maderables indujo SAR en pepino hacia la pudrición radical ocasionada por *Pythium* y antracnosis causada por *Colletotrichum orbiculare*.

Actualmente no se tiene claridad sobre los mecanismos de inducción. No obstante, las plantas en suelos enmendados con compost son colonizadas por una gran variedad de taxas bacteriales dentro de las cuales han sido descritas cepas capaces de inducir resistencia a patógenos presentes en el suelo y en las hojas (Maurhofer *et al.* 1994; Wei *et al.* 1991).

Zhang *et al.* (1996), reportaron que la actividad de la peroxidasa (un marcador de SAR) en pepino fue significativamente mayor en plantas sembradas en mezclas con compost que en plantas sin este sustrato, siendo crítica la interacción con el patógeno; además la actividad de la enzima β-1,3-glucanasa resultó incrementada en aquellas plantas sembradas con compost, mientras que en tabaco se reporta la acumulación de esta enzima y de quitinasa (PR3) (Maurhofer *et al.* 1994).

La naturaleza biológica de la inducción de resistencia por parte de los compost ha sido corroborada por el hecho de que al autoclavar el sustrato se destruye el efecto supresivo (Chen *et al.* 1987).

En lombricompost de pulpa de café, se encontró una gran riqueza microbiana representada por 14 géneros de bacterias dentro de las cuales se destacan como promotoras de crecimiento e inductoras de resistencia a enfermedades, los géneros *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Serratia*; también se encontraron 5 géneros de hongos, 2 de levadura y 3 de actinomicetos, en lombricompost mezclado con mucílago de café. Las bacterias predominan en la pulpa de café, mientras que el proceso de lombricompostaje favore el establecimiento de hongos y actinomicetos. De igual forma, se encontraron altos contenidos de minerales y materia orgánica (Blandón *et al.*1999).

Oluma y Onyezili (1999), reportan menor severidad de Sigatoka negra en suelos que presentan mayores contenidos de materia orgánica (2.7 –2.9%) con relación a suelos con bajo contenido (0.95%), indicando la participación importante que juega el tipo de fertilidad de los suelos sobre el manejo de la enfermedad.

Las sustancias húmicas y en general los sustratos orgánicos, también presentan un estímulo sobre el crecimiento de las plantas relacionado comúnmente con el incremento en la toma de macronutrientes y la solubilización de micronutrientes a partir de las formas orgánicas, y un incremento en la permeabilidad de las membranas celulares. De igual forma

tanto la tasa de fotosíntesis como de respiración se han visto aumentadas por la presencia de sustancias húmicas, encontrándose un incremento en los contenidos de clorofila luego de aspersiones foliares con este tipo de sustancias (Chen y Aviad 1990).

2.7 INDUCTORES DE RESISTENCIA DERIVADOS DE *Mycosphaerella* spp.

Diferentes elicitores bióticos como proteínas, glicoproteínas, péptidos, quitina, glucano, polisacáridos y lípidos han sido encontrados en fluídos de esporas en germinación, filtrados de cultivos de hongos y bacterias, paredes celulares o membranas de hongos fitopatogénos, al igual que en el espacio apoplástico de las plantas (Darvill y Albersheim 1984).

Dentro del género *Mycosphaerella* se ha reportado que la especie *M. pinodes* secreta un elicitor de alto peso molecular (> 20,000 kDa) en su fluído de picnosporas en germinación (Shiraishi *et al.* 1978). Este elicitor induce defensas activadas como la producción de la fitoalexina pisatin, un inhibidor de infección no identificado, generación de un anión superóxido (Kiba *et al.* 1996) y el incremento en actividad de PR's como β-1,3-glucanasa y endoquitinasa (Yoshioka *et al.* 1992). Recientemente se ha encontrado que el elicitor incrementa rápidamente la generación del superóxido O_2^- y la actividad ATPsa en la fracción proteíca solubilizada de paredes celulares de arveja y caupí que pueden estar estrechamente correlacionadas con la transducción de la señal que conduce a las respuestas de defensa (Kiba *et al.* 1997).

El elicitor además de inducir las respuestas de defensa, también lleva la respuesta concomitante de un supresor que bloquea estas mismas, condicionando los tejidos de la planta a ser susceptibles. La acción de este supresor parece estar relacionada con base en el tipo de interacción que puede ser específica a una especie o en forma similar a la especificidad entre un cultivar y una raza del patógeno (Yoshioka *et al.* 1995).

La estructura parcial de un elicitor presente en fluído de esporas de *M. pinodes* en germinación fue determinada como glicoproteíca. Se ha logrado sintetizar exitosamente derivados glicopéptidos con la porción oligosacárida de este

elicitor, encontrando que los glicopéptidos sintéticos pudieron inducir *in vitro* la activación de respuestas de defensa (Kiba *et al.* 1999).

Riveros y Lepoivre (1998), utilizando una técnica de inyección localizada sobre hojas de banano, del fluído de conidias de *M. fijiensis* en germinación, reportan inducción de necrosis seguida de la aparición de aposiciones fluorescentes a partir del 6^0 día después de aplicado el inductor. También se observó una más rápida e intensa reacción en el tejido de un clon resistente a la enfermedad con relación a un cultivar susceptible. Se sugirió que el elicitor es producido por las conidias durante su germinación, y que su naturaleza probablemente es polisacárida.

2.8 AZÚCAR E INDUCCIÓN DE RESISTENCIA

La acumulación o agotamiento de azúcar en los tejidos vegetales puede convertirse en adaptación fisiológica de las plantas que afecta la acción de los hongos fitopatógenos (Salzman *et al.* 1998). El incremento en susceptibilidad a hongos en tejidos vegetales con bajos niveles de azúcar, es un fenómeno denominado "pérdida de resistencia inducida por sumidero", documentado en tomate, algodón, y maíz (Salzman *et al.* 1998). Niveles moderados de azúcar pueden incrementar las tasas de colonización de algunos hongos patogénicos, presumiblemente debido a la presencia de fuentes de carbono para los microorganismos. Sin embargo, niveles mayores de azúcares pueden reversar este efecto, conduciendo a un descenso en la susceptibilidad, fenómeno conocido como "resistencia de alta azúcar" (Horsfall y Dimond 1957; citado por Salzman *et al.*1998). Al menos dos mecanismos potencialmente interrelacionados pueden estar involucrados en el descenso de susceptibilidad con la regulación de la acumulación de sustancias de defensa como las PR's: mecanismo osmótico debido a la acumulación de azúcar o señalamiento condicionado por el azúcar al regular la expresión de los genes que codifican para las proteínas antifungales. En frutos de uva la actividad antifúngica de una proteína parecida a la Taumatina y de quitinasas, fue incrementada con el aumento en la concentración de glucosa, descartando algún mecanismo dependiente de la nutrición, al no ser esta azúcar metabolizada por hongos como *Guignardia bidwelli* y *Botrytis cinerea.* El mecanismo más probable

atribuido en este estudio fue la represión debida al azúcar, de genes involucrados en la patogénesis o virulencia.

Otro posible mecanismo por el cual el azúcar puede incrementar la actividad antifúngica de PR's está basado en la preservación de la estructura primaria de las proteínas ya que los azúcares son conocidos como estabilizadores de las proteínas ante la desnaturalización (Lee y Timasheff 1981), lo que facilita la conformación activa de las proteínas antifungales en la solución fisiológica (Salzman *et al.* 1998).

Sancho y Guzmán (1997) tomando como base la fuente de carbohidratos presentes en melaza como fuente de energía para la planta, además de la complejidad en contenido de minerales de este subproducto; evaluaron su aplicación en combinación con con las aspersiones aéreas de fungicidas para el control de Sigatoka negra. No se encontró efecto de la melaza sobre aumento en el control de la enfermedad.

2.9 MARCADORES HISTOLÓGICOS DE LA INDUCCIÓN DE RESISTENCIA

La inducción de resistencia puede generar cambios no sólo bioquímicos y de reforzamientos de pared celular, sino también en la presencia de sustancias o estructuras relacionadas con la defensa. Griesbach *et al.* (2000), reportan como marcador histológico de la inducción de resistencia en células de tomate, la formación de partículas densoelectrónicas de forma papilar a esférica en el tonoplasto y membranas de las organelas de las células parenquimáticas del sistema vascular. La formación de estas partículas fue asociada con la respuesta de defensa a la preinoculación con una raza avirulenta de *Clavibacter michigannensis* subsp *michiganensis.*

La formación y acumulación de compuestos fenólicos en los espacios intercelulares han sido asociadas con la formación de gotas denso-electrónicas y vesículas dentro de las células hospederas, como ha sido registrado por Benhamou (1996) para la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* en tomate. La formación de estas gotas fue explicada como punto de partida para la síntesis de compuestos fenólicos. Gotas osmiofílicas (por su

tinción afín al Osmio) similares fueron observadas en membranas y organelas de células de plantas de algodón resistentes a la marchitez por Fusarium (Shi *et al.* 1991) e identificadas como terpenoides con posible función de fitoalexinas.

También existen referencias de que estos cuerpos de inclusión vacuolar asociados a la membrana pueden ser PR's, las cuales han sido caracterizadas como osmotina y thaumatina (Rodrigo *et al.* 1993). La presencia de estas partículas dentro de la vacuola podría representar también un depósito de PR's y la vacuola central actuaría como un "arsenal de defensa" (Griesbach *et al.* 2000).

2.10 ENERGÍA E INDUCCIÓN DE RESISTENCIA

Resulta obvio que la defensa activa en plantas y las reacciones de incompatibilidad, estén asociadas con un incremento en actividad biológica, incluyendo la traslocación alterada y la síntesis incrementada de compuestos como calosa, lignina, fitoalexinas y acidos nucleicos. Dichos incrementos en actividad biológica requieren energía que en gran medida debe derivarse de una actividad respiratoria igualmente incrementada con el fin de suministrar las unidades de carbono necesarias para la síntesis (Oku *et al.* 1973; Smedegaard-Petersen y Tolstrup 1985).

Para ilustrar el potencial de la respiración en la biosíntesis de los compuestos asociados con la combinación incompatible, Daly (1976) calculó el requerimiento para la síntesis de risitina en papa. Tomando como base que la glicólisis es la fuente de piruvato y de ATP, se planteó que debe metabolizarse un mínimo de 4.5 moléculas de glucosa para construir una molécula de risitina.

La demanda de energía por parte del estado de inducción de resistencia, causa una caída de la energía disponible por el hospedero para trabajo útil y puede limitar significativamente el crecimiento y la producción con respecto a sus valores potenciales (Smedegaard-Petersen y Tolstrup 1985).

La reacción hipersensitiva, requiere que el ciclo del ácido tricarboxílico esté operando, esto pudo ser demostrado ya que la respuesta de defensa puede ser retardada por la acción de inhibidores de la respiración mitocondrial, donde la adición de ATP no solo acorta el tiempo para la expresión de la resistencia, sino también que puede compensar el efecto de retardo (Nozue *et al.* 1978; Crute *et al.* 1985).

En tomate se ha observado que la inducción de resistencia para *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, estimula la formación de una mayor cantidad de ribosomas y de retículo endoplasmático en las células activadas, sugiriendo un intenso metabolismo celular necesario para la expresión de la defensa (Griesbach *et al.* 2000).

Con respecto a los posibles cambios que puede experimentar la inducción de resistencia a través del desarrollo de la planta, Guedes *et al.* (1980) registraron como la inducción de resistencia sistémica a antracnosis del pepino, se presentó en plantas que estaban en estado fisiológicos vegetativos, pero no ocurrió inducción en aquellas plantas que llegaban al período de fructificación, siendo marcadamente disminuida cuando estaban en el momento de floración. Esta respuesta fue atribuida a que en estos estados fisiológicos la señal química para la resistencia no es producida por las plantas o las células no están en un estado fisiológico apropiado para responder a la señal.

El Acibenzolar-s-metil (Asm), al ser usado como inductor de resistencia a *Xanthomonas axonopodis* pv. *vesicatoria* en plantas de pimentón (*Capsicum annum)*, conlleva un costo energético que puede ocasionar en algunos cultivares una sobreproducción de frutos de menor tamaño, afectando negativamente la producción, siendo más evidente el costo cuando la frecuencia de aplicación es mas alta. Es posible que la continua expresión de resistencia incremente igualmente la sensibilidad al estrés, y así la respuesta de los cultivares puede estar relacionada con una habilidad inherente para responder al estrés (Romero *et al.* 2001). Lo anterior podría también contribuir a explicar la inducción de resistencia a enfermedades adquirida a través del uso de herbicidas (Cohen *et al.* 1992; Strobel y Kuć 1995).

Con el objetivo de compensar los costos energéticos implicados en la inducción de resistencia, es importante tener presente la acción de facilitadores en el uso de la energía disponible para la efectividad de la inducción.

De acuerdo a Bustamante y Patiño (2001), estos facilitadores se pueden agrupar en: 1)*facilitadores ambientales* dentro de los cuales estan el manejo de temperatura, humedad, luz y velocidad del viento. 2)*Facilitadores biológicos* principalmente rizobacterias promotoras de crecimiento, micorrizas y fertilizantes orgánicos. 3)*Facilitadores químicos* como el suministro adecuado de minerales como fósforo, calcio, potasio y selección adecuada de herbicidas y 4)*facilitadores genéticos* como el uso de cultivares que exhiban características de buena adaptabilidad, resistencia genética duradera y de buena producción.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO

El experimento se llevó a cabo bajo condiciones de laboratorio e invernadero, en el área de Fitopatología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), situado a 602 m.s.n.m., con temperatura, precipitación y humedad relativa promedios anuales de 21.7 ^{0}C, 2650 mm y 87 %, respectivamente. Se realizó una fase de campo en el área experimental de la compañía DEL MONTE S.A.(Bandeco) ubicada en la zona de Siquirres- Costa Rica, a 30 m.s.n.m., con precipitación promedio anual de 3644 mm, temperatura promedio anual de 25.3^{0}C y humedad relativa promedio de 85 %.

El estudio histológico de la interacción entre los inductores de resistencia con los materiales de banano, se realizó en el laboratorio de Histología Vegetal de CATIE y en la Unidad de Microscopía Electrónica de la Universidad de Costa Rica.

3.2 MATERIAL VEGETAL

Se utilizaron plantas provenientes de cultivo *in vitro* con el fin de asegurar la uniformidad y sanidad de las mismas. En la fase de invernadero se usaron dos cultivares con diferente grados de respuesta a la Sigatoka negra: Gran Enano (AAA) altamente susceptible y FHIA 23 (AAAA) clasificado como tolerante a la enfermedad (Orjeda *et al.* 1999). Este cultivar fue suministrado por el MSc. Pablo Acuña de CORBANA. Para la fase de campo se evaluó la respuesta de los tratamientos en el cultivar comercial Gran Enano.

3.3 TRATAMIENTOS

Fase de invernadero

Ensayo 1

Este ensayo consistió de los siguientes tratamientos:

FE		0 (agua)	A1	B1	S	ABS
LC0	M0	T1	T2	T3	T4	
	M1	T5	T6	T7	T8	
LC1	M0	T9	T10	T11	T12	
	M1	T13	T14	T15	T16	T17

FE= Fuente de Energía, *LC* = Lombricompost, *M* = Melaza, *0*: ausencia *1*: presencia. *A* = Acibenzolar-s-metil (2cc de i.a../litro) *B* = *Pseudomonas sp* cepa *PF1* *S* = Sustrato Foliar. Por disponibilidad de material, en el cultivar FHIA 23 no se incluyeron los tratamientos que comprendían S a exepción del tratamiento ABS. En el cultivar Gran Enano se evaluaron todos los tratamientos.

Ensayo 2

Debido a sintomas de toxicidad encontrados con la dosis inicial de Asm, se evaluó una segunda dosis de éste producto, al igual que otra cepa de *P. fluorescens* y un inductor obtenido de fluído de conidias de *M. fijiensis* en germinación. El efecto de estos inductores fue evaluado en presencia y ausencia de lombricompost. La distribución de los tratamientos fue la siguiente:

FE	0 (agua)	A2	B2	F
LC0	T1	T2	T3	T4
LC1	T5	T6	T7	T8

FE= Fuente de Energía, *LC* = Lombricompost, *0*: ausencia *1*: presencia. *A2* = Acibenzolar-s-metil (0.2 cc de i.a../litro) B2= *Pseudomonas fluorescens* cepa *PF2*. F= fracción cruda de *M. fijiensis* (FcMf).

En este segundo ensayo se realizó una prueba para evaluar la acción individual de los componentes del sustrato foliar sobre el cultivar Gran Enano, teniéndose los siguientes tratamientos: sustrato foliar, fuente de quitina, fuente de glucano y calcio.

Fase de campo

Para esta fase se establecieron 10 tratamientos tomando como parcelas totales hileras de 12 plantas y como parcela útil las 4 plantas centrales. Las parcelas totales estuvieron aisladas enrtre si mediante una barrerra de pasto elefante, con el fin de evitar traslape durante la aplicación de los tratamientos.

Se usaron tres repeticiones (bloques) por tratamiento. La distribución de los tratamientos para esta fase fue la siguiente:

FE	SOE	SOE + Asm 40 gr de i.a/ha cada 35 días	SOE + Asm 15 gr de i.a/ha cada 20 días	SF en rotación con SOE	SF en rotación con SOE+ Asm 15 gr de i.a/ha cada 20 días
LC0	T1	T2	T3	T4	T5
LC1	T6	T7	T8	T9	T10

FE= Fuente de Energía
SOE= Sistema de Operación Estandard de control químico - Bandeco 2001
SF= Sustrato Foliar
LC = Lombricompost. 0= ausencia 1= presencia, como complemento a esta fuente de energía, se incluyó la aplicación foliar de Phos-pro (P_2O_5 18% + Ca 4%) a una dosis de 0.5 litros/ha, de acuerdo al ciclo de aplicaciones indicado en el Anexo 14.

Luego de once semanas de ser sembradas las plantas, se iniciaron los tratamientos, realizando aspersiones con bomba de motor Jacto PL50 BV calibrada para lanzar un volumen de 23.6 litros de mezcla /ha.

El sistema de operación estándard utilizado por Bandeco dentro del cual se evaluaron los tratamientos, consistió en el uso de fungicidas protectantes aplicados 7-9 días después de la última aplicación y fungicidas sistémicos después de 12-14 días (Anexo 14).

La evaluación de los tratamientos se realizó hasta que una parcela de referencia con plantas sin ningun tipo de control llegara a su nivel máximo de infección natural.

3.3.1 Aislamiento de Rizobacteria

Una cepa fluorescente de la bacteria *Pseudomonas* fué aislada de la rizosfera del clon Pelipita (ABB). Se prepararon suspensiones de suelo de rizosfera en agua destilada estéril, luego se diluyeron estas suspensiones hasta $10^{-3} - 10^{-5}$, para seguidamente esparcir una gota de 20µl en cajas de petri con medio de cultivo agar nutriente. Posteriormente se tomó el crecimiento bacterial por unidad formadora de colonia, y se purificó en medio agar nutriente y en medio B de King. Se aisló una cepa de la bacteria fluorescente del género *Pseudomonas* identificada como *PF1*. Esta fue aplicada en condiciones de invernadero, sumergiendo raíces de plántulas de banano en suspensión

bacterial de 10^9 esporas/cc durante 45 minutos, seguido por la siembra de las plantas en suelo con sustrato para crecimiento de la bacteria (aceite vegetal de maíz al 3%, melaza al 6% en 1000 cc de broza de café esterilizada 2 veces durante 1 hora) a una proporción de 3:1. Cada dos semanas se aplicó al suelo 200 cc de suspensión bacterial/planta con el fin de fomentar la colonización del sustrato y raíces (Gutiérrez 1996; Camacho 1997).

De igual forma, en el ensayo 2 de invernadero, se evaluó la capacidad inductora de resistencia de *P. fluorescens* cepa PF2 facilitada por la Dra. Jennifer Parker de la Universidad de Wisconsin, y reportada por Camacho (1997), como inductora de resistencia a Sigatoka negra en plantas de banano. Antes de aplicar esta cepa, se indujo su reactivación, asperjando una suspensión bacterial sobre hojas de banano bajo condiciones asépticas, con posterior reaislamiento e incremento en medio B de King.

3.3.2 Aplicación de Asm

Acibenzolar-s-metil (Boost 500 SC, Syngenta S.A.) un activador de defensas en plantas perteneciente a la clase química de los benzotiadiazoles, fue aplicado vía aspersión 5 días después de la inoculación (DDI) a una dosis de 3 cc de solución/hoja, en las tres primeras hojas de plántulas de 4.8 meses de edad total desde su cultivo in vitro. Se evaluaron dos dosis: 2cc de i.a../litro, durante el ensayo 1. Debido a la observación de síntomas de fitotoxicidad con esta dosis, se evaluó preliminarmente una segunda dosis 2, con 0.2 cc de i.a./litro, sobre plantas de Gran Enano sin lombricompost bajo condiciones de inoculación natural similares a las del ensayo 1 (Anexo 9). Esta dosis menor fue evaluada nuevamente durante el ensayo 2 de invernadero. En todos los casos la aplicación del producto fue cada 30 días, lo que representó dos aplicaciones desde el inicio de los tratamientos hasta la evaluación final 50 días después de la inoculación.

En condiciones de campo se evaluaron igualmente dos dosis de Asm, con diferentes frecuencias de aplicación: 1) 15 gr de i.a./ha, cada 20 días y 2) 40 gr de i.a./ha cada 35 días. En todos los casos en mezcla con el sistema estándar de control (Anexo 14).

3.3.3 Sustrato Foliar

Se utilizó el sustrato reportado como promotor de población natural de microorganismos quitinolíticos indicado por Arango (2000). La aplicación de este tratamiento se realizó via aspersión 5 DDI, obteniendo una cobertura total del envés de las hojas. Las aplicaciones se realizaron cada 15 días hasta la evaluación final (Ruiz-Silvera *et al.* 1997; Talavera *et al.* 1998).

Para la fase de campo, con el fin de ajustar la concentración de los componentes del sustrato a la dosis comercial de 23.6 litros de mezcla de fungicida/ha, la concentración de los componentes fue modificada 4 semanas después de iniciar los tratamientos, teniéndose las siguientes proporciones: fuente de quitina al 25%, fuente de glucano 8%, fuente de calcio al 5% y nufilm al 0.3%.

3.3.4 Inductor derivado de *M. fijiensis*

Esporas asexuales de *M. fijiensis* se colocaron para su germinación en una solución de 2.5 x 10^5 conidias/cc durante 48 horas en oscuridad, con agitación suave y constante. Al cabo de este tiempo se hizo una filtración con tela de etamina y filtro Whatman No.1, para finalmente obtener la fracción cruda de *M. fijiensis* (FcMf). Con el fin de aumentar la posible capacidad inductora, este inductor fue concentrado 10X mediante el proceso de rotaevaporación, la solución fue almacenada a 4^0C bajo oscuridad hasta el momento de la aplicación (Riveros y Lepoivre 1998).

Para la evaluación de los tratamientos con este inductor, se cubrió el envés de las tres primeras hojas con una mezcla de FcMf, mas gelatina al 1% con el fin de facilitar la permanencia del inductor sobre el tejido. La aplicación se realizó 48 horas antes de la inoculación con el patógeno, seguida por dos aplicaciones 5 DDI y 10 DDI.

3.3.5 Fuente de Energía

Como fuente de energía metabólica para facilitar la expresión de la resistencia, se utilizó compost clasificado como sustrato vigorizante en plantas de banano (Bustamante 2000, resultados sin publicar). La proporción del sustrato con

lombricompost, fue de una parte de lombricompost proveniente de broza de café por otra parte de suelo mezclado con arena. También se evaluó durante el ensayo 1 de invernadero, el efecto de la melaza de la caña al 2% en aspersiones semanales.

En la fase de campo se evaluó el efecto del lombricompost aplicando 5 kg al momento de la siembra, seguido por una dosis de 3 kg, a los tres y seis meses después de la siembra. Como complemento de la fuente de energía, se incluyó la aplicación de P_2O_5 18% + Ca 4% a una dosis de 0.5 L/ha con intervalos de aplicación indicados en el anexo 14, en aquellos tratamientos que llevaron lombricompost.

3.3.7 Inoculación de las plantas

Aislamiento del patógeno

Se utilizó tejido vegetal en estadío 6 de severidad de la enfermedad, caracterizado por presentar una alta producción de cuerpos fructíferos del hongo. La muestra fue tomada de una plantación ubicada en Guápiles-Costa Rica, tratando con esto de que el aislamiento proviniera de una zona con alta presión de la enfermedad. Una vez en el laboratorio, las muestras fueron colocadas por 24 horas en cámara húmeda y luego de este tiempo se sumergieron por 5 minutos en agua destilada con el fin de hidratar los peritecios, para posteriormente por cambios de presión inducir la descarga de ascosporas sobre medio agar-agua al 3% incubadas bajo condiciones de luz y temperarura normal del laboratorio. Luego de 12 horas las ascosporas de *M. fijiensis* germinadas, fueron transferidas a medio nutritivo PDA donde crecieron las colonias multiespóricas del hongo, las cuales fueron purificadas mediante subcultivos.

Inoculación artificial

En el ensayo 2 de invernadero se inocularon plántulas con 4.8 meses de edad, con una suspensión de 1 x 10^4 conidias de *M. fijiensis*/cc provenientes de cultivos puros del hongo de 15 días de edad, colocados bajo luz contínua a 25

^{0}C. Esta suspensión fué diluída en gelatina al 1% antes de ser asperjada sobre las hojas de banano, la aplicación se realizó mediante un atomizador DeVilbiss modelo 15 con presión constante de 0.7 kg/cm^2, asperjando las tres primeras hojas de plántulas hasta obtener una cobertura total del envés de la hoja. Al momento de secarse la suspensión, las plantas fueron trasladadas a una cámara húmeda con HR mayor del 90%, acondicionada con microaspersores sincronizados a 15 minutos de encendido y 15 minutos de apagado en forma constante durante 10 días después de la inoculación, luz contínua durante los 3 primeros días y temperatura alrededor de los 26 ^{0}C ([2]Riveros 2000, comunicación personal). Luego de este tiempo las plantas fueron trasladadas al invernadero para evaluar la severidad de la enfermedad.

Inoculación natural

Este tipo de inoculación se realizó mediante la exposición de las plántulas a inóculo proveniente de una plantación de banano con dos condiciones de manejo de la plantación: la primera con control cultural y biológico de la enfermedad, control de malezas y condiciones climáticas relativamente menos favorables para el desarrollo de la Sigatoka negra (Anexo 8) y una segunda condición con ausencia de cualquier tipo de control de la enfermedad, sin control de malezas y condiciones más favorables para el desarrollo de la enfermedad que las ocurridas en el primer ensayo (Anexo 10). En ambos casos las plantas estuvieron expuestas durante 10 días dentro de la plantación y seguidamente fueron llevadas al invernadero donde se evaluó la severidad de la enfermedad.

Durante el ensayo 2 de invernadero, se compararon los dos tipos de inoculación (artificial y natural), realizando primero la evaluación de la inoculación artificial y al finalizar ésta, se realizó la inoculación natural sobre hojas nuevas.

En la fase de campo, las plantas recibieron la infección natural por el inóculo presente en la zona de experimentación.

---

[2] Riveros, AS. 2000. Investigadora Asociada Universidad de Tolima-CATIE (comunicación personal). Turrialba, CR.

3.4 VARIABLES DE RESPUESTA

Para la fase de invernadero se evaluó la severidad de Sigatoka negra sobre las tres primeras hojas definidas en el momento de iniciar los tratamientos (4.8 meses de edad). La severidad de la enfermedad se midió 50 días después de la inoculación, de acuerdo a Romero y Sutton (1998); tomando como valor el promedio de la severidad en las tres hojas/planta o repetición. En la fase de campo esta misma variable fue medida cada dos semanas. En ambos casos se utilizó la escala de severidad de enfermedad según la metodología de Stover modificada por Gauhl (1989), la cual consiste en una estimación visual del porcentaje de área foliar afectada en todas las hojas de la planta excepto la hoja candela y las hojas dobladas, por medio de la siguiente escala:

Grado 0 = Hoja sin síntomas visibles
Grado 1 = Hoja con < 1% de rayas o hasta 10 manchas
Grado 2 = Hoja con 1 – 5% de área foliar atacada
Grado 3 = Hoja con 6 – 15% de área foliar atacada
Grado 4 = Hoja con 16 – 33% de área foliar atacada
Grado 5 = Hoja con 34 – 50% de área foliar atacada
Grado 6 = Hoja con > 50% de área foliar atacada

Como estimación de la evolución de esta variable en el tiempo se utilizó el Área Bajo la Curva de Desarrollo de la Enfermedad (ABCDE).

En la fase de campo, para tener una mejor estimación del efecto de los tratamientos sobre la enfermedad, se midió igualmente cada dos semanas el índice de severidad, el cual considera además del grado de severidad de la hoja, la posición que ésta ocupa en la planta, asignando los siguientes factores de corrección de acuerdo al número de la hoja:

No. de hoja	*Factor de corrección*	*No. de hoja*	*Factor de corrección*
1 y 2	60	10	25
3	55	11	20
4	50	12	15
5	45	13	10
6	40	14	5
7 y 8	35	>14	1
9	30		

Se evaluó también en condiciones de campo las variables Periodo Total (Período de incubación= HMJE x Emisión Foliar + Periodo de transición=HMJM -HMJE x Emisión foliar) y Hojas Totales (Marin y Romero 1992; Bandeco 2001). HMJE = hoja más joven enferma, HMJM = hoja mas joven con mancha.

Índice de aposiciones fluorescentes

Mediante microscopía de luz se determinó la presencia de aposiciones fluorescentes en tejido de banano con y sin inóculo del patógeno, expuestos bajo condiciones de invernadero a los inductores de resistencia en presencia y en ausencia total de la fuente de energía.

Después de once días de la inoculación artificial (Riveros 2000. Comunicación personal) y 14 días de la inoculación natural, se tomaron 10 discos de hoja de 2 cm de diámetro/tratamiento, provenientes de la zona media de la segunda hoja completamente expandida al momento de la inoculación.

Las muestras fueron fijadas en solución de ácido acético glacial : alcohol al 95% (1:2), seguido por una serie de deshidratación en etanol al 25%, 50%, 70%, luego se colocaron en NaOH al 10% durante 48 horas, seguidamente se realizó un lavado con solución buffer K_2HPO_4 0.15M, pH 8.9 por 30 minutos, y finalmente las muestras fueron teñidas con solución alcalina de azúl de anilina, durante 12 horas. Al cabo de este tiempo las muestras se examinaron bajo un microscopio Nikon, utilizando luz fluorescente.

El índice de aposiciones fluorescentes fue medido en 5 campos ópticos/disco de hoja, con un aumento de 100 X con base en la escala descrita por Riveros (1995):

0: sin aposiciones fluorescentes
1: muy pocas aposiciones fluorescentes
2: algunas aposiciones fluorescentes muy dispersas
3: aposiciones presentes
4: aposiciones fluorescentes coalescentes

3.4.1 Microscopía electrónica

Muestras de tejido de plantas expuestas a Asm en condiciones de campo fueron procesadas para Microscopía Electrónia de Barrido (MEB) y Microscopía Electrónica de Transmisión (MET), bajo las técnicas convencionales de fijación y deshidratación descritas en el anexo 16.

Como variable vegetativa, se determinó la altura de las plantas, medida desde el suelo hasta el vértice de la primera hoja con el tallo, al final de la evaluación de la severidad de la enfermedad en condiciones de invernadero. En la fase de campo se midió en igual forma la altura de las plantas, 20 semanas después de iniciar los tratamientos.

3.4.2 Prueba de sensibilidad a Asm

Al finalizar la fase de campo, se midió el porcentaje de reducción del tubo germinativo por acción in vitro de Asm. Para esto se tomó tejido con fructificación del hongo, a partir de plantas que recibieron SOE sin la fuente de energía; y tejido con iguales condiciones, proveniente de una finca comercial de Bandeco. Las muestras se incubaron en cámara húmeda durante 48 horas, al cabo de este tiempo mediante inmersión de las muestras en agua destilada por 5 minutos, se indujo la descarga de ascosporas sobre medio agar al 2%, que contenía las siguientes concentraciones de Asm: 0, 0.01, 0.1, 1 y 10 ppm. Las esporas se incubaron para su germinación a 26 °C por 48 horas, en el momento preciso de finalizar esta incubación, se realizaron lecturas de la

longitud del tubo germinativo de 30 ascosporas por concentración, usando tres repeticiones.

3.5 ANÁLISIS DE LA INFORMACIÓN

Los datos provenientes de cada uno de los ensayos de la fase de invernadero, fueron analizados con base en un diseño de parcelas divididas dentro de un diseño completamente aleatorizado, con tres repeticiones. El modelo matemático fue el siguiente:

$$Y_{vijkl} = \mu + V_v + \varepsilon_{vl} + C_i + M_j + T_k + (VC)_{vi} + (VM)_{vj} + (VT)_{vk} + (CM)_{ij} + (CT)_{ik} + (MT)_{jk} + (VCM)_{vij} + (VCT)_{vik} + (CMT)_{ijk} + (VCMT)_{vijk} + \varepsilon_{vijkl}$$

Donde : Y_{vijkl} = Variable de respuesta
μ = Promedio general
V_v= Parcela grande: Cultivar, con v = 1,2
ε_{vl}= Error asociado a la parcela grande
C_i = Efecto del sustrato a base de compost, con i = 1,2
M_j = Efecto de la melaza, con j = 1,2
T_k= Parcela pequeña : Efecto de los agentes de control (0=agua, A=Asm, B= rizobacteria), con k= 1,2,3.
ε_{vijkl} = Error Experimental
l = 1, 2, 3. Repeticiones

Al interior de cada cultivar se realizó un análisis factorial 2^2 x 4 + 1 para Gran Enano, para el cultivar FHIA 23 se utilizó un arreglo factorial 2^2 x 3 + 1 en el ensayo 1 de invernadero. En el ensayo 2, se usó un factorial de 2 x 4.Todos estos arreglos factoriales se establecieron sobre un diseño completamente aleatorizado.

La comparación de la inoculación natural con la inoculación artificial se obtuvo a través de la significancia de la media de la diferencia por medio de la prueba T mediante el sistema SAS.

Para la fase de campo se utilizó arreglo factorial de 2 x 5 sobre un Diseño de Bloques al Azar, con tres replicaciones. El factor lombricompost fue evaluado por su presencia y ausencia, sobre cinco tratamientos. El modelo matemático para esta fase fue el siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + C_i + T_i + \beta_k + C_iT_j + T_i\,\beta_k + C_iT_j\,\beta_k + \varepsilon_{ijkl}$$

Donde Y_{ijkl} = Variable de respuesta
μ = Promedio general
Ci= Lombricompost con i= 2
T_j= Efecto de tratamientos con j=5
β_k = Efecto de bloques con k=3
ε_{ijkl} = Error experimental con l= 3 repeticiones

Se utilizó el procedimiento Generalized Linear Models (GLM) del sistema SAS versión 8 (1999).

4.RESULTADOS

4.1 Fase de invernadero

4.1.1 Ensayo 1

La respuesta de los tratamientos estuvo influenciada por el tipo de cultivar. Gran Enano mostró un alto grado de susceptibilidad a la enfermedad, mientras que FHIA 23 exhibió un alto grado de resistencia (Figura 1; Anexo 1).

En Gran Enano se hallo efecto altamente significativo del lombricompost sobre la variable severidad, sin efecto de la melaza, con influencia significativa de los tratamientos y de la interacción lombricompost por tratamientos (Figura 2; Anexo 2).

Se detectó efecto altamente significativo de Asm sobre severidad. Se encontraron síntomas de toxicidad expresada por emisión de hojas nuevas de forma lanceolada, engrosamiento del tallo y la hoja tratada presentaba textura coriácea. La fuente de energía no favoreció el nivel de expresión de resistencia obtenido mediante Asm (Figuras 2 y 3).

Las hojas que emergieron luego de la aplicación del producto y que no recibieron este en forma directa, presentaron mayores niveles de severidad que las hojas tratadas localmente.

En el cultivar Gran Enano la rizobacteria PF2 no tuvo efecto sobre reducción de la severidad de la enfermedad (Figuras 2 y 3).

El sustrato foliar exhibió buen control, significativamente diferente del testigo 0, no se halló efecto del lombricompost sobre su nivel de control y se encontró poco beneficio del efecto de este sustrato con la adición de melaza. Sin embargo, al igual que los tratamientos con Asm la severidad fue muy baja, dificultando detectar cualquier aporte adicional al control (Figuras 2 y 3). La combinación de lombricompost y melaza, causó una significativa reducción de la severidad en el tratamiento testigo 0 (Figura 1).

En el cultivar FHIA 23, resultó difícil detectar diferencias entre los tratatamientos a los 50 dias después de la inoculación natural (Figura 1). No se encontró efecto del lombricompost y la melaza, ni de los tratamientos sobre la variable severidad (Figuras 5 y 6; Anexo 2).

Al permitir 10 días adicionales para el desarrollo de la enfermedad, aunque ésta aumentó con relación a los niveles encontrados a los 50DDI, no se encontró efecto del LC sobre la severidad, ésta continuó siendo baja; pero en este caso, si se detectó efecto significativo de los tratamientos (Anexo 2).

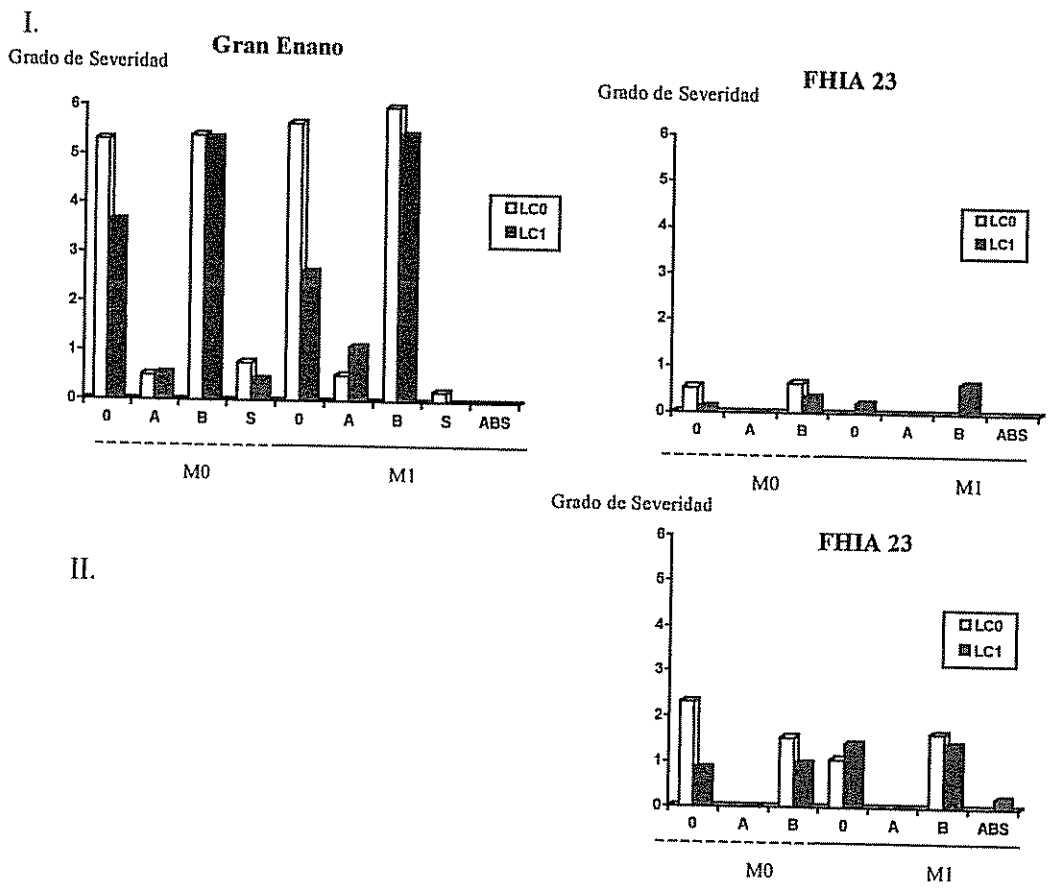


Figura 1. Severidad de Sigatoka negra en los cultivares Gran Enano y FHIA 23. I cincuenta días después de inoculación (DDI), II sesenta DDI. *FE*= Fuente de Energía, *LC* = Lombricompost, *M* = Melaza, *0*: ausencia *1*: presencia. *A* = Acibenzolar-s-metil (2cc de i.a../litro) *B* = rizobacteria *Pseudomonas sp* cepa *PF1* *S* = Sustrato Foliar.

En las figuras 1 y 2, se puede apreciar como en FHIA 23 a los 60 DDI, el Asm y *PF1* en presencia de lombricompost, difieren significativamente del testigo 0, ambos inductores muestran efecto sobre la severidad de la enfermedad. PF1

parece requerir dicho nivel de resistencia, mientras que Asm no, ya que restringió el desarrollo de la enfermedad en el cultivar con bajo nivel de resistencia (Gran Enano).

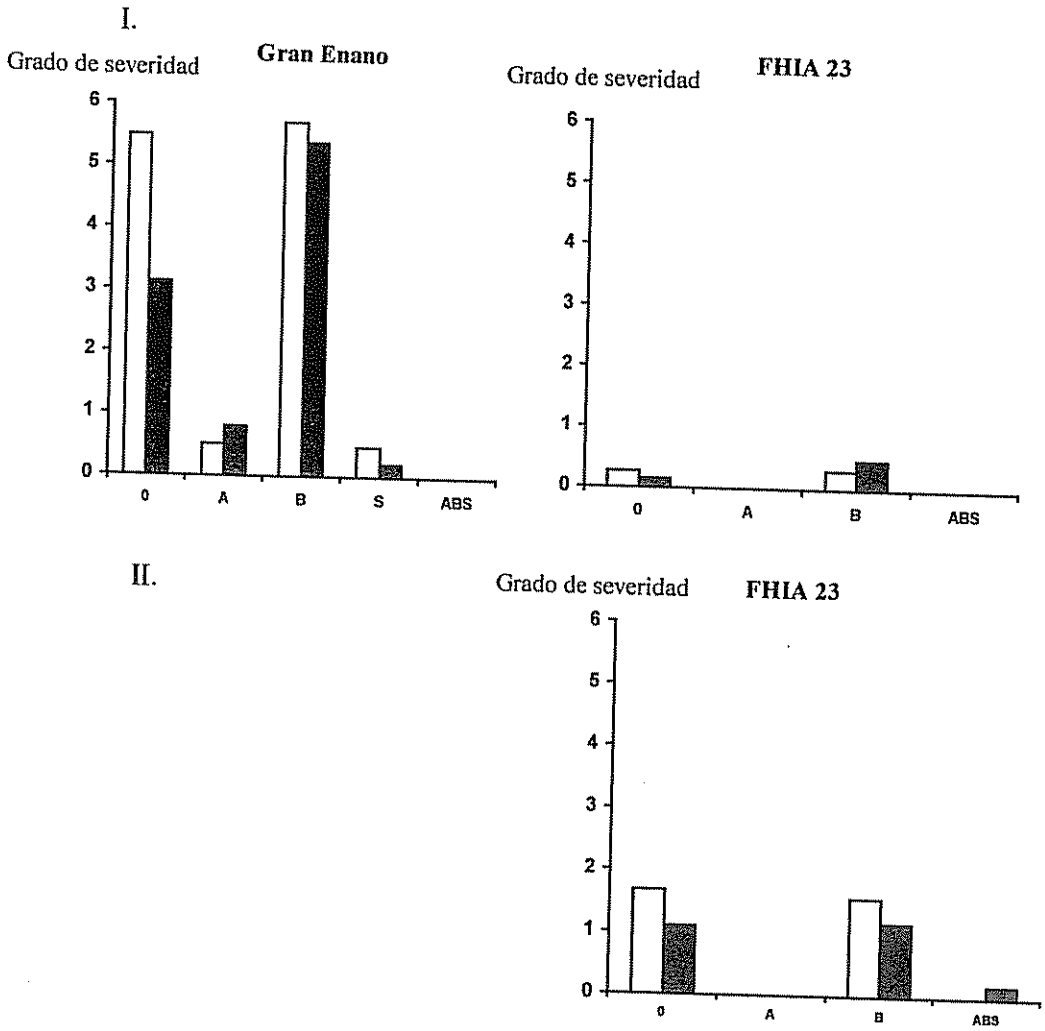


Figura 2. Interacción lombricompost por tratamientos, para severidad de Sigatoka Negra. I cincuenta DDI. II sesenta DDI. Ensayo 1 de invernadero □ = LC0 ■ = LC1

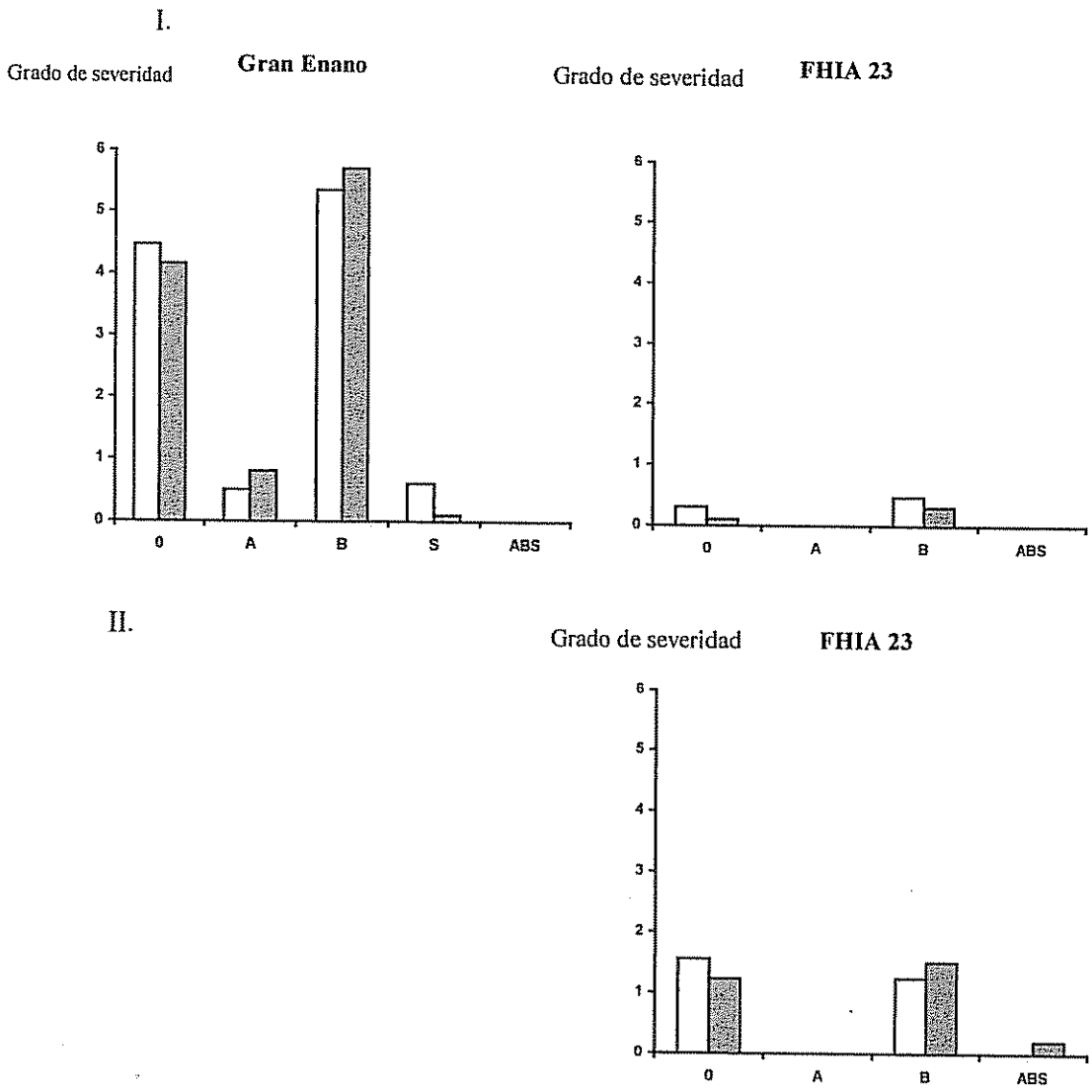


Figura 3. Interacción melaza por tratamientos, para severidad de Sigatoka negra. I cincuenta DDI. II sesenta DDI. Ensayo 1 de invernadero. = M0 = M1.

La aplicación de lombricompost provocó un efecto altamente significativo sobre el incremento en la altura de las plantas. Esta variable resultó influenciada por el cultivar y la aspersión de melaza no mostró relación con la misma (Figura 4; Anexos 1 y 2).

La cepa *PF1* promovió el crecimiento en ambos cultivares, siendo mayor el efecto cuando la bacteria se encontraba en mezcla con lombricompost. No se encontró efecto significativo de Asm sobre la variable altura, al ser comparada ésta con el testigo 0; pero si al comparar su efecto con el testigo mas lombricompost (Figuras 5 y 6).

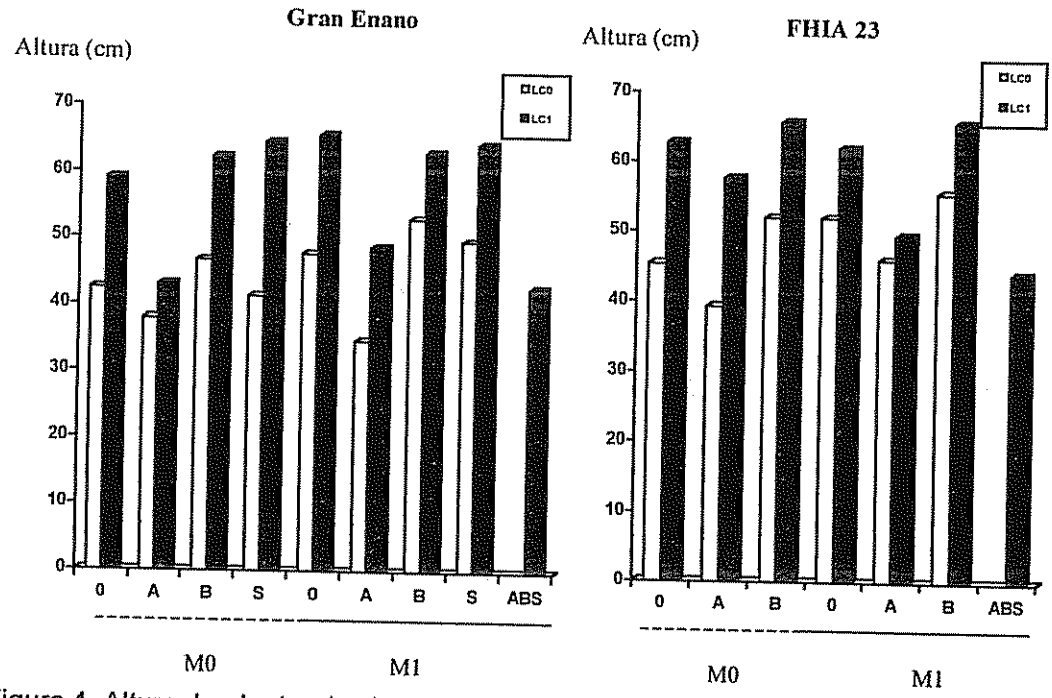


Figura 4. Altura de plantas (cm) medida 50 DDI. Ensayo 1 de invernadero.

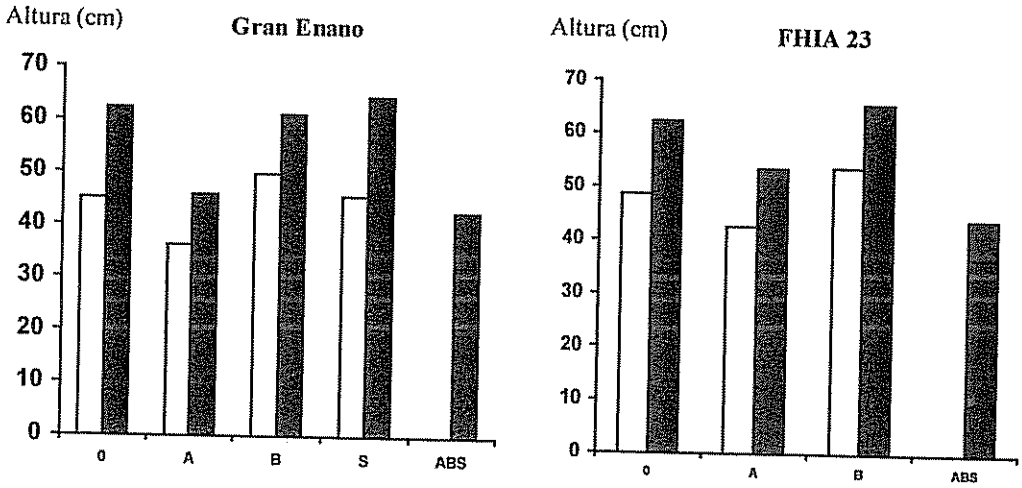


Figura 5. Interacción lombricompost por tratamientos, para altura de plantas. Ensayo 1 de invernadero. □ = LC0 ■ = LC1.

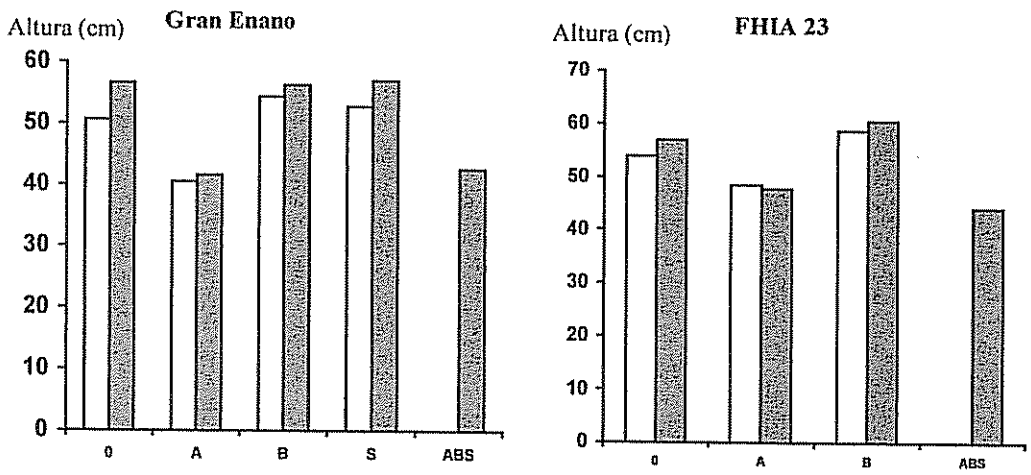


Figura 6. Interacción melaza por tratamientos, para altura de plantas. Ensayo 1 de invernadero. □ = M0 ▩ = M1.

Con respecto a la formación de aposiciones fluorescentes, en este ensayo se encontró mayor índice de este tipo de material celular en tejido inoculado con respecto a tejido sin inocular (Figura 7). En ambos tipos de cultivares, Asm exhibió mayor indice de aposiciones fluorescentes que el testigo inoculado. No se encontró efecto de la fuente de energía sobre dicho índice, ni tampoco incremento de estas aposiciones al comparar el efecto del Asm en los dos cultivares (Figura 8; Anexo 3).

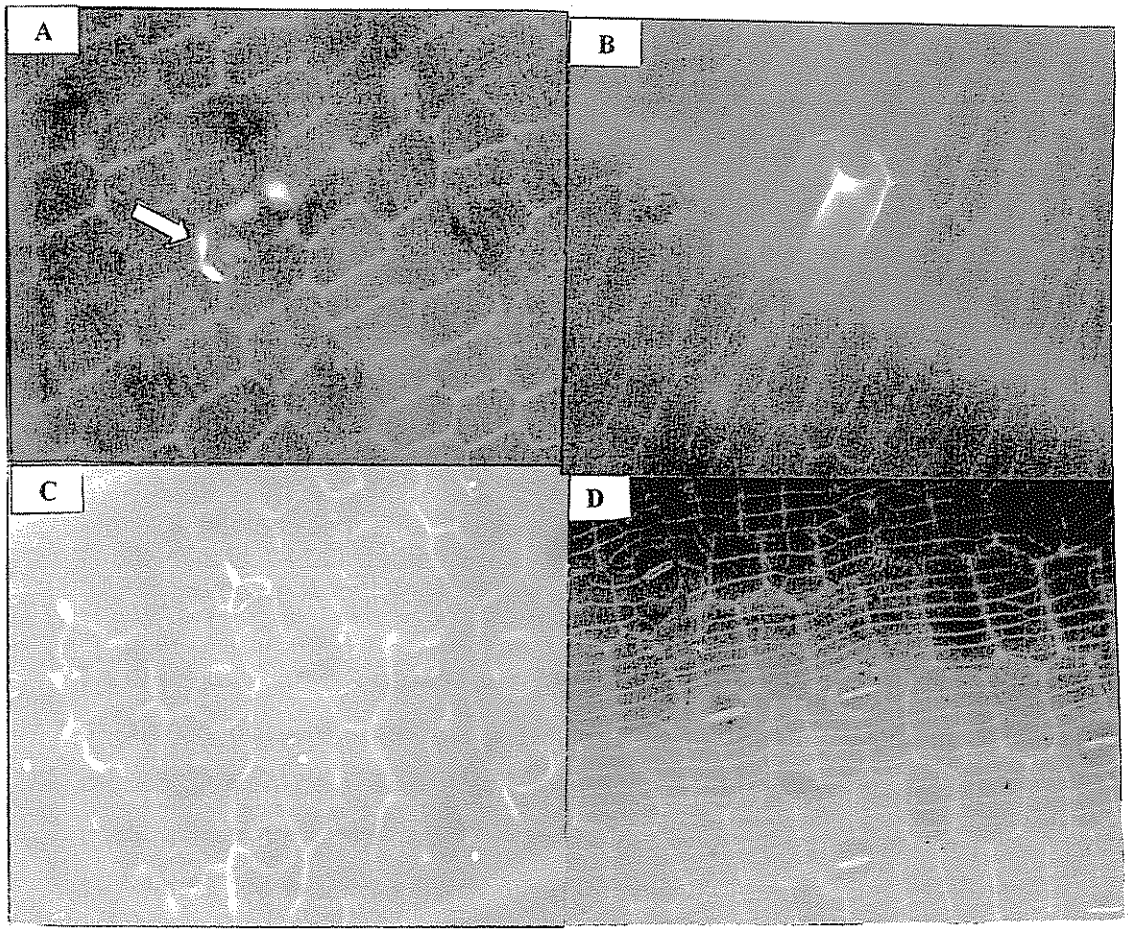


Figura 7. Aposiciones fluorescentes en tejido de hojas de banano. A, B y C tejido tratado con inductores de resistencia e inoculado con *M. fijiensis*. D. tejido no inoculado sin aposiciones fluorescentes.

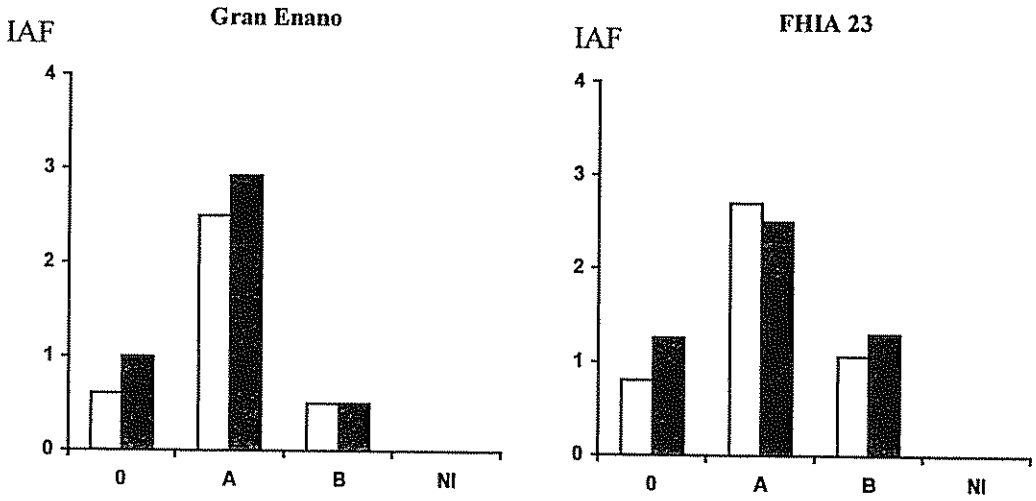


Figura 8. Interacción fuente de energía por tratamientos, para índice de aposiciones fluorescentes. 14 DDI natural. Ensayo 1 de invernadero. □ =Energía 0 ■ = Energía 1. IAF = Índice de Aposiciones Fluorescentes

La dosis de Asm 0.2 cc de i.a./L para las condiciones de inoculación natural y desarrollo de la enfermedad dentro de las cuales fue evaluada (Anexo 9), mostró un nivel de severidad de 0.44 a los 50 ddi, diferente del testigo sin esta dosis donde la severidad fue de 5.06; siendo a su vez similar al nivel de severidad que mostró el mismo tratamiento en el ensayo 1, con valor de 0.50 (Figura 1).

4.1.2 Ensayo 2

4.1.2.1 Inoculación artificial

Con relación a la variable severidad, se encontró efecto de los cultivares, al igual que en el ensayo 1. Se halló efecto altamente significativo de los tratamientos y un efecto significativo de la interacción cultivar por tratamientos (Anexo 4).

En el cultivar Gran Enano, se halló un efecto del lombricompost sobre la severidad de la enfermedad confirmando la tendencia de menor severidad en presencia de esta fuente orgánica. PF2 al igual que FcMf no mostraron capacidad inductora de resistencia y los tratamientos con Asm2 presentaron

menor nivel de enfermedad. Se detectó efecto benéfico del lombricompost sobre la expresión de la resistencia (Figura 9; Anexo 5).

En FHIA 23 no se encontró efecto del Lombricompost sobre la variable severidad de la enfermedad. Se presentó efecto significativo de los tratamientos. PF2 ocasionó menor severidad sobre este tipo de cultivar solo en presencia de lombricompost con relación al testigo 0, aunque sin diferencia estadística. Asm2 indujo resistencia a la enfermedad pero sin encontrar efecto del lombricompost. La FcMf indujo capacidad de defensa en FHIA 23 pero solo en presencia de lombricompost (Figura 9; Anexo 5).

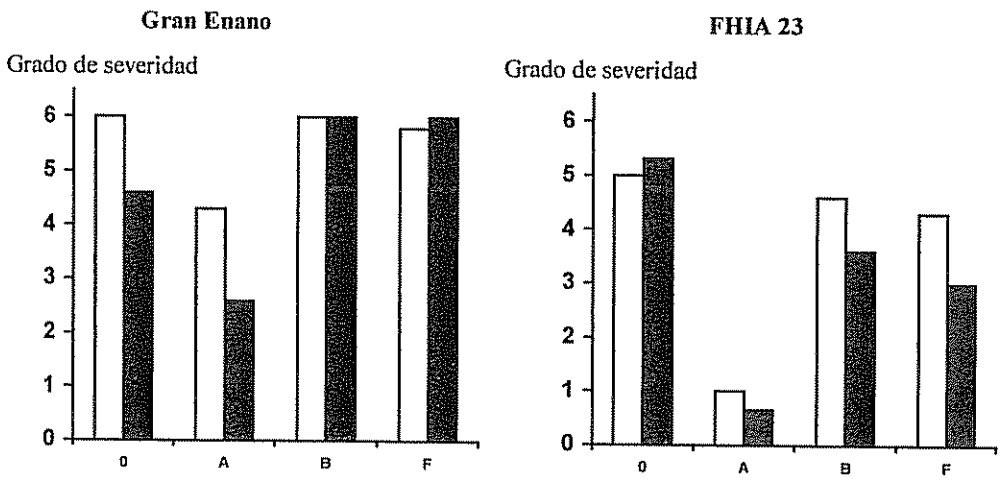


Figura 9. Interacción lombricompost por tratamientos, para severidad de Sigatoka negra, 50 DDI artificial. Ensayo 2 de invernadero □ = LC0 ■ = LC1. *A* = Acibenzolar-s-metil (0.2cc de i.a./litro) *B* = rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* cepa *PF2* F= FcMf.

Tanto en Gran Enano como en FHIA 23, no se observó efecto de ninguno de los tres inductores sobre el índice de aposiciones fluorescentes, tampoco se encontró efecto de la fuente de energía sobre este índice (Figura10; Anexo 6).

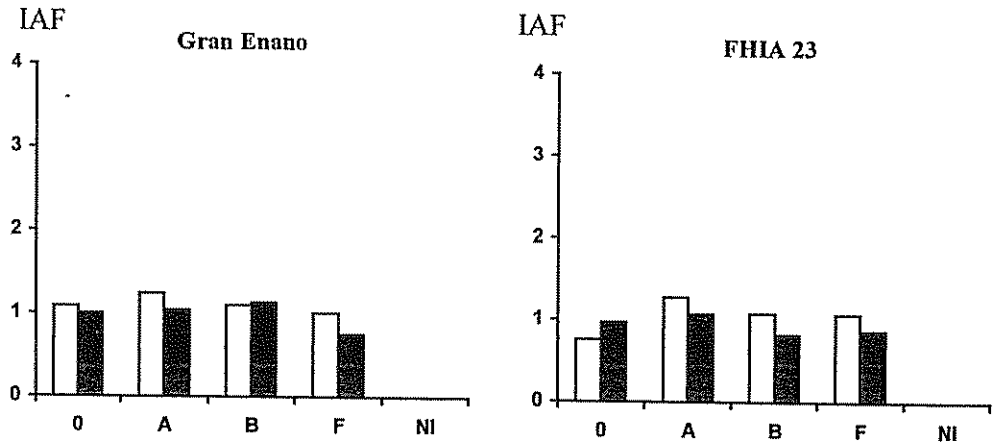


Figura 10. Interacción lombricompost por tratamientos, para índice de aposiciones fluorescentes. 11 DDI artificial. Ensayo 2 de invernadero. □ = LC0 ■ = LC1. IAF = Índice de Aposiciones fluorescentes. NI = tejido no inoculado.

El sustrato foliar redujo significativamente la expresión de la enfermedad, su respuesta no difirió a la de la fuente de quitina sola, y de la fuente de calcio; la fuente de glucano fue el componente que menos redujo la severidad de la enfermedad; sin embargo el nivel de severidad fue menor que la encontrada en el tratamiento testigo 0 (agua) (Figura 11).

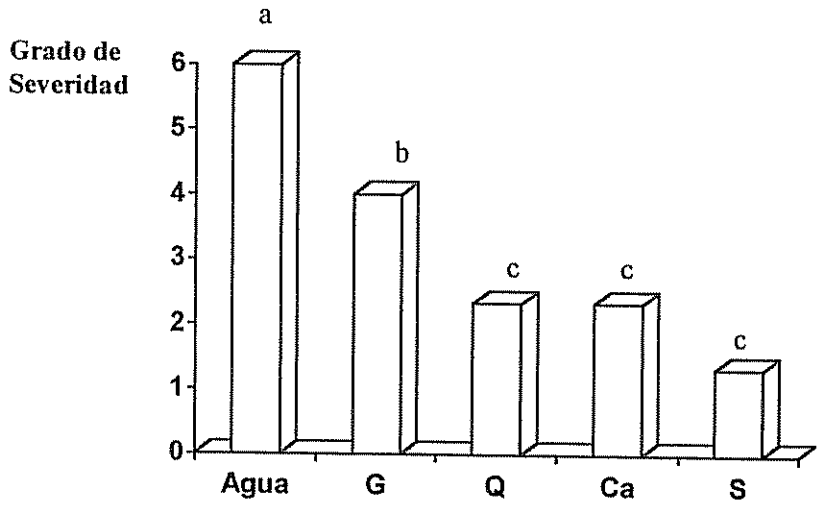


Figura 11. Efecto de componentes del sustrato foliar sobre Sigatoka negra en plantas de Gran Enano,luego de inoculación artificial. Prueba de Tukey, alfa =0.05 diferencia mínima significativa = 1.201; letras iguales no difieren estadísticamente.

4.1.2.2 Inoculación Natural

Con respecto a la inoculación natural llevada a cabo en el ensayo 2 de invernadero, se encontró efecto del cultivar sobre la variable severidad, con efecto significativo de los tratamientos y de la interacción de estos con el cultivar, denotando nuevamente la influencia del cultivar sobre la expresión de la enfermedad y sobre los tratamientos (Figura 12; Anexo 4).

En el cultivar Gran Enano no se detectó efecto significativo del lombricompost sobre la severidad de la enfermedad, sobre esta misma variable se halló efecto de los tratamientos, sin encontrar significancia de la interacción lombricompost por tratamientos (Figura 12; Anexo 5).

La rizobacteria PF2 no redujo la severidad de la enfermedad, en ausencia o presencia de lombricompost. El Asm2 logró inducir defensa, sin encontrar efecto del lombricompost sobre el nivel de indución. La FcMf no logró reducir significativamente la severidad de la enfermedad en ausencia o presencia de lombricompost (Figura 12).

En FHIA 23 se halló un leve efecto del lombricompost sobre la severidad de la enfermedad, efecto significativo de los agentes de control y de su interacción con el lombricompost (Anexo 5).

La rizobacteria PF2 logró reducir la severidad de la enfermedad, solo en presencia de lombricompost. Asm2 indujo resistencia en forma altamente significativa, sin encontrar efecto de la fuente energética sobre la inducción. La FcMf no logró inducir resistencia, a diferencia de lo observado con la inoculación artificial (Figura 12).

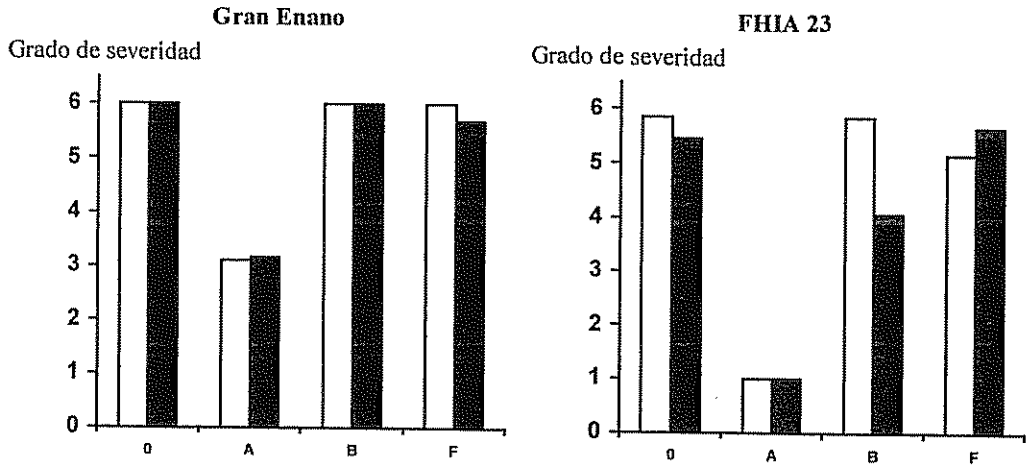


Figura 12. Interacción lombricompost por tratamientos, para severidad de Sigatoka negra, 50 DDI natural. Ensayo 2 de invernadero.□ = LC0■ = LC1. *A* = Acibenzolar-s-metil (0.2cc de i.a./litro) *B* = rizobacteria *Pseudomonas fluorescens* cepa *PF2* F= FcMf.

Con relación a la formación de aposiciones fluorescentes (Figura 13; Anexo 6), se encontró nuevamente formación de estas estructuras en el tejido inoculado, y ausencia de las mismas en tejido no inoculado con el patógeno. Asm2 presentó un incremento significativo en la formación de este tipo de material en presencia de la fuente energética para el cultivar Gran Enano. En FHIA 23 se encontró un alto índice de estas aposiciones en tejido tratado con el mismo inductor, pero en este caso no se encontró relación con el lombricompost. No se detectó estimulo en la deposición de material fluorescente por acción de PF2 o FcMf.

BIBLIOTECA
Centro Interamericano de Documentación e Información Agrícola
IICA - CIDIA

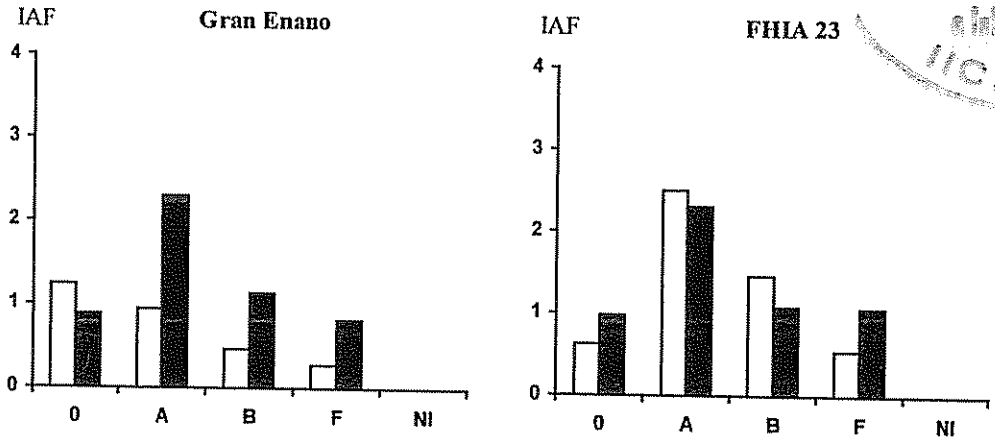


Figura 13. Interacción lombricompost por tratamientos, para índice de aposiciones fluorescentes.14 DDI natural. Ensayo 2 de invernader□ = LC0 ■ = LC1. IAF = Índice de Aposiciones Fluorescentes.

La altura de las plantas presentó relación con el tipo de cultivar, y resultó afectada por los tratamientos (Anexo 4). En ambos cultivares el lombricompost en todos los casos favoreció la altura de las plantas y los tratamientos también afectaron esta variable (Anexo 5). PF2 presentó mayor altura, pero en presencia de lombricompost con respecto a testigo 0. La dosis 2 de Asm no afectó la altura siendo mayor ésta cuando el Asm2 estaba combiando con la fuente de energía (Figura 14).

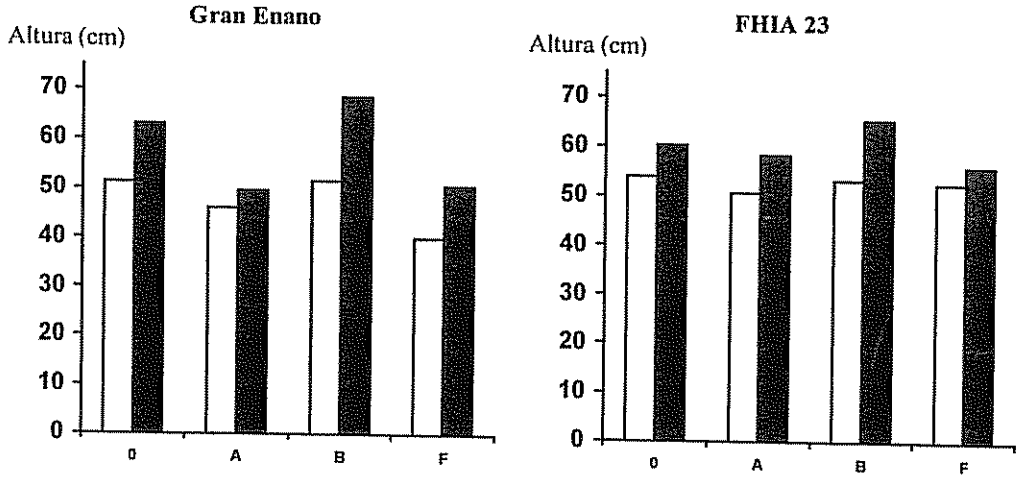


Figura 14. Interacción lombricompost por tratamientos, para altura de plantas. Ensayo 2 de invernadero. □ = LC0 ■ = LC1.

La descomposición del efecto del sustrato foliar sobre la severidad de la enfermedad, no detectó diferencia entre este y la quitina sola; la fuente de glucano no redujo la severidad y el calcio exhibió un leve control (Figura 15).

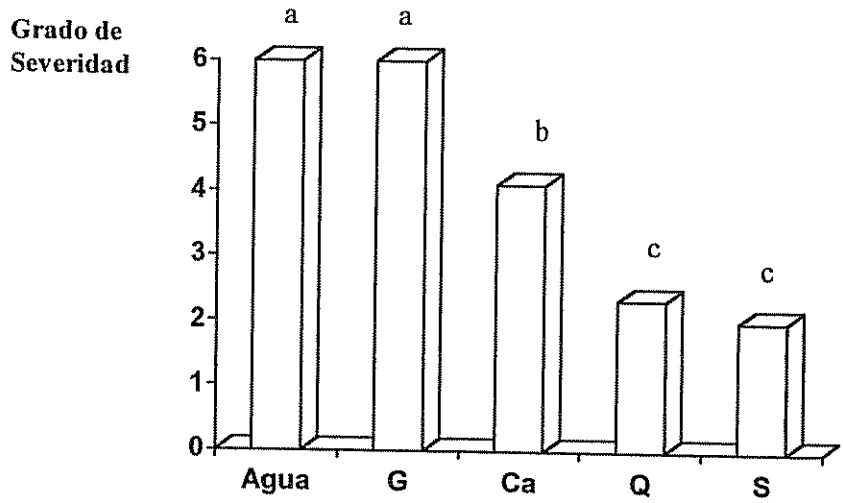


Figura 15. Efecto de componentes del sustrato foliar sobre Sigatoka negra en plantas de Gran Enano, luego de inoculación natural. Prueba de Tukey, alfa =0.05 diferencia mínima significativa = 0.7244; letras iguales no difieren estadísticamente.

Al comparar la evaluación de los tratamientos con los dos tipos de inoculación, se encontró que para el cultivar Gran Enano 11 de 12 tratamientos (91.6 %) se comportaron igual en los dos tipos de inoculación. El tratamiento con calcio resultó más efectivo al evaluar la severidad con inoculación artificial en comparación con la inoculación natural. Para el cultivar FHIA 23, 6 de 8 tratamientos (75 %), se comportaron igual en los dos tipos de inoculación. El tratamiento FcMf con lombricompost mostró menor severidad en condiciones de inoculación artificial con respecto a inoculación natural (Anexo 7).

El comportamiento del lombricompost usado como fuente de energía para los inductores de resistencia evaluados, puede apreciarse en la Tabla 1. La incorporación de este sustrato orgánico promovió el incremento en altura de las plantas para todos los tratamientos, y el aumento de la resistencia inducida en un 71 % de los casos.

Tabla 1. Efecto del lombricompost usado como fuente de energía sobre la altura y la acción de tres inductores de resistencia en dos cultivares de banano.

Indicador	Ensayo	Tratamientos	Gran Enano		FHIA 23	
			LC0	LC1	LC0	LC1
Altura (%)						
	1	Agua	0 *	+39.3	0	+38.2
		Asm1	-10.2	+1.58	-13.2	+27.2
		PF1	+10.2	+47.24	+2.9	+37.5
	2					
		Agua	0	+22.7	0	+11.7
		Asm2	-10.4	-3.25	-6.18	+8
		PF2	+0.6	+33.7	-1.24	+20.1
		FcMf	-22.1	-1.3	-2.48	+4.6
Resistencia (%)						
	1					
		Agua	0 *	+31.5	0	+63.9
		Asm1	+90.5	+90	+100	+100
		PF1	-1.8	-0.5	+33.4	+58.3
	2 I.A.					
		Agua	0	+22.3	0	-0.06
		Asm2	+27.8	+55.6	+80	+86.8
		PF2	0	0	+6.8	+26.8
		FcMf	+2.8	0	+13.4	+40
	2 I.N.					
		Agua	0	0	0	+6.8
		Asm2	+48.3	+47.3	+82.9	+82.9
		PF2	0	0	0	+30.7
		FcMf	0	+5	+11.9	+3.4

* Punto de referencia (testigo agua) para determinar el incremento o disminución en altura o resistencia. LC0= ausencia de lombricompost LC1= presencia de lombricompost. I.A.= inoculación artificial I.N.= inoculación natural.

4.2 Fase de campo

Durante el inicio de esta fase, las plantas se vieron afectadas por condiciones de sequía, ocasionando el retraso en los programas de fertilización y en el inicio de los tratamientos, postergandolo hasta 11 semanas después de la siembra, en lugar de 6 semanas como estaba previsto.

Para las variables severidad e índice de severidad, no se detectó efecto de la fuente de energía, los tratamientos presentaron efecto significativo, sin efecto entre la interacción fuente de energía por tratamientos (Anexo 15).

La inclusión de Asm en el sistema de operación estándard de fungicidas aumentó el control de Sigatoka negra bajo condiciones de campo sin encontrar diferencia entre los dos programas de Asm en ausencia o presencia de la

fuente de energía. No obstante, la reducción en severidad e índice de severidad no fueron significativas (Figuras 16 y 17).

Los tratamientos que incluyeron sustrato foliar presentaron mayores niveles de enfermedad con relación al sistema estándar de control, a excepción de la rotación del sustrato foliar con el sistema estándar más Asm 15 gr /ha cada 20 días en presencia de la fuente de energía. La combinación de esta fuente con el sistema estándar de fungicidas, el programa de Asm 40 gr/ha cada 35 días y la rotación del sustrato foliar con el sistema base de fungicidas exhibió mayores niveles de enfermedad, con relación a estos mismos tratamientos sin dicha fuente (Figuras 16 y 17).

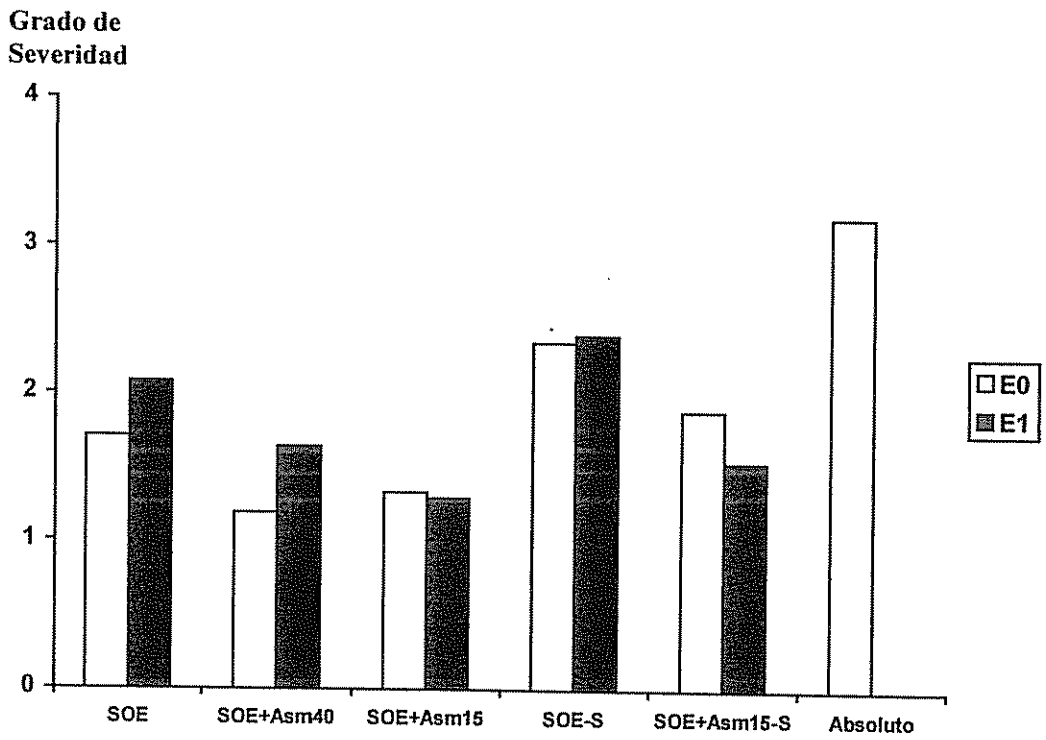


Figura 16. Interacción fuente de energía (E) con tratamientos, para severidad de Sigatoka negra bajo condiciones de campo.

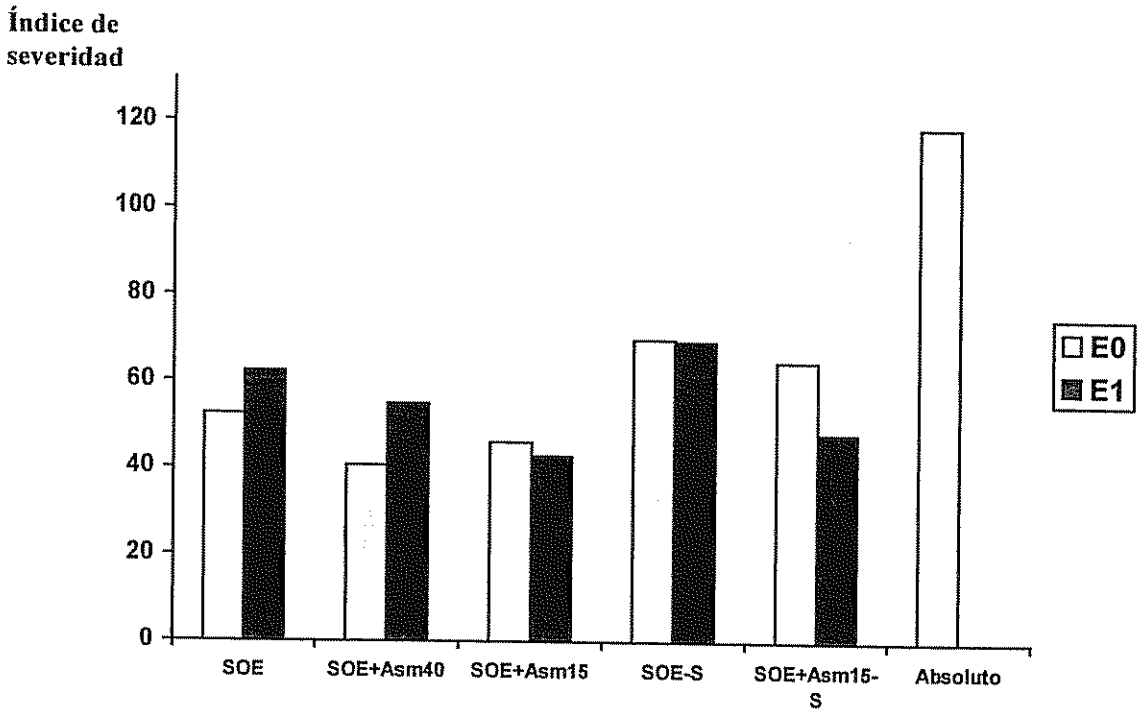


Figura 17. Interacción fuente de energía (E) con tratamientos, para índice de severidad de Sigatoka negra bajo condiciones de campo.

Con relación al periodo total de la enfermedad, este resultó semejante para todos los tratamientos y no hubo efecto de la fuente de energía sobre esta variable (Figura 18; Anexo 15). El número de hojas totales evidenció un efecto altamente significativo y positivo de la fuente energética, mientras que los tratamientos no afectaron su respuesta (Figura 19, Anexo 15).

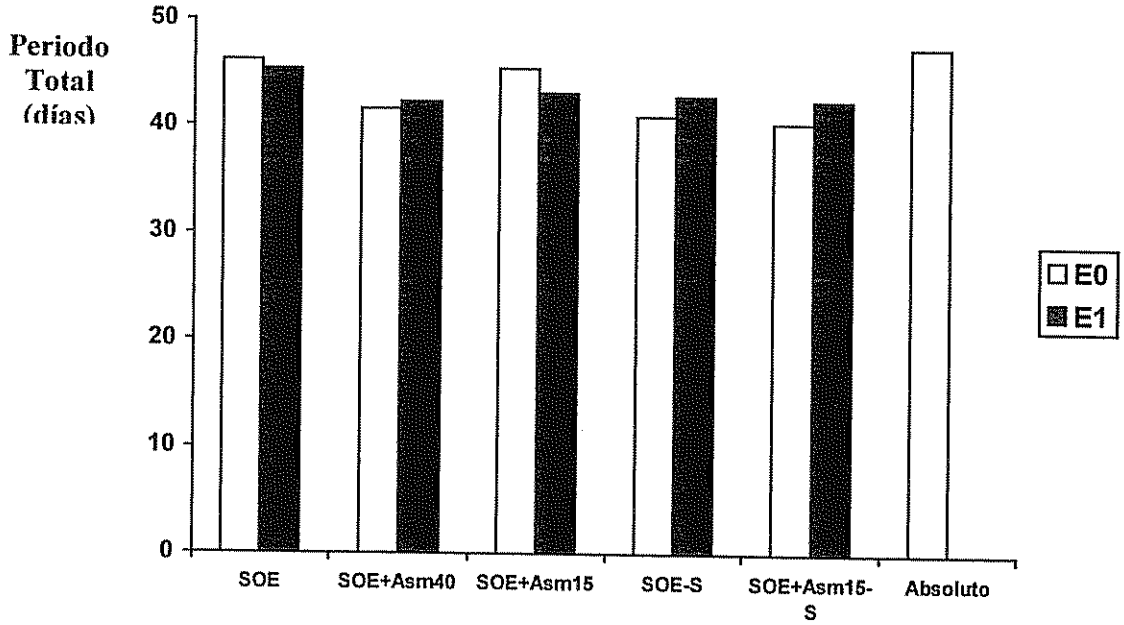


Figura 18. Interacción fuente de energía (E) con tratamientos, para periodo total de Sigatoka negra bajo condiciones de campo.

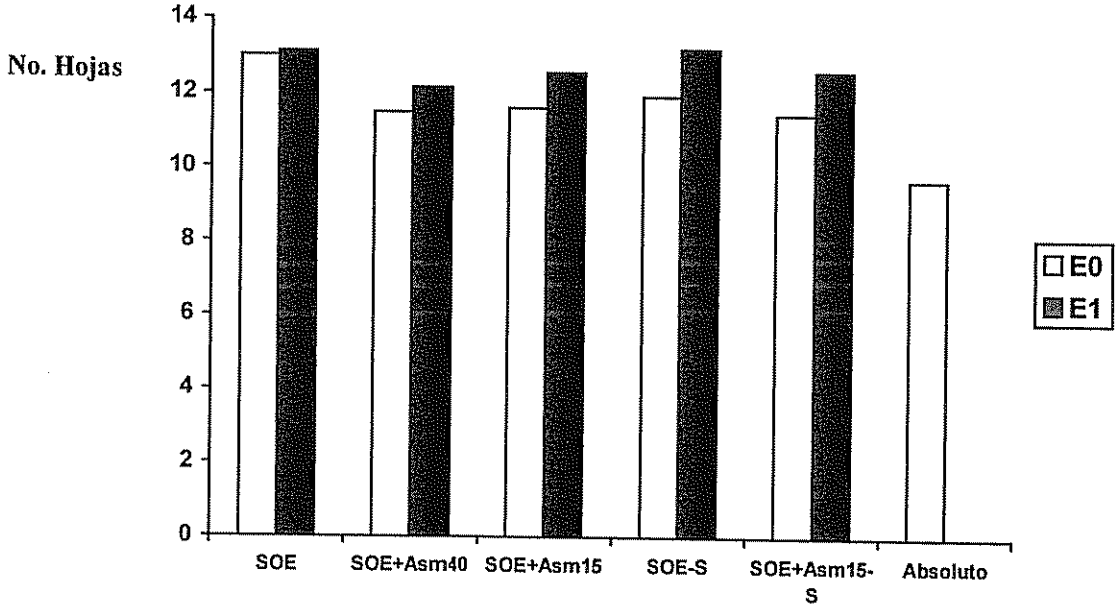
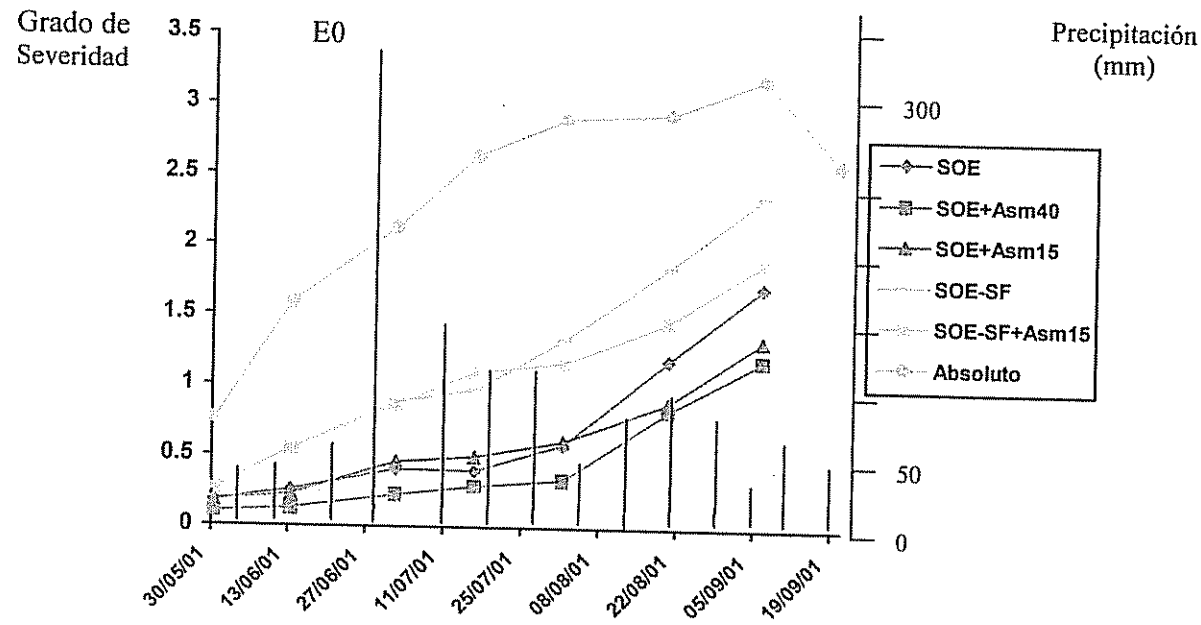


Figura 19. Interacción fuente de energía con tratamientos, para hojas totales bajo condiciones de campo

4.3.1 Area Bajo la Curva de Desarrollo de la Enfermedad

Al analizar el área bajo la curva de severidad de Sigatoka negra de todos los tratamientos a lo largo del tiempo, se encontró una respuesta igual (Anexo 15) a los parámetros de severidad evaluados al final del experimento. Las curvas de los tratamientos que llevaron Asm siempre estuvieron por debajo de la curva de referencia SOE, tanto en ausencia como en presencia de la fuente de energía. El desarrollo de la enfermedad con los tratamientos que incluyeron sustrato foliar estuvo por encima de la curva de referencia, excepto para la curva del tratamiento SOE en rotación con sustrato foliar mas Asm 15 gr/ha cada 20 días en presencia de la fuente de energía, el cual resultó estadísticamente igual al sistema estándar de control (Figuras 20 y 21).



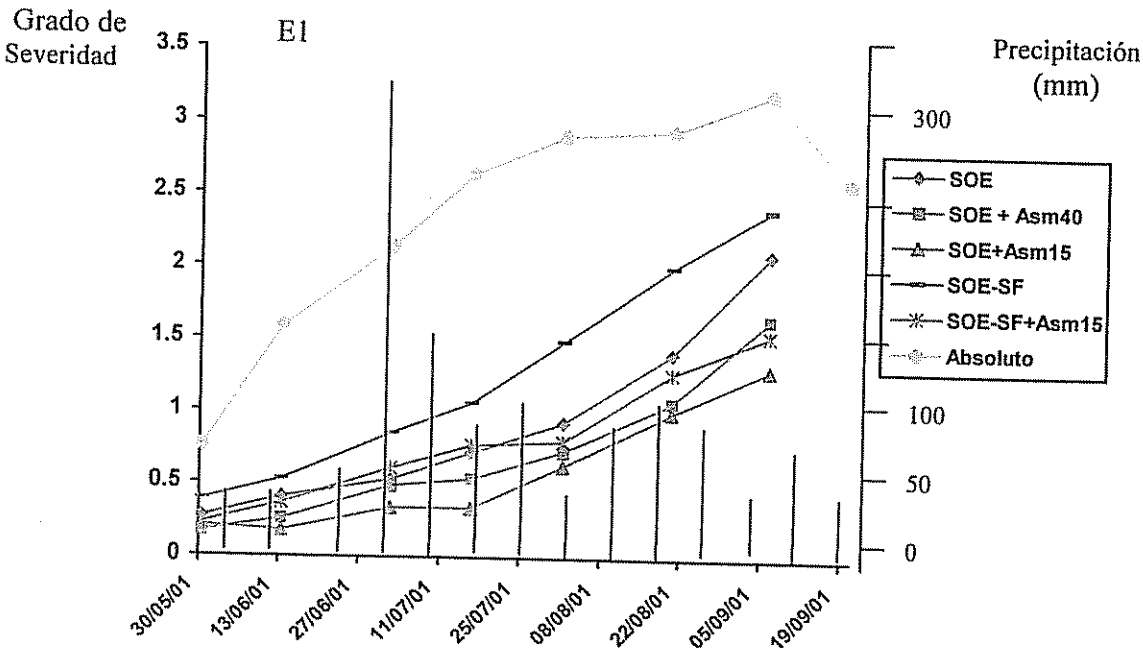


Figura 20. Desarrollo de Sigatoka negra en condiciones de campo. E= Energía. Las líneas verticales corresponden a los niveles de precipitación.

ABCDSE

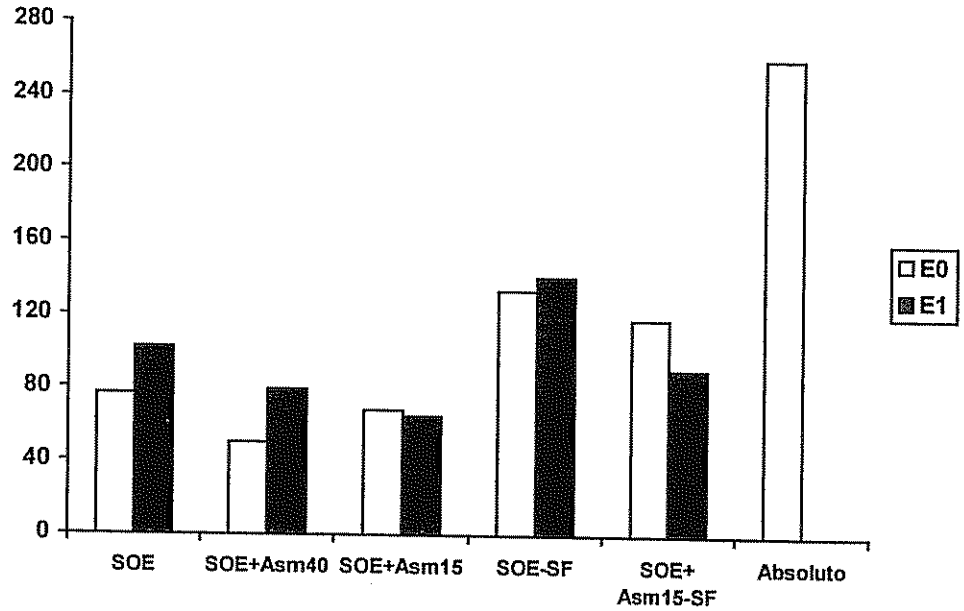


Figura 21. Interacción fuente de energía (E) con tratamientos, para Área Bajo la Curva de Desarrollo de la Severidad de la Enfermedad (ABCDSE) bajo condiciones de campo.

La fuente de energía presentó un efecto positivo altamente significativo sobre altura de las plantas medida siete meses despues de la siembra. En esta edad de las plantas, no se encontró efecto significativo de ninguno de los tratamientos sobre esta variable (Figura 22, Anexo 15).

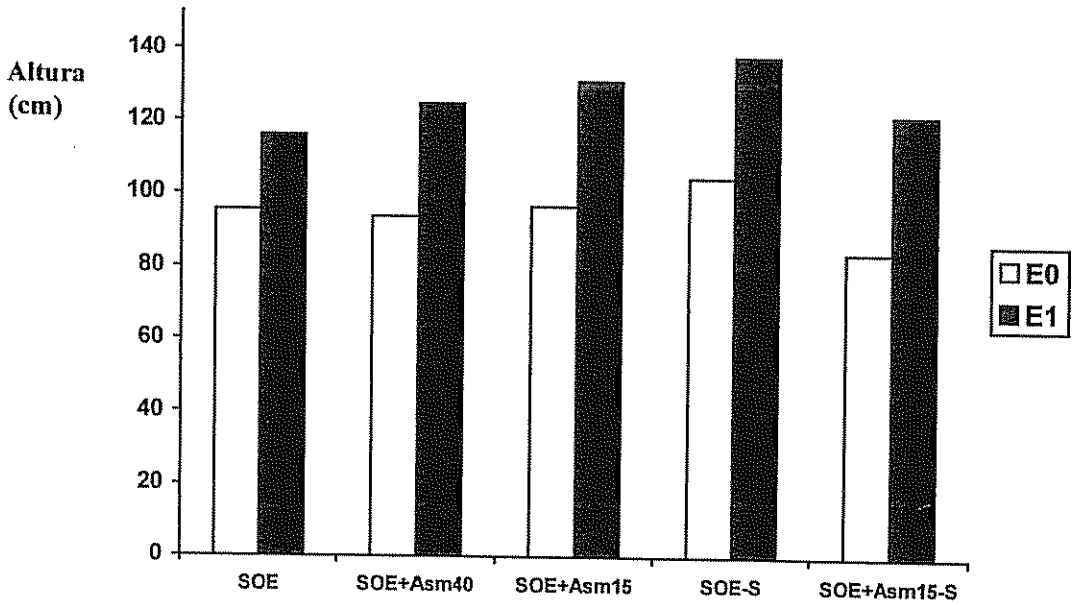


Figura 22. Interacción fuente de energía (E) con tratamientos, para altura de plantas bajo condiciones de campo.

4.2.2 Microscopía electrónica

Las secciones transversales de hoja observadas en MEB, revelaron que el tejido expuesto a Asm desarrolla mayor densidad de parénquima esponjoso, sin embargo; esta densidad no fue constante a lo largo de toda la hoja (Figura 23).

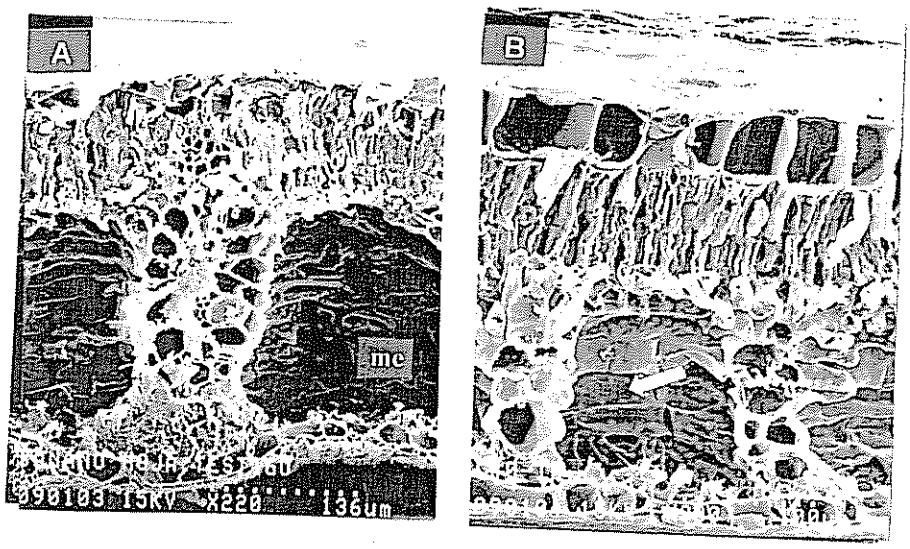


Figura 23. Corte tranversal de hoja de banano. A hoja no tratada con Asm. B hoja tratada con Asm. La flecha indica la densidad en los espacios aéreos del mesófilo esponjoso = me.

Las muestras observadas con MET revelaron una alta diferencia ultraestructural entre las plantas no tratadas y tratadas con Asm. Dentro de estas diferencias se tiene el efecto sobre cloroplastos en el caso de las hojas tratadas, donde estas organelas presentaron gran cantidad de cuerpos osmiofilícos, estas estructuras fueron identificados inicialmente por [3]Corrales (2000 comunicación personal). Igualmente se observó una tendencia a presentarse mayor número de mitocondrias y alteración de los tilacoides del cloroplasto en las células que recibieron este inductor (Figura 24).

[3] Omar Corrales Ávila, Ing. Agr. Syngenta Costa Rica . Desarrollo Banano.

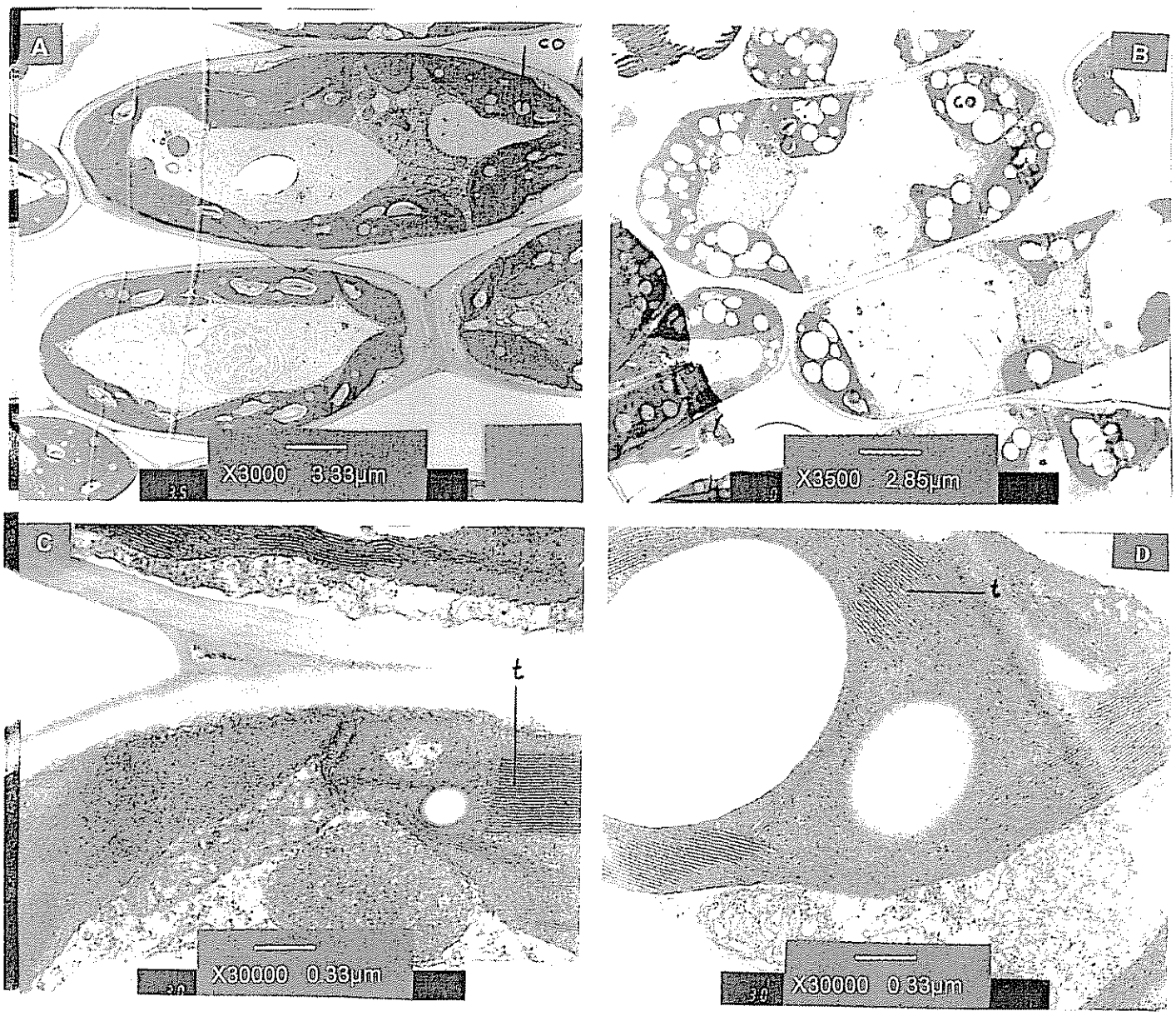
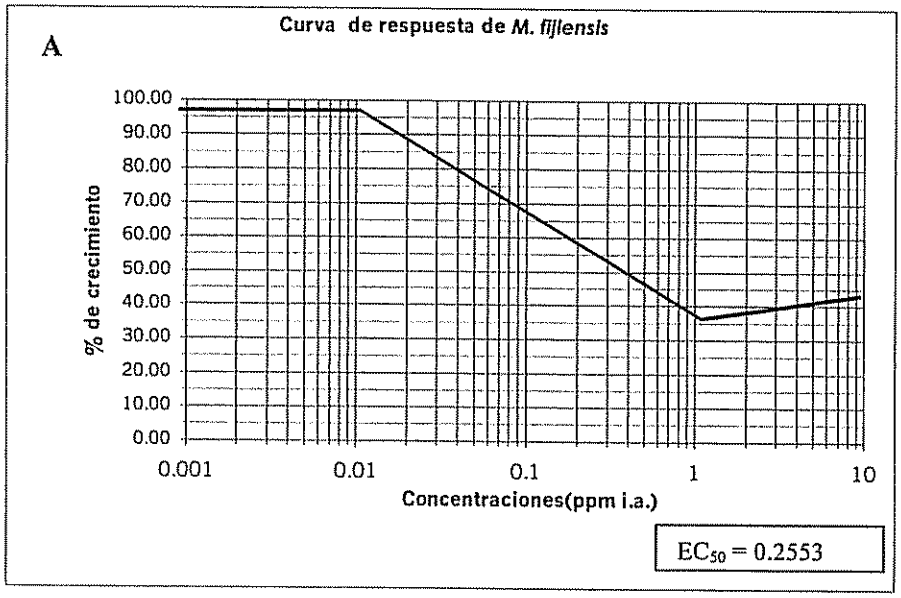


Figura 24. Efecto de Asm sobre células de hoja de banano. Cuerpos osmioílicos: A hoja no tratada. B hoja tratada. Tilacoides: C célula sin Asm. D célula con Asm. co= cuerpo osmiofílico. t= tilacoides.

4.2.3 Prueba de sensibilidad a Asm

Asm mostró reducción en la longitud del tubo germinativo de ascosporas, la reducción fue menor en la muestra tomada del tratamiento SOE en el experimento de campo, donde se encontró una EC_{50} = 0.2553 ppm. En la finca comercial de banano que recibe control estándar de la enfermedad la reducción fue mayor, obteniéndose una EC_{50} = 0.0092 ppm (Figura 25).



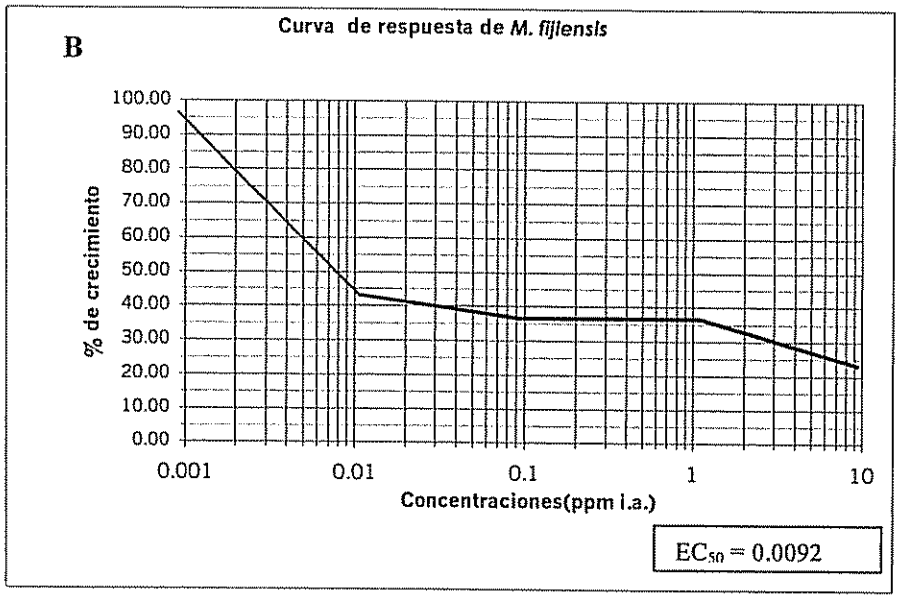


Figura 25. Curva de respuesta del crecimiento del tubo germinativo de ascosporas de *M. fijiensis* a Asm. A. tejido tratado con SOE en el experimento de campo. B tejido tratado con SOE en finca comercial

5.DISCUSIÓN

Para la discusión de los resultados se adoptó la siguiente secuencia: *fase de invernadero:* comportamiento de tratamientos testigos, Asm, rizobacteria, FcMf, aposiciones fluorescentes, sustrato foliar, tipos de inoculación. *Fase de campo:* Asm, microscopía, sustrato foliar. En ambas fases se analiza el efecto de la fuente de energía sobre los tratamientos.

En la **fase de invernadero** con inoculación natural, baja precipitación y medidas de manejo de la enfermedad, se detectó en los **tratamientos testigo** de Gran Enano, un efecto positivo del lombricompost sobre la reducción de la severidad, indicando que entre los microorganismos presentes en este sustrato deben existir especies capaces de activar mecanismos de defensa en la planta, lo cual ha sido encontrado en diferentes estudios (Chen *et al.* 1987; Wei *et al.* 1991;Tränker 1992; Roe *et al.* 1993; Maurhofer *et al.* 1994; Zhang *et al.*1996). Este efecto del lombricompost también se pudo apreciar en FHIA 23 pero en un menor nivel de severidad, debido a la resistencia que posee este cultivar.

Con clima e inóculo muy favorables para el desarrollo y establecimiento de Sigatoka negra, los niveles de severidad fueron muy altos en los testigos; no obstante, en la etapa de inoculación artificial el lombricompost redujo nuevamente en forma significativa la severidad de la enfermedad en el cultivar Gran Enano. Sin embargo con la inoculación natural, el lombricompost no causó en los dos cultivares una reducción de severidad como en los casos anteriores; esto pudo deberse a una alta presión de inóculo constante por 10 días, la cual impidió la acción inductora de resistencia de la posible microflora presente en el lombricompost. La relación inversa entre concentración de inóculo y capacidad inductora de resistencia por acción de compost también fue observada por Zhang *et al.* (1998) en Arabidopsis y su interacción con *Pseudomonas syringae* pv *maculicola.*

En el tratamiento testigo de Gran Enano la reducción en severidad de la enfermedad por el lombricompost pudo ser complementada en forma específica por los azúcares presentes en la melaza, al favorecer la expresión y

estabilidad de genes responsables de defensa (Salzman *et al.* 1998), probablemente activados por la microflora presente en el lombricompost. No obstante; Sancho y Guzmán (1997), no encontraron beneficio de la aplicación de melaza sobre el control de la enfermedad, pero en este caso fueron condiciones de campo y no se incluyó el efecto de un fertilizante orgánico.

La resistencia de FHIA 23 en condiciones de bajos niveles de precipitación y potencial de inóculo cambió drásticamente al presentarse altos niveles de estas variables, observando valores de severidad semejantes a los encontrados en Gran Enano. Guzmán *et al.* (2000) registran como a lo largo de diferentes ciclos de producción el cultivar FHIA 23 ha disminuido su nivel de resistencia, llegando a tener valores similares a la severidad encontrada en el cultivar Gran Enano. El rompimiento en la resistencia de FHIA 23 fue atribuido al posible incremento en la frecuencia de aislamientos del patógeno con capacidad de afectar este cultivar.

Lo anterior indica que la resistencia de un cultivar, está relacionada inversamente con las condiciones agroclimáticas y de presión de inóculo y de enfermedad. Fullerton y Olsen (1995) registran como los niveles de enfermedad y zonas geográficas pueden proporcionar las condiciones para el rompimiento de resistencia a la Sigatoka negra. Sin embargo, desde los trabajos iniciales realizados por Vakili (1968) son pocos los estudios básicos dirigidos a comprender la naturaleza de la resistencia a la enfermedad; durante el presente trabajo no se encontró un estudio tendiente a explicar el tipo de resistencia que presenta FHIA 23, lo cual dificultó explicar adecuadamente las variaciones en pérdidas de resistencia.

En condiciones de baja presión de enfermedad el **Asm** redujó en forma drástica los niveles de severidad de la Sigatoka negra. La acción del lombricompost sobre este inductor no se observó dado el nivel de control alcanzado.

Con baja presión de enfermedad el Asm hizo que el cultivar altamente susceptible, se asemejara a los niveles de defensa que posee FHIA 23. Estas

modificaciones del nivel de resistencia en cultivares susceptibles y su acercamiento a la reacción propia de cultivares resistentes, se ha reportado para otros inductores como el propenazole en arroz (Thieron 1993; citado por Sticher *et al.* 1997), indicando que a pesar de su condición de susceptibilidad es posible activar genes realcionados con la defensa hacia Sigatoka negra.

La fitotoxicidad encontrada con la dosis de 2 cc de i.a de Asm./L afectó la altura de la planta, lo cual coincide por lo reportado en otros estudios que incluyeron este inductor (Godard *et al.* 1999; Pappu *et al.* 2000), atribuyendo esta reducción en altura y otros síntomas externos como clorosis o bronceado del tejido, al costo energético de la planta por desviar sus reservas hacia la síntesis y acción de las sustancias de defensa (Smedegard-Petersen y Tolstrup 1985; Cole 1999; Romero *et al.* 2001).

En condiciones de inoculación artificial el lombricompost si permitió detectar una mejor expresión de la inducción ejercida por Asm aunque este fue aplicado a una dosis menor, la cual mostró un nivel de inducción similar a la dosis alta en condiciones de baja presión de enfermedad. Los niveles de severidad encontrados con este inductor fueron superiores a los de la dosis inicial, indicando que la capacidad inductora de resistencia puede en parte afectarse por la dosis como fue registrado por Godard *et al.* (1999); además la presión de inóculo también juega un papel importante en la capacidad de inducción (Zhang *et al.* 1998).

En condiciones muy favorables para la enfermedad, el Asm elevó el nivel de resistencia del cultivar FHIA 23, el cual perdió su resistencia bajo estas condiciones. Lo anterior señala el gran potencial del inductor sobre este tipo de cultivares, por ejemplo para la alta proporción de area cultivada con FHIA 23 en Cuba (Alvarez 1997).

En el cultivar altamente susceptible, Asm fue el único inductor que logró disminuir significativamente el nivel de severidad en condiciones de inoculación natural muy favorables para el desarrollo de la enfermedad, aunque en menor proporción que bajo condiciones menos favorables, confirmando que la alta

presión de enfermedad afecta la capacidad inductora. Una vez más el Asm presentó mayor reducción de la severidad de la enfermedad en FHIA 23 con relación a Gran Enano, debido a la condición de mayor resistencia que posee este cultivar.

La diferencia en reacción a la enfermedad entre hojas tratadas y no tratadas directamente con Asm, plantea que la activación de las defensas puede ocurrir en forma localizada y no sistémica a través de toda la planta; sugiriendo que una aplicación mas frecuente del producto ofrecería mayor posiblidad para que las hojas reciban el producto en forma directa. Es necesario estudiar la sistemicidad del producto o de sus defensas inducidas en banano, para aumentar el potencial de control de la Sigatoka negra.

Las dos cepas de **rizobacteria** evaluadas no ofrecieron reducción de severidad en Gran Enano, mientras que la disminución de la enfermedad en FHIA 23 mas subsidio energético, apoyan el planteamiento de que éste junto con un nivel de resistencia en el hospedero facilitan la inducción. Van Peer y Schippers (1992) registraron un resultado similar para la inducción de resistencia por acción de *Pseudomonas sp* sobre un cultivar de clavel moderadamente resistente a marchitez por fusarium.

La compatibilidad entre microorganismos biocontroladores y dentro de estos los inductores de resistencia con sus plantas hospederas, es otro factor importante para la inducción de resistencia, como ha sido determinada en los estudios de Smith y Goodman (1999).

La selección de cepas con base en los criterios de pótencial de inducción, necesidades energéticas y compatibilidad con los cultivares y condiciones de cultivo de los bananos comerciales, plantean una línea promisoria de investigación en el manejo de la enfermedad.

Bajo las condiciones del presente estudio, la **FcMf** no redujo la severidad de la enfermedad en Gran Enano, diferente a lo encontrado en FHIA 23 bajo condiciones de inoculación artificial, donde el incremento en defensa fue

significativo con la participación del lombricompost; señalando al igual que con Asm y rizobacteria, que el nivel de resistencia y el subsidio energético son determinantes para la inducción. Sin embargo, no se observó reducción de severidad con la FcMf luego de inoculación natural en condiciones muy favorables para la Sigatoka negra.

La técnica de aplicación foliar de la FcMf, no es comparable con la técnica de inyección reportada por Riveros y Lepoivre (1998) para este inductor, lo que explicaría en parte la diferencia de resultados, teniendo presente además el tipo de cultivares evaluados.

A pesar de lo anterior, se podrían tener resultados diferentes, si se realizaran ajustes de concentración y estabilidad de este inductor u otros derivados del patógeno o de la interacción entre éste con la planta hospedera. Lo anterior permitiría encontrar alguna señal de inducción, la cual pudiera ser mejorada con una fuente de energía apropiada y con facilitadores de su uso, para lograr que la inducción sea eficáz.

La ausencia de **aposiciones fluorescentes** sobre las células no inoculadas, indica que este tipo de reacción es una respuesta natural de la planta ante la infección. La no difererencia entre el índice de aposiciones fluorescentes entre cultivares, plantea que la resistencia a la Sigatoka negra en FHIA 23 no es atribuible a este tipo de reacción. Con el uso de la FcMf no se registró incremento en el material fluorescente, lo cual difiere de lo reportado por Riveros y Lepoivre (1998), cuando se inyectó la FcMf en un cultivar altamente resistente en ausencia del hongo. Esto indica que el nivel de aposiciones puede variar con el tipo de inductor, la técnica de aplicación, el cultivar y el patógeno.

El incremento en índice de estas aposiciones por acción de Asm, confirma que esta molécula además de activar defensa química como PR's y fenoles (Görlach *et al.* 1996; Benhamou y Bélanger 1998) también puede obstaculizar la penetración del hongo, como ha sido reportado en trigo y tomate (Görlach *et al.* 1996; Benhamou 1996). No obstante; la ausencia de incremento de este

material luego de inoculación artificial, sugiere que el tipo de inóculo y técnica de inoculación pueden afectar la detección de esta respuesta.

El **sustrato foliar** bajo condiciones de inoculación artificial y natural y posterior evaluación en invernadero, fue un tratamiento muy eficaz en el control de la enfermedad, lo cual coincide con los resultados de Ruiz-Silvera *et al.* (1997) y Arango (2000). Los niveles bajos de precipitación y el manejo de la enfermedad en la plantación, mejoraron la efectividad del tratamiento. El nivel de control no permitió observar incremento significativo en control, al combinar el sustrato foliar con el Asm, o al incluir lombricompost o melaza.

Mediante la evaluación individual de los componentes del sustrato foliar, la quitina y el calcio actuaron como los componentes principales. El sustrato foliar en condiciones muy favorables para el desarrollo de la enfermedad, presentó menor control con respecto a condiciones menos favorables; indicando una vez más que la mayor presión de inóculo, afecta significativamente el potencial de control de los tratamientos.

La quitina además de aportar el sustrato para la selección, establecimiento y acción de microoganismos quitinolíticos, como lo reporta Arango (2000), también puede actuar impidiendo la germinación y penetración del hongo (Kokalis-Burelle *et al.* 1991) o bien como inductor de resistencia (Kokalis-Burelle 2001).

El calcio probablemente contribuye al efecto de control ejercido por el sustrato foliar, debido a sus cualidades sobre el reforzamiento de pared celular del hospedero, a la inhibición de la enzima poligalacturonasa o al afectar la germinación y metabolismo del hongo (Chardonnet *et al.* 2000). Se debe estudiar el efecto que pueda tener este elemento sobre el patógeno y la acción de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas, con base en el reporte de incremento en la eficacia de agentes de control biológico, como lo plantea Wisniewski *et al.* (1995).

A pesar de la semejanza en la respuesta de los tratamientos al evaluarlos después de los **dos tipos de inoculación**, se considera mas representativo, económico y confiable trabajar con inoculación natural, ya que con este tipo de inoculación, dependiendo de las condiciones climáticas, generalmente predominan las ascosporas sobre las conidias, siendo las primeras más importantes para el desarrollo de la enfermedad (Gauhl 1990).

La inoculación natural puede resultar más eficaz que la artificial, si se tiene presente que en la primera, las hojas se exponen a una inoculación continua, como ocurre en condiciones naturales, mientras que en inoculación artificial es una sola inoculación en el tiempo.

En la **fase de campo** la reducción en los niveles de enfermedad al incluir **Asm** en el sistema de operación estándar de fungicidas, coincide con lo reportado por Madrigal *et al.* (1998), aunque en el presente estudio no se obtuvieron diferencias estadísticas. Las ganancias en control fueron del orden de 30.4 % y 22.2 % en menor severidad para los programas de Asm 40 y 15 gr/ha respectivamente; similar a la reducción de 20.6 % reportada por Madrigal *et al* (1998) para el primer programa, igualmente con referencia a una práctica estándar de control.

Aunque no se encontró diferencia entre los dos programas de Asm, es importante tener presente el estudio de Godard *et al.* (1999), en el cual se indica que los máximos de inducción de SAR mediante la aplicación de BTH ocurren los primeros días después del tratamiento, sugiriendo que un programa de mayor frecuencia de aplicación, tendría más picos de expresión de defensa con relación a un programa de menor frecuencia. Sin embargo, esta observación requiere ser estudiada en banano.

El uso de Asm en el control de enfermedades generalmente reporta efecto de esta molécula sobre los patógenos, con resultados inconsistentes en el incremento en control al combinar este inductor con programas estándar de control químico. Cole (1999) obtuvo incremento en el control de *P. syringae* pv *tabaci* al combinar BTH con oxicloruro de cobre, Alexander y Graves (2001)

también registran ganacia en el control de *P.s.* pv. *tomato* al incluir el inductor dentro del programa base de bactericidas. Sin embargo, Romero *et al.* (2001) no lograron aumentar el control de *Xanthomonas axonopodis* pv *vesicatoria* en *Capsicum annum*. Lo anterior señala que el tipo de planta, cultivar y patógeno son determinantes para el potencial de inducción.

La curva de sensibilidad a diferentes dosis de Asm indica que el producto puede afectar la capacidad de elongación del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis*, lo que lleva a no descartar un efecto antimicrobial directo sobre alguna etapa de desarrollo del patógeno. No obstante, este resultado requiere ser corroborado con diferentes aislamientos del patógeno, antes de deducir una participación de un modo de acción directa del producto, adicional al efecto sobre la inducción de resistencia. La observación registrada en la fase de invernadero, sobre la mayor eficacia local de Asm, enfatiza sobre la necesidad de comprender con presición el efecto sistémico de control en la planta de banano.

La mayor cantidad de glóbulos osmiofílicos y la tendencia a mayor número de mitocondrias encontradas en tejido tratado con Asm, encontados en el estudio de **microscopía**, pueden estar indicando un alto metabolismo en la célula activada, como lo sugieren Cole (1999), Griesbach *et al.* (2000), Romero *et al.* (2001). La naturaleza de estos glóbulos debe ser determinada, para comprender mejor los mecanismos de acción, así como para conocer las implicaciones a nivel celular que puede estar conllevando la inducción de SAR a través de Asm.

La densidad mayor de parénquima esponjoso observada en tejido tratado con Asm, pudiera estar relacionada con la textura coriácea que se aprecia en hojas con lesión avanzada de bronceado. De igual forma las alteraciones sobre la membrana interna del cloroplasto y el alto número de cuerpos osmiofílicos, podrían explicar dicho síntoma característico de plantas tratadas.

La fuente de energía, representada en el lombricompost complementado con fósforo y calcio, no favoreció la acción de Asm en condiciones de campo. Este

resultado puede explicarse por la presión de inóculo y las condiciones de estrés, en especial hídrico, a que se vieron sometidas las plantas; lo que probablemente desvió la energía a utilizar en la inducción.

El aumento en severidad de la enfermedad en algunos de los tratamientos que incluyeron materia orgánica, puede interpretarse como predisposición de las plantas a la enfermedad, debido a desbalances de elementos nutricionales, como lo referencia Romero (1998) para la relación N/K. Sin embargo, Oluma y Oneyezili (1999) registran reducción de la enfermedad en plantaciones que presentaban mayores contenidos de materia orgánica. Estos resultados deben tener una influencia importante del tipo de suelo y por lo tanto no son comparables. Se requiere de estudios tendientes a determinar el efecto de la fertilización orgánica sobre la Sigatoka negra, más aún con el actual interés de establecer sistemas de manejo orgánico del cultivo de banano.

La mayor altura de las plantas en presencia de materia orgánica, es un factor que también pudo desfavorecer el control, pués en estas plantas la cobertura de las aplicaciones terrestres disminuye con relación a plantas de menor tamaño.

En las condiciones de campo donde fue evaluado el **sustrato foliar**, no se obtuvo un acercamiento al control estándard de la enfermedad, aunque si se logró reducción de la enfermedad con respecto al testigo absoluto. Arango (2000) reporta para un programa de rotación de este sustrato foliar con fungicidas sistémicos y un volumen de aplicación terrestre de aproximadamente 110 litros/ha con niveles de precipitación de 2500 mm/año, un nivel de control estadísticamente similar al ofrecido por un programa basado solo en fungicidas tradicionales. Argumentos económicos y prácticos de aplicación, además del grave problema de resistencia de *M. fijiensis* a fungicidas sistémicos, sustentan la dificultad de adaptar el programa encontrado por Arango (2000) a condiciones de manejo comercial de la enfermedad, en zonas con precipitación anual superior a los 2500 mm como la que presentó la zona donde fueron evaluados los tratamientos (3600 mm).

El nivel de control aceptable encontrado con el sustrato foliar en las primeras etapas de la fase de campo, con baja presión de inóculo, indican mayor probabilidad de efectividad de este sustrato en épocas agroclimáticas de menor precipitación, o en zonas con condiciones menos favorables para el establecimiento y desarrollo de la Sigatoka negra. Igualmente, se requiere realizar ajustes en la formulación del sustrato foliar, equipo de aplicación y programación, para tener una aproximación válida en sistemas estándares de control de Sigatoka negra.

La inclusión de Asm en la rotación del sustrato foliar con el sistema estándar de fungicidas en presencia de la fuente de energía, mejoró el control ofrecido por el sistema estándar solo, aunque no en forma significativa. Este resultado sugiere que este inductor pudo extender la acción de los fungicidas y favorecer el efecto del sustrato foliar o bien la ganancia en control puede ser atribuida a la acción conjunta del Asm y el sustrato foliar. Chen *et al.* (1996), encontraron un mejor control de enfermedades causadas por oomycetos en tabaco, al combinar el inductor sintético INA más el biocontrolador *Bacillus cereus* con relación al efecto individual.

CONCLUSIONES

- La inducción de defensa por medio de Acibenzolar-s-metil, resultó evidente en el cultivar altamente susceptible como en el tolerante, siendo más efectiva la inducción en este último.

- La presión de inóculo y de enfermedad, en especial bajo condición natural, aféctan tanto la capacidad de resistencia inducida como la resistencia propia de un cultivar.

- El lombricompost disminuyó la severidad de Sigatoka negra en invernadero, en condiciones de baja presión de inóculo o inoculación artificial, debido posiblemente a la presencia de una microflora inductora de resistencia.

- El lombricompost incrementó la efectividad de los inductores de resistencia en invernadero y favoreció el crecimiento de plantas de banano expresado en altura, tanto en condiciones de invernadero como de campo.

- Las rizobacterias PF1 y *P. fluorescens* cepa PF2, no mostraron inducción de resistencia en el cultivar altamente susceptible, mientras que sí hubo reducción en la severidad de la enfermedad, cuando se dispuso de una fuente de energía orgánica y un nivel de resistencia como el de FHIA 23.

- El sustrato foliar ofreció un buen control de la enfermedad bajo condiciones de invernadero, encontrándose como componentes principales la fuente de quitina y de calcio.

- La FcMf no logró reducir los niveles de enfermedad, a excepción de su combinación con lombricompost y FHIA 23 luego de la inoculación artificial.

- En invernadero, la evaluación de los tratamientos mediante inoculación natural, resultó similar a la evaluación con inoculación artificial, considerándose más representativa la primera, con base en el tipo de inóculo y aproximación a la escala natural.

- El índice de aposiciones fluorescentes no se relacionó con el nivel de resistencia a Sigatoka negra en FHIA 23, aunque el tratamiento con Asm tuvo una tendencia a incrementar el índice de este material luego de inoculación natural.

- Bajo condiciones de campo la inclusión de Asm en el sistema de operación estándar de fungicidas mejoró el control de Sigatoka negra; sin embargo, el incremento en control no fue significativo.

- La fuente de energía no favoreció en condiciones de campo la capacidad de inducción de SAR vía Asm.

- El sustrato foliar en rotación con el sistema de operación estándar de control químico, no ofreció control de Sigatoka negra bajo condiciones de campo. Sin embargo el nivel de severidad estuvo por debajo de lo observado en plantas sin ningun tipo de control.

- El programa de rotación del sustrato foliar con un programa estándar de aplicación de fungicidas más Asm, en presencia de la fuente de energía, ofreció un control de la enfermedad similar al programa estándar.

- Las alteraciones ultraestructurales observadas en tejido tratado con Asm, coinciden con el planteamiento de una alta demanda de energía por parte de la inducción de resistencia.

7. LITERATURA CITADA

Aist, JR. 1976. Papillae and related wound plugs of plants cells. Annual Review of Phytopathology. 14: 145-163.

Alexander, P. 1977. Soil microbiology. New York, John Willey.467 p.

Alexander, SA; Graves, AS. 2001. Controlling bacterial speck with acibenzolar-S-methyl in staked tomatoes. Phytopathology 91: S2.

Alvarez, JM. 1997. Introducción, evaluación, multiplicación y diseminación de híbridos FHIA en Cuba.Infomusa (Montpellier) 6 (2) : 10-14.

Andrews, JH. 1992. Biological control in the phyllosphere. Annual Review of Phytopathology 30:603-635.

Andrews, JH; Harris, R. 2000. The ecology and biogeography of microorganisms on plant surfaces. Annual Review of Phytopathology. 38:145-180.

Anfoka, GH. 2000. Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*. Mill cv. Vollendung) to *Cucumber mosaic virus*. Crop Protection 19: 401-405.

Arango, ME.2000.Manejo de sustratos para el control biológico de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en el cultivo del banano (*Musa* AAA). Tesis Mag. MSc. Turrialba , CR, CATIE. 102 p.

Bartnicki-Garcia, S. 1968. Cell wall chemistry, morphogenesis and taxonomy of fungi. Annual Review of Microbiology. 22: 87-108.

Benhamou, N. 1996. Elicitor- induced plant defense pathways. Trends Plant Sci. 1: 233-240.

Benhamou, N ; Bélanger, RR ;Paulitz TC. 1996. Pre-inoculation of Ri T-DNA-Transformed pea roots with Pseudomonas fluorescens inhibits colonization by Pythium ultimum trow : an ultrastructural study. Planta 199: 105-117.

Benhamou, N; Bélanger, RR. 1998a. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato. Plant Physiology 118:1203-1212.

Benhamou, N ; Bélanger, R. 1998b. Induction of systemic acquired resistance to Pythium damping-off in cucumber plants by benzothiadiazole : ultrastructure and cytochemistry of the host response. The Plant Journal 14:13-21.

Biggs, AR; El-Kholi, MM; El-Neshawy, S; Nickerson, R. 1997. Effects of calcium salts on growth, polygalacturonase activity, and infection of peach fruit by *Monilinia fructicola*. Plant Disease. 81:399-403.

Blakeman, JP; Fokkema, NJ. 1982. Potencial for biological control of diseases on the phylloplane. Annual Review of Phytopathology 20: 167-192.

Blandón, CG; Dávila, AMT; Rodríguez, VN. 1999. Caracterización microbiológica y físio-química de la pulpa de café sola y con mucílago, en proceso de lombricompostaje. Cenicafé, (Colombia) 50:5-23.

Bustamante, E; Patiño, LF. 2001. En búsqueda de un sistema de resistencia estable en plantas cultivadas. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 60: 3 – 14.

Camacho, AJC. 1997. Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento e inductores de resistencia a Sigatoka negra (*M. fijiensis*) en Banano (*Musa sp*) y algunas observaciones sobre la gutación. Tesis Mag. Sc. Turrialba , CR, CATIE. 122 p.

Cao; H; Glazebrook, J; Clarke, J; Volko, S; Dong, X. 1997. The Arabidopsis NPR1 Gene that controls systemic acquired resistance encodes a novel protein containing ankyrin repeats. Cell 88: 57-63.

Chardonnet, CO; Sams, CE; Trigiano, RN; Conway, WS. 2000. Variability of three isolates of *Botrytis cinerea* affects the inhibitory effects of calcium on this fungus. Phytopathology 90: 769-774.

Chen, Y; Aviad, T. 1990. Effects of humic substances on plant growth. *In* Humic substances in soil and crop sciences; selected readings. MacCarthy, P; Clapp, CE; Malcolm, RL; Blom, PR. Eds . American Society of Agronomy and Soil Science Society of America. South Segoe Road, Madinson, USA. p. 161-185.

Chen, J; Jacobson, LM; Handelsman, J; Goodman, RM. 1996. Compatibility of systemic acquired resistance and microbial biocontrol for suppression of plant disease in a laboratory assay. Molecular Ecology 5: 73-80.

Chen, W; Hoitink, HAJ; Schmitthenner, AF. 1987. Factors affectingsuppression of Pythium damping-off in container media amended with composts. Phytopathology 77: 755-760.

Chen, Z; Silva, H; klessig, D. 1993. Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. Science 262: 1883-1886.

Cohen, R; Cuppels, DA; Brammall, RA; Lazarovitts, G. 1992. Induction of resistance towards bacterial pathogens of tomato by exposure of the host to dinitroaniline herbicides. Phytopathology 82: 110-114.

Cole, DL.1999. The efficacy of acibenzolar S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance, against bacterial and fungal diseases of tobacco. Crop Protection. 18: 267-273.

Conway, WS; Sams, CE; Abboth, JA; Bruton, BD. 1991. Postharvest calcium treatment of apple fruit to improve broad-spectrum protection against postharvest pathogens. Plant Disease 75: 620-622.

CORBANA (Corporación Bananera Nacional, Costa Rica). 2000.Informe Annual 1999. Dirección de Investigaciones. San José, Costa Rica CORBANA p.31-46.

CORBANA (Corporación Bananera Nacional, Costa Rica). 2001. Estadísticas de Exportación Bananera 1999 Dirección de Exportación Bananera y Estadística. Febrero 2001. San José,- Costa Rica CORBANA p.4.

Crute, IR; De Wit, PJGM; Wade, M. 1985. Mechanisms by which genetically controled resistanse and virulence influence host colonization by fungal and bacterial parasites. *In* Fraser, RSS. Ed. Mechanisms of resistance to plant diseases. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. Boston. 462 p.

Daly, JM. 1976. The carbon balance of diseased plants : changes in respiration, photosynthesis and traslocation. *In* Physiological plant pathology. Heitefuss, R; Williams, PH. Eds. Springer Verlag p. 450-479.

Darvill, AG; Albersheim,P. 1984. Phytoalexins and their elicitors –a defense against microbial infection in plants. Annual Review of Plant Physiology. 35: 243-275.

Delaney, TP. 1997. Genetic dissection of acquired resistance to disease. Plant Physiology 113: 5-12.

Du, H ; Klessig, DF.1997. Identification of a soluble high-affinity salicylic acid-binding protein in tobacco. Plant Physiology. 113: 1319-1327.

El Ghaouth, A; Arul, J; Grenier, J; Benhamou, N; Asselin, A; Bélanger, R: 1994. Effect of chitosan on cucumber plants: Suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defense reactions. Phytopathology 84:313-320.

Esquivel, R. 1992. Algunos deuteromicetos hiperparásitos de *M. fijiensis* Morelet. Panamá, IDIAP. 12 p.

Foster,R. 1986. The ultrastructure of the rhizoplane and rhizosphere. Annual Review of Phytopathology 24: 11-34.

Friedrich, L; Lawton, K; Ruess, W; Masner, P; Specker, N; Gut-Rella, M; Meier, B; Dincher, S; Staub, T; Ukness, S; Métraux, JP; Kessman, H; Ryals, J. 1996. A benzothiadiazole derivate induces systemic acquiered resistance in tobacco. Plant Journal 10: 61-70.

Frison, E; Sharrock, S. 1999. The economic, social and nutritional importance of banana in the world. *In* Picq, C; Fouré, E; Frison, EA. Eds. Bananas and food security. Proceedings of an international symposium held in Douala, Cameroon,1998. Montpellier, Francia, International Network for the Improvement of Banana and Plantain. p.21-35.

Fullerton, RA ; Olsen, TL. 1995. Pathogenic variability in Mycosphaerella fijiensis Morelet, cause of black Sigatoka in banana and plantain. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science. 23 : 39-48.

Gauhl, F. 1990.Epidemiología y ecología de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*, MORELET) en plátano (*Musa* sp) en Costa Rica. Panamá, UPEB 114p.

Godard, J-F ; Ziadi, S ; Monot, C ; Le Corre, D ; Silué, D. 1999. Benzothiadiazole (BTH) induces resistance in cauliflower (*Brassica oleracea* var *botrytis*) to downy mildew of crucifers caused by *Peronospora parasitica*. Crop Protection 18: 397-405.

Gonzalez, PM; Jaramillo, R. 1979. Enfermedad de la Sigatoka negra *(Mycosphaerella fijiensis* Morelet var *Difformis*. Mulder & Stover. Asbana. Año 3 (10): 3, 7-9.

Gonzalez, GE; Villalonga, GM; Cabrera, MJ; Boix, CA. 1989. Caracterización de los productos finales del CAI "panamá" durante la zafra de 1987. Revista Centro Azúcar 16 (4):32-38.

González, R; Bustamante, E; Shannon, P; Okumoto, S. 1996. Evaluación de microorganismos quitinolíticos antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis* en casa de mallas y campo. Manejo Integrado de Plagas 40: 12-16.

Görlach, J; Volrath, S; Knaufbeiter, G; Hengy, G; Beckhove, U; Kogel, K-H; Oostendorp, M; Staub, T; Ward, E; Kessmann, H; Ryals, J. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. Plant Cell 8: 629-643.

Griesbach, E; Eisbein, K; Krämer, I; Ramm, M; Müller, J; Völksch, B. 2000. Induction of resistance to bacterial pathogens in the pathosystem tomato/*Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* II. Caracterization of the resistance inductor. Journal of Plant Diseases and Protection 107 (5): 464-483.

Griffin, DH.1994. Fungal Physiology. 2 ed. New York, Wiley-Liss. 458 p.

Guedes, MEM; Richmond, S; Kuĉ. 1980. Induced systemic resistance to anthracnose in cucumber as influenced by the location of the inducer inoculation with *Colletotrichum lagenarium* and the onset of flowering and fruiting. Physiological Plant Pathology 17: 229-233.

Gutiérrez, CFA. 1996. Estudio de factores en la inducción de resistencia a *Mycosphaerella fijiensis* y promoción de crecimiento en plantas de banano. Tesis Mag. Sc. Turrialba , CR, CATIE. 91 p.

Guzmán, M; Murillo, G; Villalta, R. 2000. Estabilidad de la resistencia a la Sigatoka negra en híbridos de banano (*Musa* AAAA) con un nivel intermedio de resistencia al patógeno. Corbana Informe Anual 1999. Mayo 2000. San José, CR. P. 31-33.

Hoffland, E; Hakulinen, J; Van Pelt, JA. 1996. Comparison of systemic resistance induced by avirulent and nonpathogenic *Pseudomonas* species. Phytopathology 86: 757- 762.

Hoss, R; Helbig, J; Bochow, H. 2000. Function of host and fungal metabolites in resistance response of banana and plantain in the Black sigatoka disease pathosystem (*Musa* spp- *Mycosphaerella fijiensis*). Journal of Phytopathology 148 (7/8): 387-394.

Jaizme-Vega; MC; Piñero, MS; Tenoury, P: 2000. efecto de la interacción de micorrizas y rizobacterias sobre el desarrollo de cuatro clones de *Musa* micropropagados. *In* Reunión Acorbat (31,2000, San Juan. Puerto Rico). Memorias. San Juan, Puerto Rico. p.57

Jacobsen,B; Backman, P. 1993. Biological and cultural plant disease control: alternatives and supplements to chemicals in IPM. Plant Disease 77: 311 – 314.

Jiménez, J; Galindo, J; Ramírez, C. 1985. Estudios sobre combate biológico de *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* mediante bacterias epífitas. *In* Reunión Acorbat (7, 1985, San José, Costa Rica).Memorias. Turrialba, Costa Rica, CATIE. p. 105-109.

Kessmannn, H; Staub, T; Hofman, C; Maetzke, T; Herzog, J; Ward, E; Uknes, S; Ryals, J; 1994. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. Annual Review of Phytopathology 32: 439-459.

Kiba, A; Toyoda, K; Ichinose, Y; Yamada, T; Shiraishi, T. 1996. Specific response of partially purified cell-wall-bound ATPase to fungal suppressor. Plant cell Physiology. 37: 207-214.

Kiba, A; Miyake, C; Toyoda, K; Ichinose, Y; Yamada, T; Shiraishi, T. 1997. Superoxide generation in extracts from isolated plant cell wall is regulated by fungal signal molecules. Phytopathology 87 :846-852.

Kiba, A; Takeda, T; Kanemitsu, T; Toyoda, K; Ichinose, Y; Yamada, T; Shiraishi, T. 1999. Induction of defense responses by synthetic glycopeptides that have a parcial strucure of the elicitor in the spore germination fluid of *Mycosphaerella pinodes*. Plant Cell Physiolgy 40(9): 978-985.

Kluepfel, D. 1993. The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. Annual Review of Phytopathology 31: 441-472.

Kokalis-Burelle, N; Backman, DA; Rodriguez-Kabana, R; Ploper, LD. 1991. Chitin as foliar amendment to modify microbial ecology and control disease. *In* APS Annual Meeting. August 17-21, 1991. St. Luis, Missouri.APS.

Kokalis-Burelle, N. 2001. Chitin amendments for supression of plant parasitic nematodes and fungal pathogens. Phytopathology 91: S168.

Lee, JC; Timasheff, SN. 1981. The stabilization of proteins by sucrose. J. Biol. Chem. 256: 7193-7201.

Leeman, M; Van Pelt, JA; Den Ouden, FM; Heinsbroek, M; Bakker, PAHM, Schippers, BS. 1995. Induction of systemic resistance by *Pseudomonas fluorescens* in radish cultivars differing in susceptibility to fusarium wilt, using a novel bioassay. European Journal of Plant Pathology 101: 655-664.

Liu, L; Kloepper, JW; Tuzun, S. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: Duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. Phytopathology 85: 1064-1068.

Maciel, C; Pires de Matos, A; Oliveira e Silva, S. 1998. La Sigatoka negra en Brasil. Confirmada la amenaza. Infomusa(Montpellier) 7(1): 130 – 131.

Madrigal, A; Ruess, W; Staehle-Csech, U. 1998. CGA 245704, a new plant activator to improve natural resistance of banana against Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*). *In* Reunión Acorbat (13,1998, Quito, Ecuador). Memorias. Quito, Ecuador. p.266-274.

Marin, VD; Romero, CR. 1992. El combate de la Sigatoka negra. Corporación Bananera Nacional, Costa Rica. Boletín No. 4. 22p.

Mauch-Mani, B; Métraux, J-P. 1998. Salicylic acid and systemic acquired resistance to pathogen attack. Annals of Botany 82: 535-540.

Maurhofer, M; Hase, C; Meuwly, P; Métraux, J; Défago, G. 1994. Induction of systemic resistance of tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: Influence of the gacA gene of pyoverdine production. Phytopathology 84: 139-146.

Mayorga, M. 1994. Control de Sigatoka negra en Zonas bananeras colombianas. Fitopatología Colombiana. 18(1): 1 – 8.

Meredith, DS; Lawrance, JS. 1969. Black leaf streak of banana (*Mycosphaerella fijiensis*), symptoms of disease in Hawaii and notes of the conidial state of the causal fungus. Transaction of the British Mycologigal Society 52 (3): 459-476.

Meredith, DS. 1970. Banana leaf spot diseases (Sigatoka) caused by *Mycosphaerella fijiensis* and *musicola*. *In* Jones, DR. Ed.Sigatoka negra en la región del Pacífico del Sudeste Asiático. Montpellier, Francia. Musarama/ INIBAP Agrópolis, p. 2 –5.

Michell, RM; Alexander, M. 1962. Microbiological processes associated with the use of chitin for biological control. Proc. Soil. Sci. Soc. Amer. 26: 556-558.

Miranda, CJE. 1996. Evaluación de microorganismos antagonistas al hongo *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet), colocados en el interior y exterior de la planta de banano. Tesis Mag. MSc. Turrialba , CR; CATIE. 101p.

Nozue, M; Tomiyama, K; Doke, N. 1978. Effect of Adenosine 5'-Triphosphate on hypersensitive death of potato tuber cells infected by *Phytophthora infestans*. Phytopathology 68: 873-876.

Oku, H; Ouchi, S; Sato,M. 1973. Nucleic acid metabolism in powdery mildew-infected barley leaves as associated with symptom development. Rept. Tottori Mycol. Inst. Jpn. 10: 511-516.

Okumoto, S; Bustamante, E. 1993. Efecto de enmiendas foliares sobre el desarrollo del tizón temprano causado por *Alternaria solani* y sobre la población bacterial en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 28: 1-6.

Oluma, HOA; Onyezili, FN. 1999. Efecto del sistema de cultivo sobre la severidad de la Sigatoka negra en Nigeria. Infomusa (Montpellier) 8 (1): 37-38.

Orjeda, G; Escalant. JV; Moore, N. 1999. Programa internacional de evaluación de *Musa* (IMTP) fase II sinopsis del informe final y resumen de los resultados. Infomusa (Montpellier) 8 (1) : 3-10.

Orozco-Santos, M. 1998. Criterios para el control químico de la Sigatoka negra del banano (*Mycosphaerella fijiensis*). *In* Curso Manejo Integrado de Sigatoka negra: memorias. Manzanillo, Colima, México. p. 42-59.

Ortega, F; Steiner, U; Dehne, HW.1998. Induced resistance a tool for fungicide resistance management. Pestic. Sci.53:193-196.

Pappu, HR; Csinos, AS ; McPherson, RM; Jones, DC; Stephenson, MG.2000. Effect of acibenzolar-S-methyl and imidacloprid on suppression of tomato spotted wilt *Tospovirus* in flue-cured tobacco. Crop Protection 19: 349-354.

Pasberg-Gauhl,C. 1991. Symptom development of Black Sigatoka leaf spot on young or adult banana and plantain plants after natural inoculation. *In* Gold, CS; Gemmill, B. Eds. Biological and Integrated Control of Highland Banana and Plantain Pests and Diseases. Proceedings of a research Coordination Meeting. Cotonou, Benin. 12-14 November. 1991.Davis, California. p.263-275.

Pérez-Vicente, L; Hernández, A; Trujillo, L; Hernández, L; Pérez, M. 2000. Efecto del Azoxystrobin y el Trifloxystrobin en el control de Sigatoka negra en bananos y plátanos. *In* Reunión Acorbat (14, 2000, San Juan, Puerto Rico). Memorias. San Juan, Puerto Rico. p.61.

Pieterse, CMJ, van Wees, SCM; Hoffland, E; van Pelt, JA; van Loon, LC. 1996. Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. Plant Cell 8: 1225-1237.

Pieterse, CMJ; van Wees, SC; van Pelt, JA; Knoester, M; Laan, R; Gerrits, H; Weisbeek, PJ; van Loon, LC. 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. Plant Cell 10: 1571-1580.

Ploper, LD; Backman, PA; Cunningham, SD; Martin, MJ. 1991. Effect of chitin amendments and added chitinolytic microorganisms an foliar disease of tomate. *In* APS Annual Meeting. (1991, St. Luis, Missouri) APS.

Pons, N. 1987. Notes on *Mycosphaerella fijiensis* var *difformis*. Transactions of the British Mycological Society 89 (1): 120-124.

Press,CM; Loper, JE; Kloepper, JW. 2001. Role of iron in rhizobacteria-mediated induced systemic resistance of cucumber. Phytopathology 91 (6): 593-598.

Ramírez, SG. 1998. Programas de manejo de resistencia a fungicidas sistémicos usados en el control químico de la Sigatoka negra. *In* Curso Manejo Integrado de Sigatoka negra. Memorias (1998, Manzanillo, Colima, México). p. 60-74.

Rhodes, PL. 1964. A new banana disease in Fiji. Commonwealth Phytopathological News 10(3): 38- 51.

Riveros, AS. 1995. Etude D'Eliciteurs associes a la resistance du cultivar de bananier Yangambi KM 5 a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet.Thése de doctorat. Gembloux, Faculté des Sciences Agronomiques 190 p.

Riveros, AS; Lepoivre, P. 1998. Alternativas bioquímicas para el control indirecto de Sigatoka en musaceas. *In* Reunión Acorbat (13,1998, Quito, Ecuador). Memorias. Quito, Ecuador. p.436-447.

Rodrigo, I; Vera, P; Tornero, P; Hernández-Yago, J; Conejero, V.1993.cDNA cloning of viroid-induced tomato pathogenisis-realated protein P23. Characterization as a vascular antifungal factor. Plant Physiology. 102:939-945.

Roe, NE; Stoffella, PJ; Bryan, HH. 1993. Utilization of MSW compost and other organic mulches on comercial vegetable crops. Compost Sci. Util. 1: 73-84.

Romero, RA; Sutton, TB.1997. Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of black Sigatoka of bananas, to propiconazole. Phytopathology 87: 96-100.

Romero, RA; Sutton, TB. 1998.Characterization of benomyl resistanse in *Mycosphaerella fijiensis*, cause of Black Sigatoka of banana, in Costa Rica. Plant Disease 82 (8):931-934.

Romero, RA. 1998. El control de la Sigatoka negra en producción de banano orgánico. *In* Rosales, FE; Tripon, SC; Cerna, J. eds. Producción de banano orgánico y, o, ambientalmente amigable. Memorias del taller internacional realizado en la EARTH, Guácimo, CR-27-29 de Julio de 1998. Red internacional par el mejoramiento del banano y el plátano, Montpellier, Francia.

Romero, AM; Kousik, CS; Ritchie, DF.1998. Systemic acquired resistance reduces race changes to major resistance genes in pepper. (Abstr.) Phytopathology 88: S76.

Romero, AM; Kousik, CS; Ritchie, DF. 2001. Resisntance to bacterial spot in bell pepper induced by acibenzolar-s-methyl. Plant Disease. 85:189-194.

Ruiz-Silvera, C; Bustamante, E; Jiménez, F; Saunders, JL; Okumoto, S; González, R. 1997. Efecto de sustratos sobre el crecimiento y supervivencia de bacterias antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis.* Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 45: 1 –8.

Ryals, J; Uknes, S; Ward, E. 1994. Systemic acquired resistance. Plant Physiology. 104:1109-1112.

Ryals, J; Weymann, K; Lawton, K; Friedrich, L; Ellis, D; Steiner, H-Y; Johnson, J; Delaney, TP ; Jesse, T ; Vos, T ; Ukness, S. 1997. The Arabidopsis NIM1 protein shows homology to the mammalian transcription factor inhibitor IkB. The Plant Cell. 9:4215-439.

Salzman, RA; Tikhonova, I; Bordelon, BP; Hasegawa, PM; Bressan, RA. 1998. Coordinate accumulation of antifungal proteins and hexoses constitutes a develepmentally controlled defense response during fruit ripening in grape. Plant Physiology 117: 465-472.

Sancho, H; Guzmán, M. 1997. Influencia de aplicaciones foliares de melaza y urea en mezcla con fungicidas sobre el crecimiento y producción de la planta de banano y la severidad de la Sigatoka negra. CORBANA. Informe anual 1996.p. 27-28.

Shi, J; Mueller, WC; Beckmann, CH.1991. Ultraestructure and histochemistry of lipoidal droplets in vessels contact cells and adjacent parenchyma cells in cotton plants infected by *Fusarium oxysporum* f.sp. *vasinfectum.* Physiol. Melec. PL. Path. 39: 201-211.

Shillingford, CA. 1989. Use of fungicides to control leaf spot disease in *Musa. In* Fullerton, RA; Stover, RH. Eds. Sigatoka leaf spot diseases of bananas. Proceedings of an international workshop (1989, San José, CR).Montpellier, Francia, INIBAP. p.75-83.

Shiraishi, T; Oku, H ; Yamashita, M ; Ouchi, S. 1978. Elicitor and suppressor of pisatin induction in spore germination fluid of pea pathogen *Mycosphaerella pinodes*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 44:659-665.

Shiraishi, T; Kiba, A; Inata, A; Sugiura; T; Toyoda, K; Ichinose, Y; Yamada, T. 1998. Plant cell wall with the suppressor may play a crucial role in determining specificity. *In* Molecular Genetics of Host-specific Toxins in Plant Disease. Kohmoto, K; Yoder, OC. Eds. Kluwer Academic. p. 343-353

Smedegard-Petersen, V; Tolstrup, K. 1985. The limiting effect of disease resistance on yield. Annual Review of Phytopathology 23: 475-490.

Smith, KP; Goodman, RM. 1999. Host variation for interactions with beneficial plant-associated microbes.Annual Review of Phytopathology 37: 473-491.

Spurr, H; Knudsen,G. 1985. Biological control of leaf diseases with bacteria. *In*: Windels, CE; Lindow, SE. eds. Biological control of the phylloplane. St. Paul, Minnesotta, APS. p. 45 – 62.

Sticher, L; Mauch-Mani, B; Métraux, JP. 1997. Systemic acquired resistance. Annual Review of Plant Pathology 35: 235-270.

Stover, RH; Dickson, JD. 1976. Banana leaf spot caused by *Mycosphaerella musicola* and *M. fijiensis* var. *difformis*: a comparison of the first central american epidemics. FAO Plant Prot. Bull. 24: 36-42.

Strobel, N; Kuć, J. 1995. Chemical and biological inducers of systemic resistance to pathogens protect cucumber and tobacco plants from damage caused by paraquat and cupric chloride. Phytopathology 85:: 1306-1310.

Talavera, SME; Bustamante, E; González, R; Sánchez, V. 1998. Selección y evaluación en laboratorio y campo de microorganismos glucanolíticos antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis*. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 47: 24 – 30.

Tejerina, JC; Meriles, G; Stover, RH; Ploetz, RC; Romanoff, S. 1997. First report of Black Sigatoka in Bolivia. Plant Disease 81 (11): 1332.

Tränker, A.1992. Use of agricultural and municipal organic wastes to develop suppressiveness to plant pathogens *In* Biological Control of Plant Diseases. Tjamos, EC; Papavizas, GC; Cook, RJ. Eds. New York, Plenum Press p 35-42

Ukness, S; Mauch-Mani, B; Moyer, M; Potter, S; Williams, S. 1992. Acquired resistance in Arabidopsis. Plant Cell 4:645-656.

Vakili, NG. 1968. Responses of *Musa acuminata* species and edible cultivars to infection by Mycosphaerella musicola. Tropical Agriculture (Trinidad) 45: 13-22.

Vallecillo, JM. 1996. Control biológico de Sigatoca negra (*Mycosphaerella fijiensis*), mediante la utilización de *Serratia marcescens*. Tesis Ing. Agrónomo. Guácimo, CR, EARTH. 29p.

Van Loon, LC; Baker, PAHM; Pieterse, CMJ. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Rewiew of Phytopathology 36: 453-483.

Van Peer, R; Niemann, G; Schippers, B. 1991. Induced resistanse and phytoalexin accumulation in biological control of fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r. Phytopathology 81: 728-734.

Van Peer, R; Schippers, B. 1992. lipopolysaccharides of plant-growth-promoting *Pseudomonas* sp. Strain WCS417r induce resistance in carnation to fusarium wilt. Neth. J. Plant Pathology. 98: 129-139.

Vernooij, B; Friedrich, L; Morse, A; Reist, R; Kolditz, JR; Ward, E; Uknes, S; Kessmann, H; Ryals, J. 1994. Salicylic acid is not the traslocated signal responsible for inducing systemic acquired resistance but is required in signal transduction. Plant Cell 6 : 959-965.

Ward, ER; Uknes, SJ; Williams, SC; Dincher, SS; Wiederhold, DL. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquiered resistance. Plant Cell 3: 1085-1094.

Wei, G; Kloepper, JW; Tuzun, S. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting bacteria. Phytopathology 81: 1508-1512.

Wei, ZM; Laby, RJ; Cathy, H; Zumoff, D; Bauer, SYH; Collmer, A; Steven, VB. 1992. Harpin, elicitor of the hypersensitive response produced by the plant pathogen *Erwinia amylovora*. Science. 257:85-87.

Wendehenne, D; Durner, J; Chen, Z; Klessig, DF. 1997. Benzothiadiazole, an inducer of plant defenses, inhibits catalase and ascorbate peroxidase. Phytochemistry 47(4):651-657.

Wisniewski, M; Droby, S; Chalutz, E; Eilam, Y. 1995. Effects of Ca^{2+} and Mg^{2+} on *Botrytis cinerea* and *Penicillium expansum in vitro* and on the biocontrol activity of *Candida oleophila*. Plant Pathol. 44:1016-1024.

Wirz, M; Chin, M. 2000. Detección y caracterización de individuos de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) de Costa Rica resistentes a estrobilurinas. *In* Reunión Acorbat (14, 2000, San Juan, Puerto Rico). Memorias. San Juan, Puerto Rico. p.65.

Yoshioka, H; Shiraishi, T; Nasu, K; Yamada, T; Ichinose, Y; Oku, H. 1992. Suppression of activation of chitinase and β-1,3-glucanase in pea epicotyls by orthovanadate and suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. Plant Cell Physiology 33: 201-204.

Yoshioka, H; Hayakawa, Y; Doke, N. 1995. Suppression of phenylalanine ammonia-lyase mRNA accumulation by suppressor from *Phytophthora infestans*. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 61: 7-12.

Zadoks, JC; Schein, RD. 1979. Epidemiology and plant disease management. Oxford University Press, New York. 472p.

Zhang, W; Hoitink, HAJ; Dick, WA.1996. Compost-induced systemic acquiered resistance in cucumber to Pythium root rot and anthracnose. Phytopathology 86:1066-1070.

Zhang, W; han, DY; Dick, WA; Davis, KR; Hoitink, HAJ. 1998. Compost and water extract-induced systemic acquired resistance in cucumber and Arabidopsis. Phytopathology 88 : 450-455.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza para severidad de Sigatoka negra y altura de plantas, ensayo 1 de invernadero. Análisis de parcelas divididas.

Fuente de variación	Severidad		Altura
	GL	CM	CM
Cultivar	1	181.246*	298.157*
Repetición (cultivar)= Ea	4	0.176 ns	15.637 ns
Tratamientos	12	9.890*	498.607*
Cultivar*Tratamientos	12	7.649*	32.184 ns
Error experimental = Eb	48	0.265	27.707

* = significancia ns= no significancia

Anexo 2. Análisis de varianza para Severidad de Sigatoka negra y altura de plantas, ensayo 1 de invernadero. Análisis factorial.

Fuente de variación	Severidad GN 50 ddi		Altura GN	Severidad FH 50 ddi		Severidad FH 60 ddi	Altura FH
	GL	CM	CM	GL	CM	CM	CM
Lombricompost (A)	1	5.200*	2429.630*	1	0.002 ns	0.937 ns	1326.173*
Melaza (B)	1	0.020 ns	128.380*	1	0.146 ns	0.004 ns	16.673 ns
Tratamientos (agua, A, B, S) (C)	3	81.270*	561.241*	2	0.480 ns	7.743*	415.187*
Interacción A*B	1	0.270 ns	9.630 ns	1	0.613 ns	1.134 ns	166.840*
Interacción A*C	3	4.050*	63.352 ns	2	0.060 ns	0.254 ns	5.881 ns
Interacción B*C	3	0.555 ns	14.602 ns	2	0.038 ns	0.269 ns	11.048 ns
Interacción A*B*C	3	0.515 ns	55.796 ns	2	0.170 ns	0.688 ns	24.298 ns
Error Experimental	32	0.361	29.182	24	0.149	0.479	18.048

* = significancia ns= no significancia GN = Gran Enano FH=FHIA 23 ddi= días después de inoculción.

Anexo 3. Análisis de varianza para índice de aposiciones fluorescentes ensayo 1 de invernadero. Análisis factorial.

Fuente de variación	Gran Enano		FHIA 23
	GL	CM	CM
Fuente de energía (A)	1	1.600 ns	0.711 ns
Tratamientos (Agua, A, B) (B)	2	43.244*	23.211*
Interacción A*B	2	0.400 ns	0.877 ns
Error experimental	84	0.473	0.836

* = significancia ns= no significancia

Anexo 4. Análisis de varianza para severidad de Sigatoka negra y altura de plantas, ensayo 2 de invernadero. Análisis de parcelas divididas.

Fuente de variación	Inoc. Artificial		Inoc. Natural	
	Severidad		Severidad	Altura
	GL	CM	CM	CM
Cultivar	1	35.880*	11.603*	170.630*
Repetición (cultivar)= Ea	4	0.380 ns	0.023 ns	15.098 ns
Tratamientos	7	11.600*	16.983*	274.957*
Cultivar*Tratamientos	7	2.380*	1.311*	44.082 ns
Error experimental = Eb	28	0.173	0.163	27.479

* = significancia ns= no significancia

Anexo 5. Análisis de varianza para Severidad de Sigatoka negra y altura de plantas, ensayo 2 de invernadero. Análisis factorial.

Fuente de variación	Gran Enano				FHIA 23		
	Inoc. Artificial		Inoc. Natural		I. Artificial	I. Natural	
	Severidad		Severidad	Altura	Severidad	Severidad	Altura
	GL	CM	CM	CM	CM	CM	CM
Lombricompost (A)	1	3.010*	0.020 ns	693.375*	2.041 ns	1.083 ns	333.760*
Tratamientos (agua, A, B, F) (B)	3	8.121*	11.930*	307.263*	20.708*	28.887*	32.204ns
A*B	3	1.288 ns	0.040 ns	45.041 ns	0.819 ns	1.463*	17.538ns
Error experimental	16	0.510	0.022	40.333	0.833	0.268	11.531

* = significancia ns= no significancia

Anexo 6. Análisis de varianza para índice de aposiciones fluorescentes ensayo 2 de invernadero. Análisis factorial.

Fuente de variación	Inoculación Artificial			Inoculación Natural	
	Gran Enano		FHIA 23	Gran Enano	FHIA 23
	GL	CM	CM	CM	CM
Fuente de energía (A)	1	0.338ns	0.264ns	6.160*	0.120ns
Tratamientos (Agua,A,B,F) (B)	3	0.274ns	0.345ns	4.201*	11.363*
Interacción A*B	3	0.081ns	0.238ns	2.501*	0.951ns
Error experimental	72	0.533	0.276	0.575	0.457

* = significancia ns= no significancia

Anexo 7. Comparación entre Severidad de Sigatoka negra, medida a través de inoculación natural e inoculación artificial. Procedimiento Means Mean T PrT, SAS System, para la variable diferencia entre los dos tipos de inoculación.

	Gran Enano			*FHIA 23*		
Tratamiento	***Mean Dif***	***T***	***Prob >_T_***	***Mean Dif***	***T***	***Prob >_T_***
LC0	0	-	-	0.86	6.50	0.0229
Para25 LC0	0	-	-	1.20	1.22	0.3479
Asm2 LC0	-1.23	-1.98	0.1862	0	1.00	1.0000
FcMf LC0	0.16	1.00	0.4226	0.83	0.82	0.4975
LC1	1.33	1.51	0.2697	-0.40	-1.92	0.1946
Para25 LC1	0	-	-	0.40	0.36	0.7538
Asm2 LC1	0.50	1.00	0.4226	0.33	1.00	0.4226
FcMf LC1	-0.30	-1.96	0.1885	2.66	16.00	0.0039
SF	0.66	2.00	0.1835			
Q	0	0.00	1.0000			
G	2.00	-	-			
Ca	1.76	7.57	0.0170			

Anexo 8. Condiciones climáticas durante la inoculación natural del ensayo 1 de invernadero. Febrero 12-22. CATIE 2001.

Día	Tem. Máx. ^{0}C	Tem. Min. ^{0}C	Tem. Med. ^{0}C	Precip. (mm)	Radiación solar (MJ/m^2)	Humedad Media (%)	Relativa Mínima (%)
1	27.4	16.4	19.9	4.0	11.43	90.4	65
2	27.8	17.0	20.3	15.0	9.95	93.5	65
3	28.2	19.0	21.0	1.7	11.99	89.5	64
4	27.4	18.8	20.7	3.9	12.32	91.7	66
5	25.8	18.1	19.9	10.7	8.05	92.3	67
6	28.0	17.3	21.1	0.2	20.49	85.5	55
7	26.1	14.9	19.4	5.6	10.24	87.0	52
8	28.9	14.8	21.2	0.1	22.71	78.0	44
9	28.4	12.3	19.9	0.0	23.36	78.8	43
10	29.4	14.1	21.0	0.0	22.86	80.8	47
11	28.6	13.9	20.0	0.0	17.51	82.5	51

Anexo 9. Condiciones climáticas durante la inoculación natural del ensayo preliminar donde se evaluó la dosis de 0.2 cc de i.a. de Asm. Marzo 9-19. CATIE 2001.

Día	Tem. Máx. ^{0}C	Tem. Min. ^{0}C	Tem. Med. ^{0}C	Precip. (mm)	Radiación solar (MJ/m^2)	Humedad Media (%)	Relativa Mínima (%)
1	29.5	15.9	21.6	0.0	21.06	85.5	60
2	30.6	19.2	23.3	0.0	23.73	85.0	55
3	30.6	16.8	23.1	0.0	23.72	82.2	45
4	30.2	16.6	23.2	0.0	24.33	81.9	55
5	29.8	17.4	21.9	0.0	23.71	81.2	58
6	29.7	14.7	21.6	0.0	24.48	82.5	49
7	29.9	19.1	22.4	0.0	18.54	85.3	56
8	30.0	16.0	22.3	0.0	24.45	84.2	55
9	29.8	19.9	22.4	0.0	16.24	85.0	60
10	29.7	17.0	22.4	0.2	20.35	84.3	55
11	30.0	17.5	22.8	0.0	24.01	83.8	57

Anexo 10. Condiciones climáticas durante la inoculación natural del ensayo 2 de invernadero Junio 1-11. CATIE 2001.

Día	Tem. Máx. ^0C	Tem. Min. ^0C	Tem. Med. ^0C	Precip. (mm)	Radiación solar (MJ/m^2)	Humedad Media (%)	Relativa Mínima (%)
1	27.0	18.4	22.0	0.4	12.31	87.9	60
2	30.7	19.2	22.9	35.9	20.61	85.8	55
3	30.3	18.9	23.2	71.3	24.56	86.3	63
4	30.9	18.1	23.4	0.0	24.79	86.3	60
5	30.2	18.5	22.4	1.8	14.80	87.9	61
6	30.7	17.7	22.0	1.4	17.41	88.2	59
7	23.0	17.2	19.6	5.6	3.20	98.8	90
8	30.2	16.3	21.8	13.9	18.04	87.2	57
9	26.4	18.6	21.0	6.2	8.64	94.3	70
10	30.3	18.3	22.8	2.4	16.17	88.1	63
11	29.1	19.9	22.9	0.5	12.29	88.9	65

Anexo 11. Análisis de suelo utilizado durante la fase de invernadero. Laboratorio de análisis de suelos, tejido vegetal y aguas. CATIE 2001

	pH	Acd. Ext	Ca Cmol(+)/L	Mg Cmol(+)/L	K Cmol(+)/L	P mg/L	Cu mg/L	Zn mg/L	Mn mg/L	Fe mg/L	M.O. (%)	N (%)
Suelo	6.4	0.12	12.58	2.99	1.00	285	6.9	8.0	117	215	19.0	0.82

Anexo 12. Análisis químico y microbiológico de Lombricompost. Centro de Investigaciones agronómicas-Universidad de Costa Rica. 2001

Componente	Unidades
Nitrógeno total	2.48 %
P	0.29 %
K	1.59 %
Ca	2.00 %
Mg	0.85 %
Fe disponible	106 mg/Kg
Cu	104 mg/Kg
Zn	68 mg/Kg
Mn	433 mg/Kg
Bo	8 mgKg
S	0.24 mg/kg
Masa húmedo	9.88 g
Masa seco	4.11 g
Humedad Gravimétrica	140.47 %
Humedad disponible	58.41
NH_4	19.76 mg/Kg
NO_3	924.80 mg/Kg
C. O.	20.63 %
Bacterias	110000 miles UFC/gr
Actinos	56000 miles UFC/gr
Hongos	800 miles UFC/gr
Trichoderma sp	2.8×10^3 UFC/gr

Otros componentes. Lombritica. S.A. 2001

C/N	11.55
Acidos Húmicos	2.57g Eq/100g
Fuente de glucanos	10 c/g
Actividad Quitinasa	100 c/g
Bacterias aeróbicas	460×10^{6} c/g
Bacterias anaeróbicas	450×10^{3} c/g
Relación Aer/Anaer.	1 : 1000

Anexo 13. Composición de la melaza final de caña (Gonzalez *et al.* 1989)

Brix	88.4 %
Polarímetrico	41.5 %
Pureza	46.9 %
Reductores	16.4 %
Sacarosa	45.7 %
Azúcares totales	64.6 %
Cenizas	11.4 %
pH	5.1
Ion Calcio	1.1%
Ion Magnesio	0.4 %
Ion Fosfato	0.9 %
Ion Sodio	0.1 %
Ion Potasio	2.3 %
Hierro	0.03 %
Sílice	0.02 %
Ion Cloruro	0.9 %
Coloides	3.4 %
Viscosidad	17.28 Pa-s

Anexo 14. Sistema de operación estándar utilizado por Bandeco, dentro del cual se evaluaron los tratamientos durante la ensayo de campo.

Aplicación No.	**Fecha**	**Fungicida**	**Aceite**	**Asm 15 gr /ha cada 20 días**	**Asm 40 gr /ha cada 35 días**	**Sustrato Foliar**	**Phos-pro**
1	4/5/01	Calixin	5L/ha	X	X		
2	18/5/01	Tilt	5L/ha			X	
3	25/5/01	Dithane	5L/ha	X			X
4*	01/6/01	Dithane	5L/ha			X	X
5	09/6/01	Benlate	5L/ha		X		
6	16/6/01	Dithane	5L/ha	X		X	X
7	02/7/01	Folicur	3L/ha				
8	10/7/01	Calixin	3L/ha	X		X	
9	17/7/01	Dithane	3L/ha		X		
10	24/7/01	Vondozeb	3L/ha			X	
11	31/7/01	Vondozeb	3L/ha	X			X
12	09/8/01	Vondozeb	3L/ha			X	
13	16/8/01	Vondozeb	3L/ha				X
14	23/8/01	Dithane	3L/ha	X	X	X	
15	04/9/01	Sico	5L/ha				
16	12/9/01	Dithane	5L/ha	X		X	X
17	20/9/01	Dithane	5L/ha				X
18	29/9/01	Calixin	5L/ha	X	X	X	

* Inicio de las evaluaciones

Anexo 15. Análisis de varianza para variable severidad, índice de severidad, periodo total, hojas totales y ABCDE. Cultivar Gran Enano bajo condiciones de campo.

Fuente de variación	Severidad		Ind. Sev	P. Total	H.Totales	ABCDE	Altura
	GL	CM	CM	CM	CM	CM	CM
Fuente de energía (A)	1	0.072ns	4.469ns	0.761ns	5.359*	284.961ns	7468.358*
Tratamientos(SOE, SOE+Asm40, SOE+Asm15 SOE –S, SOE+Asm15-S) (B)	4	1.083*	575.898*	21.446ns	1.465ns	5398.680*	312.639ns
Interacción A*B	4	0.159ns	217.478ns	5.243ns	0.333ns	793.471ns	64.870ns
Error Experimental	20	0.153	129.313	11.027	0.654	455.328	487.675

Anexo 16. Metodología para la observación por microscopía de muestras de tejido de campo tratado con Asm.

Microscopía Electrónica

Fijación en mezcla de glutaraldehido al 2.5 % y paraformaldehido al 2% en buffer fosfato de sodio 0.1M pH 7.4, se realizaron tres lavados (15 min cada uno) con el amortiguador
Posfijación en tetraóxido de osmio al 1% diluido en el amortiguador. Se realizaron 4 lavados con agua destilada.
Deshidratación mediante gradiente ascendente de alcohol etílico (30°, 50°, 70°, 80°, 90°, 95°, 100°, 100°, cada cambio se hizo por 15 min y los dos de 100 por 20 min).

Transmisión infiltración en resina utilizando gradientes de etanol- oxido de propileno y gradientes de óxido de propileno-resina Spurr's (3:1, 1:1, 1:3), una infiltración en resina pura se realizó mediante tres cambios de 4 horas cada uno. La polimerización se realizó a 70°C por 24 horas y se procedió a hacer los cortes ultrafinos de 70 nm de grosor, utilizando un ultramicrotomo. Estos fueron contrastados con acetato de uranilo e hidróxido de plomo, la observación se realizó con micorscopio electrónico de transmisión Hitachi (Japón), modelo H-7100.

Barrido se utilizó como líquido de transición el terbutil-alcohol (4 cambios de 20 min cada uno),seguidamente las muestras fueron secadas utilizando un secador-sublimador marca Eiko (Japón) modelo ID-2. Una vez secas las muestras, éstas fueron montadas sobre bases de aluminio y cubiertas con una capa oro de 30 nm de grosor, utilizando un cobertor iónico marca Eiko (Japón), modelo IB-3. Seguidamente la observación se realizó con microscopio electrónico de barrido Hitachi (Japón), modelo S-570.