

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA

PROGRAMA DE ENSEÑANZA
ÁREA DE POSTGRADO

// ANTAGONISMO ENDOFITICO DE MICROORGANISMOS A *Mycosphaerella fijiensis* DEL PLATANO y *Alternaria solani* DEL TOMATE.

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico de Postgrado y Capacitación del Programa de Enseñanza en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y enseñanza, para optar al grado de

MAGISTER SCIENTIAE

Por

LILLIAM ADELA RODRIGUEZ OSORNO ✓

Turrialba, Costa Rica

1995

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Jefatura del Area de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

FIRMANTES:



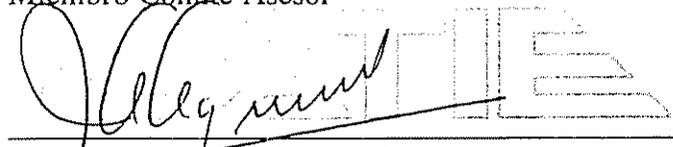
Elkin Bustamante, Ph.D.
Profesor Consejero



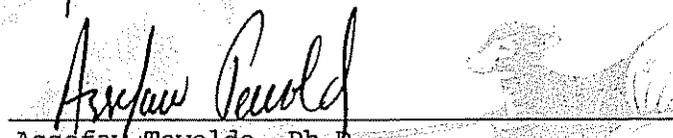
Joseph L. Saunders, Ph.D.
Miembro Comité Asesor



Shuichi Okumoto, M.Sc.
Miembro Comité Asesor



Juan Antonio Aguirre, Ph.D.
Jefe, Área de Postgrado



Assefaw Tewolde, Ph.D.
Director, Programa de Enseñanza



Lidiam Rodríguez Osorno
Candidato

DEDICATORIA

A la memoria de mi abuela Adela

A mis padres Lilliam y Fernando

A mi hija Ariana

A Mario

AGRADECIMIENTO

Mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas:

Al proyecto MIP-CATIE-Nicaragua y al NORAD por haber otorgado el financiamiento para la realización de mis estudios.

Al proyecto MIP-RENARM del CATIE por la cooperación brindada durante la realización del presente trabajo.

Al Dr. Elkin Bustamante, por su asesoría en esta investigación, por su apoyo y su amistad.

Al Dr. Joseph Saunders por la revisión del documento y participación dentro del comité de tesis.

Al Ing. Suichi Okumoto M.Sc e Ing Ana Tapia M.Sc por su asesoría.

Al Lic Johnny Pérez y al Ing Alberto Sánchez M.Sc por sus orientaciones estadísticas.

A Francisco Paulo Chaimsohn, Carlos Ruiz y Aderaldo Baptista Gazel por su apoyo logístico.

Al personal del laboratorio de Fitopatología del MIP-CATIE: Vera Sánchez, Mario Cervantes, Roberto González y Herbert González , y en especial a Arturo Gamboa y Walter Bermúdez, por su colaboración y amistad.

A mis compañeros y amigos de la promoción 93-94.

A mis entrañables amigos: Isabel, María del Rosario, Carmen, Mauricio, Arturo, Alberto, Roger, Nelson, Norma, Rudy, Juan, Alfredo y Jean Roul.

Al Sr. Manrique González por su valiosa colaboración.

Al Sr Ricardo Campos, por su optimismo. A Isabel y Guiselle por su cordialidad.

Al personal de la Biblioteca conmemorativa Orton, por su amabilidad y cooperación, en especial al Bach. Rigoberto Aguilar.

Al personal del centro de cómputo y de postgrado.

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

I N D I C E

RESUMEN.....	vii
SUMMARY.....	viii
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1. El control biológico.....	4
2.1.1. Microorganismos epífitos.....	5
2.1.2. Microorganismos endófitos.....	7
2.2. Características de los agentes de control biológico.....	9
2.3. Mecanismos de actividad antagónica.....	10
2.4. Uso de antagonistas contra patógenos.....	10
2.4.1. Antagonistas a <i>M. fijiensis</i>	10
2.4.2. Antagonistas a <i>A. solani</i>	11
2.5. Métodos para selección de antagonistas.....	13
2.5.1. Estudios <i>in vitro</i>	13
2.5.2. Estudios <i>in vivo</i>	14
2.6. Métodos para la aplicación de antagonistas.....	15
2.6.1. Bacterización en semillas y plántulas.....	16
2.6.2. Aplicación de antagonistas combinada con una base alimenticia.....	17
2.6.3. Método de inoculación endofítica inun- dativa a través del hipocótilo.....	18
3. MATERIALES Y METODOS	
3.1. Localización de los experimentos.....	19
3.2. Selección de microorganismos antagónicos a <i>A. solani</i>	19
3.2.1. Aislamiento de microorganismos epífitos...19	
3.2.2. Aislamiento de microorganismos endófitos..20	
3.2.2.1. Desinfección del material.....20	
3.2.2.2. Aislamiento de microorganismos..23	
3.3. Prueba de antagonismo.....	24

3.4.	Selección de microorganismos antagónicos a <i>Mycosphaerella fijiensis</i>	27
3.4.1.	Aislamiento de microorganismos epífitos...	27
3.4.2.	Aislamiento de microorganismos endófitos..	27
3.5.	Eficiencia del método de inoculación endofítica.....	28
3.5.1.	En tomate contra <i>A. solani</i>	28
3.5.2.	En plátano contra <i>M. fijiensis</i>	31
4.	RESULTADOS.....	35
4.1.	Procedimiento de desinfección para aislar microorganismos endofíticos.....	35
4.2.	Selección en laboratorio de microorganismos antagónicos a <i>A. solani</i>	37
4.3.	Efecto de los tratamientos sobre el tizón temprano en plantas de tomate de invernadero.....	41
4.3.1.	Primera inoculación.....	42
4.3.2.	Segunda inoculación.....	47
4.4.	Efecto de los tratamientos sobre sigatoka negra en plantas de plátano en invernadero.....	49
5.	DISCUSION GENERAL.....	51
5.1.	Procedimiento de desinfección para aislar microorganismos endofíticos.....	51
5.1.1.	Selección de microorganismos antagónicos a <i>A. solani</i> en laboratorio.....	52
5.2.	Efecto de los tratamientos sobre el tizón temprano en plantas de tomate en invernadero.....	54
5.3.	Efecto de los tratamientos sobre <i>M. fijiensis</i> en plantas de plátano en invernadero.....	59
6.	CONCLUSIONES.....	61
7.	RECOMENDACIONES.....	62
8.	BIBLIOGRAFIA.....	63
9.	ANEXOS.....	71

RODRIGUEZ, L.A. 1995. Antagonismo endofítico de microorganismos a *Mycosphaerella fijiensis* del plátano y *Alternaria solani* del tomate.

Palabras claves: plátano, *M. fijiensis*, tomate, *A. solani*, antagonismo endofítico.

RESUMEN

Debido a la contaminación ambiental por el uso de plaguicidas, la resistencia de los hongos a los fungicidas y, la necesidad de los agricultores de competir en el mercado de productos sin residuos, el control biológico de patógenos a través de microorganismos antagónicos ha surgido como una alternativa promisoría.

Enmarcado en este contexto, el presente trabajo se orientó a conocer la efectividad de microorganismos usados vía endofítica contra *Alternaria solani* en tomate y *Mycosphaerella fijiensis* en plátano. El estudio se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología del MIP y en uno de los invernadero del CATIE, Turrialba, Costa Rica. El material vegetal utilizado fueron el cultivar de tomate Hayslip, y el plátano variedad Curraré. El aislamiento de microorganismos en ambos cultivos, se realizó mediante lavado de hojas para epifíticos y licuado de hojas para endofíticos.

Se determinó que la desinfección con hipoclorito de sodio del 1% durante 5 minutos fué la mejor para aislar microorganismos endófitos en tomate. Se seleccionaron 48 organismos para las pruebas de antagonismo sobre hojas desprendidas, con base en su morfología y color, además de 6 microorganismos aislados previamente en el laboratorio MIP. Trece de estos microorganismos disminuyeron la incidencia del tizón temprano.

Para las pruebas de antagonismo en invernadero se utilizaron aquellos microorganismos que presentaron un control de la enfermedad mayor al 50%. Estos fueron aplicados a las plantas a través del hipocótilo, evaluándose el número y tamaño de lesiones, además del índice de enfermedad.

El hongo *Trichoderma harzianum* disminuyó el número de lesiones e índice de enfermedad. El bacillus A28 también disminuyó el número de lesiones del patógeno, sin embargo este efecto se perdió después de los 49 días de su aplicación. Se observó que el extracto de Bocashi fermentado y *T. harzianum* afectaron negativamente la altura de las plantas.

En los experimentos de plátano se evaluó el periodo de incubación de sigatoka negra. De acuerdo a los resultados obtenidos no se encontró efecto de los microorganismos aplicados vía endofítica hacia esta variable.

RODRIGUEZ, L.A. 1995. Endophytic antagonism of microorganisms to *Mycosphaerella fijiensis* in plantain and *Alternaria solani* in tomato.

Keywords: plantain, *M. fijiensis*, *A. solani*, endophytic antagonism.

SUMMARY

Biological control of pathogens through antagonistic microorganisms is considered a promising alternative for air pollution caused by pesticides application, fungi resistance to pesticides, and to meet farmers need to compete in the market for non-residual products.

Within this context, this work focused on assessing effectiveness of microorganisms endophytically used against *Alternaria solani* in tomato and *Mycosphaerella fijiensis* in plantain. Research work was carried out at MIP Plant Pathology Laboratory and CATIE greenhouse, Turrialba, Costa Rica. Plant material used was a cultivar of Hayslip tomato, and Curraré plantain variety. Isolation of microorganisms in both crops was carried out through leave washing for epiphytes and leave liquation for endophytes.

Desinfection using sodium hipoclorite al 1% for five minutes proved to be the best method to isolate endophytic organisms in tomato. Forty eight organisms were selected for antagonistic tests on loose leaves, based on color and morphology, and other six microorganisms previously isolated at MIP Laboratory were also selected. Thirteen of these microorganisms diminished incidence of early blight.

For antagonistic tests at the greenhouse level, organisms showing disease control rates over 50% were used. These were applied to plants using a hypocotilium, to assess number and size of injuries, and disease rate.

Trichoderma harzianum fungus decreased the number of injuries and disease rate. *Bacillus* A28 also decreased number of injuries in the pathogen; however, this effect disappeared 49 days after application. Fermented Bocashi extract and *T. harzianum* proved to negatively effect plant height.

In plantain experiments, incubation period for black sigatoka was also evaluated. According to the results obtained, no effect of the microorganisms endophytically applied was found for variable.

LISTA DE CUADROS

Cuadro No	Pág
EN EL TEXTO	
1	Análisis de fertilidad de suelos efectuado efectuado para los tratamientos: suelo esterilizado + bocashi esterilizado (1); suelo esterilizado + bocashi no esterilizado (2); suelo esterilizado (3).....30
2	Desinfección de trozos de hojas de tomate para el aislamiento de microorganismos endofíticos de acuerdo al uso de hipoclorito de sodio 1% y alcohol 70%, en diferentes tiempos de exposición.....35
3	Prueba de crecimiento de los microorganismos <i>Pseudomonas</i> sp, <i>Aspergillus</i> sp y <i>Serratia</i> sp con desinfección de hipoclorito de sodio por 2 y 5 minutos para determinar la mejor desinfección en el aislamiento de endofíticos.....37
4	Hongos seleccionados para las pruebas <i>in vivo</i> de antagonismo hacia <i>A. solani</i> en tomate.....38
5	Bacterias seleccionadas por color y morfología de colonia, para las pruebas <i>in vivo</i> de antagonismo en tomate.....39
6	Pruebas <i>in vivo</i> . Evaluación de antagonismo de los microorganismos, a través del porcentaje de área afectada, número y tamaño de lesiones causadas por el tizón temprano <i>A. solani</i> en hojas desprendidas de tomate40
7	Comportamiento de microorganismos en relación al porcentaje de área afectada por el tizón temprano en folíolos de hojas de tomate desprendidos y el porcentaje de control de la enfermedad dado por cada uno.....41

EN EL ANEXO

1	Análisis de varianza para el efecto de tratamientos, suelo y la interacción tratamiento y suelo, sobre el número de lesiones (1A), tamaño de lesiones (1B) e índice de enfermedad (tizón temprano) (1C) en plantas de tomate de invernadero a los 3 días de inoculadas. Primera inoculación..72
2	Análisis de varianza para el efecto de tratamientos, suelo y la interacción tratamiento y suelo, sobre el número de lesiones (2A), tamaño de lesiones (2B) e índice de enfermedad (tizón temprano) (2C) en plantas de tomate de invernadero a los 6 días de inoculadas. Primera inoculación.....73
3	Análisis de varianza para el efecto de tratamientos, suelo y la interacción tratamiento y suelo, sobre el número de lesiones (3A), tamaño de lesiones (3B) e índice de enfermedad (tizón temprano) (3C) en plantas de tomate de invernadero a los 3 días de inoculadas. Segunda inoculación.....74
4	Análisis de varianza para el efecto de tratamiento, suelo y la interacción tratamiento y suelo, sobre el número de lesiones (4A), tamaño de lesiones (4B) e índice de enfermedad (tizón temprano) (4C) en plantas de tomate de invernadero a los 6 días de inoculadas. Segunda inoculación.....75
5	Análisis de varianza para el efecto de tratamiento, suelo y la interacción tratamiento y suelo sobre la altura de plantas de tomate de invernadero, a los 35, 46 y 52 días después de aplicadas con los diferentes tratamientos (5A, 5B y 5C, respectivamente.....76

LISTA DE FIGURAS

Figura No		Pág
1	Evaluación del número de lesiones (A), tamaño de lesiones (B) e índice de enfermedad (C) en plantas de tomate en invernadero, a los 3 y 6 días después de la inoculación (DDI) con <i>A. solani</i> . Primera inoculación.....	44
2	Evaluación del número de lesiones (A), tamaño de lesiones (B) e índice de enfermedad (C), en plantas de tomate en invernadero a los 3 y 6 días después de la inoculación (DDI) con <i>A. solani</i> . Segunda inoculación.....	45
3	Altura de las plantas de tomate en invernadero a los 36, 46 y 52 días después de aplicados (DDA) los diferentes tratamientos via endofítica.....	46

1. INTRODUCCION

Los cultivos de plátano (*Musa* sp) y tomate (*Lycopersicon esculentum*) ocupan un lugar importante en la dieta de los países Centroamericanos. Ambos cultivos se ven afectados por diferentes enfermedades causadas tanto por hongos como por bacterias, las cuales producen grandes pérdidas económicas (Stover 1987, CATIE 1990).

El plátano tiene entre sus principales problemas fitopatológicos a la Sigatoka negra, cuyo agente causal es el hongo *Mycosphaerella fijiensis* (Rowe 1985, Stover 1987, Shillingford 1990). Esta enfermedad disminuye el área de fotosíntesis de la planta, provocando la reducción en la calidad de la fruta o la pérdida total de las cosechas (Pérez 1983, Stover 1987, DIRSA 1988, Gauhl 1992). Debido a que la explotación de este cultivo es efectuada en su mayor parte por pequeños productores, el combate químico no es factible económicamente (Stover 1980, Gauhl 1992).

En los últimos años se han incrementado en Centroamérica las áreas sembradas con el cultivo del tomate (CATIE 1990), y al igual que en el plátano, los rendimientos y calidad se ven afectados por un sin número de enfermedades. Una de estas enfermedades, el tizón temprano, causado por el hongo *Alternaria solani* provoca pérdidas considerables en la región (CATIE 1986). Los agricultores se ven urgidos a encontrar nuevas alternativas al uso del control químico debido a la

resistencia que los patógenos han ido adquiriendo hacia este tipo de control, al problema de residualidad de los plaguicidas causantes de daños al ambiente y a la salud humana y, finalmente a la necesidad de competir en el mercado de productos orgánicos (Jacobsen y Backman 1993).

El control biológico, a través del uso de microorganismos antagónicos a diferentes patógenos, ha surgido como una alternativa promisoría, ya que puede reducir el uso de plaguicidas químicos al incluirlos en sistemas de manejo integrado de plagas (Blakeman y Fokkema 1982, Jacobsen 1992).

A pesar de los muchos ejemplos exitosos del control biológico de enfermedades foliares demostrados bajo condiciones controladas, el uso de antagonistas foliares en el campo ha presentado ciertas dificultades (Blakeman y Fokkema 1984, Slessman y Leben 1976). El medio ambiente biótico y abiótico prevaleciente en las plantas donde son introducidos los antagonistas, al parecer influye grandemente en éstos (Baker y Cook 1982, Fry 1988). Además, debido a que el inóculo es depositado externamente, otros microorganismos entran en competencia por espacio, germinación, crecimiento, desarrollo y colonización en el tejido hospedero (Adebitan *et al* 1992), pudiendo reducir de esta manera la efectividad del antagonista.

Ya que las plantas pueden ser colonizadas interna y externamente por diferentes microorganismos (Spurr and Welty 1972), se ha pensado en la inoculación de éstos de forma que puedan colonizar internamente a las plantas con el fin de protegerlas de mejor manera contra los patógenos.

Este trabajo tuvo como objetivos los siguientes:

- Diseñar un procedimiento de desinfección del filoplano para aislar microorganismos endofíticos.
- Aislar de plantas de plátano y tomate microorganismos epifíticos y endofíticos antagonísticos a los patógenos de éstos cultivos.
- Determinar la eficiencia del método de inoculación inundativa a través del hipocótilo, en el antagonismo de los microorganismos aislados.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 El control biológico

Se entiende por control biológico (Baker y Cook 1974) "la reducción del inóculo o la actividad de un patógeno realizado por o a través de uno o más organismos distintos del hombre".

El control biológico natural ha sido reportado para varias enfermedades. Los suelos supresivos, las micorrizas (Clay 1991), la protección cruzada mediante razas de virus que inhiben una enfermedad (Andrews 1992), entre otros, están siendo estudiados en la actualidad (Baker 1987, Fry 1988).

Hamilton (1980) hace una revisión completa del papel que juegan los microorganismos "invasores primarios" sobre los mecanismos de defensa de las plantas, en específico los virus. Menciona el efecto de la infección previa de virus sobre las infecciones subsecuentes. El uso práctico de este sistema de protección cruzada inducido por virus puede ser un medio para reducir el efecto de la infección debido a razas virulentas.

Tomashow (1986,1987) y Weller *et al* (1988) mencionan el uso de *Pseudomonas fluorescens* como supresiva de *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* en el cultivo del trigo; *Serratia liquefaciens* ha sido reportada por Sneh *et al* (1985) como protectora a infecciones causadas por *Fusarium oxysporum*

fsp *dianthi*; hongos del género *Trichoderma* han sido hallados también como promisorios agentes de biocontrol hacia hongos patógenos de plantas.

Los numerosos experimentos realizados hasta la fecha nos dan una fuerte evidencia de que el control biológico provee protección contra muchas enfermedades.

Una de las técnicas para efectuar el control biológico de diferentes patógenos es a través de aplicaciones de microorganismos antagónicos a éstos, habiéndose obtenido hasta el momento numerosos resultados satisfactorios (Blakeman y Fokkema 1982).

2.1.1 Microorganismos epífitos

Los microorganismos que se manifiestan naturalmente sobre la superficie de las partes aéreas de las plantas están adaptados para sobrevivir y crecer en este hábitat. Si alguno de éstos organismos tiene un efecto antagónico sobre un patógeno, entonces su uso con propósitos del control biológico puede ser preferido a organismos también antagónicos al patógeno pero de otro hábitat. Estos últimos serán menos capaces de sobrevivir por largo tiempo sobre el filoplano y en consecuencia, tendrían que ser aplicados a la superficie foliar con mayor frecuencia que los primeros (Blakeman y Fokkema 1987, Andrews 1992).

Estos organismos saprofiticos juegan un importante papel en la reducción de la incidencia de enfermedades de los cultivos, existiendo en la actualidad muchos ejemplos de exitosas introducciones en laboratorio e invernadero, de bacterias, levaduras, hongos o virus que reducen enfermedades foliares causadas por hongos o bacterias (Blakeman y Fokkema 1982). Mc Laughlin *et al* (1992) han utilizado las levaduras *Kloeckera apiculata* y *Candida guilliermondii* en el control biológico de enfermedades de la uva, obteniendo resultados significativos en la reducción de éstas.

Entre las bacterias más comúnmente encontradas están las Gram-negativas: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas* y *Flavobacterias*; y las Gram-positivas: *Lactobacillus*, *Bacillus* y *Corynebacterium* (Blakeman and Fokkema 1982).

Spurr (1973) observó que modificaciones de los hongos y bacterias saprofiticas de la superficie de las hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum*) afectaron la respuesta del mismo a inoculaciones con razas patogénicas de *Alternaria alternata*. Según Lindow (1985), este trabajo indica que la microflora de la superficie de las hojas interactúa con el patógeno, siendo un factor determinante en el desarrollo de la enfermedad.

La mancha de la hoja en maní, causada por *Cercospora*, también ha sido reducida con aplicaciones de antagonistas bacteriales (Fravel and Spurr 1977). Bacterias antagónicas aplicadas por Lindow (1982) a árboles de pera colonizaron

flores y hojas de los mismos por cerca de 3 meses, reduciendo significativamente las poblaciones epifitas de *Pseudomonas syringae* y *Erwinia amilovora*. A su vez cuando se colonizó la superficie de las hojas con un hongo saprofítico, *Alternaria* sp, el patógeno *A. alternata* no penetró en la planta, aunque creció epifíticamente sobre las superficies de las hojas de tabaco (Lindow 1985).

2.1.2 Microorganismos endófitos

A pesar de que las células y tejidos internos de las plantas sanas generalmente son considerados estériles, se han aislado de dichas plantas una serie de microorganismos como bacterias, levaduras y hongos (Spurr y Welty 1975). Leben (1975) aisló hongos endofíticos de hojas aparentemente sanas de *Nicotiana tabacum* L. Para realizar el estudio de los microorganismos endofíticos Spurr y Welty (1975) eliminaron los epifitos de la superficie de la hoja con diferentes sustancias: alcohol, hipoclorito de sodio o cloruro de mercurio. Estos autores mencionan haber aislado 917 colonias endofíticas de hojas de tabaco, los microorganismos variaron en tipo, tamaño y localización dentro del tejido foliar. Las hifas fueron las principales estructuras observadas. Ocasionalmente encontraron hifas endofíticas emergiendo de la superficie foliar, donde identificaron esporas y estructuras de *Alternaria*,

Cladosporium y *Penicillium*. Los datos obtenidos por estos investigadores mostraron que las hojas nuevas (retoños) se encontraban libres de microorganismos endofíticos y que el número de éstos se incrementaba rápida y significativamente con el crecimiento y desarrollo de la hoja bajo condiciones de campo. Un listado presentado a partir de este trabajo mostró 13 géneros aislados de las hojas de tabaco en el campo. *Alternaria* fué encontrada en casi todas las hojas muestreadas, incluyendo un cultivar resistente a la mancha parda causada por este hongo. *Penicillium* fué el segundo microorganismo mas frecuente. Otros géneros hallados fueron *Aspergillus*, *Chaetomium*, *Cladosporium*, *Choanephora*, *Citosporeya*, *Epicoccum*, *Mucor*, *Nigrospora*, *Rhizopus*, *Stemphylium* y *Trichoderma*.

Jacobs *et al* (1985) encontraron, que contrario a la creencia de que la presencia de bacterias en el interior de tejidos de plantas se debía solamente a condiciones patológicas, se da la colonización de bacterias benéficas en los tejidos de plantas, como es el caso de las bacterias *Rhizobium* fijadoras de nitrógeno en leguminosas (Jacobs *et al* 1985). Al efectuar estos investigadores dicho estudio con la remolacha azucarera, hallaron que las bacterias no están distribuidas de manera uniforme a través de los tejidos infectados naturalmente. Observaron que las principales áreas de penetración de las bacterias es por heridas inducidas en el tejido, ya sea natural o artificialmente. Las

bacterias más comúnmente encontradas en este cultivo fueron: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Corynebacterium* sp, *Lactobacillus* sp y *Xanthomonas* sp.

Ogawa y Komada (1986) encontraron un alto grado de control de la marchitez por *Fusarium* en plantas de tomate, berenjena, pepino, melón y calabaza inoculadas con microorganismos simbióticos. En plantas de repollo, repollo chino y brócoli se observó un alto control a *Plasmodiophora brassicae*.

2.2 Características de los agentes de control biológico

Blakeman y Fokkema (1982) consideran de primordial importancia disponer de un antagonista capaz de mantenerse por si mismo en la planta hospedera. Otra característica importante es que puedan incrementar el antagonismo contra el patógeno, la competitividad con la microflora existente, la habilidad de multiplicarse bajo condiciones favorables y de persistir sobre la superficie del hospedero bajo condiciones desfavorables. Finalmente, que posean resistencia a ciertos plaguicidas que podrían formar parte de un programa de control integrado (Jacobsen y Backman 1993).

2.3 Mecanismos de actividad antagónica

Los agentes de control biológico tienen dos mecanismos de acción, directamente sobre el patógeno e indirectamente en sus mecanismos de actividad. Los mecanismos indirectos involucran la alteración de la fisiología de la planta. Algunos de estos mecanismos indirectos incluyen la producción de hormonas de crecimiento de las plantas, que aceleran el crecimiento de éstas o de sus raíces, mejorando el estado nutricional de las plantas (Frommel *et al*, 1991). Estos mecanismos pueden conducir a que la planta escape de la enfermedad o a mejorar su tolerancia al estrés. Los mecanismos directos del control biológico involucran antibiosis (Bruehl *et al* 1969, Cook and Baker 1983), competencia por nutrientes o nichos (Clark 1963, Baker 1981, Coosey and Moore 1982), y parasitismo (Henis *et al* 1978 1979, Tomashow and Weller, 1988).

2.4 Uso de antagonistas contra patógenos

2.4.1 Antagonistas a *M. fijiensis*

Al igual que cualquier superficie vegetal, encontramos las hojas de plátano colonizadas por diversos microorganismos epífitos. Estos pueden clasificarse en dos grupos: los que se multiplican en la filosfera sin causar daño a las hojas (residentes), y los transitorios (Blakeman and Fokkema 1982).

como *M. fijiensis* que provienen del aire y permanecen latentes hasta que existen condiciones climáticas propicias para su germinación (UPEB 1979).

Jiménez y Galindo (1985) aislaron 12 cepas bacteriales, que *in vitro* se comportaron como antagonistas a *M. fijiensis*. Tres de éstas cepas bacteriales correspondieron al género *Pseudomonas* sp. Esta bacteria mantuvo su antagonismo en experimentos en invernadero, y no permitió el desarrollo del hongo en las plantas donde fué inoculada, siendo superior a la aplicación de Clorotalonil. Estos estudios demostraron que la filosfera, en este caso de banano, contiene microorganismos que son antagonistas a *M. fijiensis*.

Segun Andrews (1992), el mecanismo de antagonismo posiblemente se da por competencia de nutrientes y por antibiosis.

González (1995) obtuvo una reducción significativa en el desarrollo de la sigatoka negra, al realizar aplicaciones foliares en plantas de banano con las bacterias quitinolíticas *Bacillus* spp, *Serratia marcescens* y *Serratia entomophyla*.

2.4.2 Antagonistas a *Alternaria solani*

Bacillus subtilis, en investigaciones realizadas por Vasudeva y Chakravarthi (1954), mostró antagonismo al

crecimiento de ciertos hongos parásitos en especial a *Alternaria solani*. Según estos investigadores, el antagonista provoca malformación del tubo germinativo del patógeno.

Fokkema and Lorbeer (1974) obtuvieron una reducción de hasta 50% en infecciones causadas en varios hospederos por *Alternaria* spp, al utilizar microorganismos antagonistas.

Spurr (1977) logró disminuir la severidad de la enfermedad del tabaco un 60% en experimentos de laboratorio y 65% en infecciones inducidas artificialmente en el campo, mediante aislamientos no patogénicos de *Alternaria* aplicados a las hojas de tabaco antes de ser inoculadas con *Alternaria alternata*.

Algunas razas bacteriales (*Pseudomonas* sp y *Serratia* sp mostraron antagonismo *in vitro* e *in vivo* hacia *Alternaria brassicicola* (Leifert *et al* 1993).

Hagedorn *et al* (1993) realizaron experimentos inoculando semillas de algodón con bacterias, resultando muchas de éstas antagónicas a *Alternaria solani*, lo que se manifestó en el incremento de cosecha y disminución de la enfermedad.

2.5 Métodos para selección de antagonistas

2.5.1 Estudios *in vitro*

Blakeman y Fokkema (1982) describen dos métodos para realizar bioensayos de selección de aislamientos individuales de antagonistas "*in vitro*", ya sean éstos bacteriales o fungos. El primero es la técnica de cultivos en platos con agar, con el fin de detectar zonas de inhibición del patógeno debidas al antagonista; y el segundo, la observación al microscopio del desarrollo de los patógenos en presencia del antagonista.

Los ensayos en agar pueden dar alguna indicación del mecanismo de interacción entre antagonista y patógeno. Sin embargo, esta vía puede presentar el problema de que microorganismos considerados como antagonistas no produzcan las zonas de inhibición esperadas en el patógeno, debido a la presencia de otros microorganismos que compiten con ellos por nutrientes (Blakeman y Fokkema 1982).

Los estudios al microscopio nos permiten examinar los efectos morfológicos del antagonista en el patógeno, tales como la inhibición de la germinación, el crecimiento anormal del tubo germinativo o la interferencia del desarrollo de estructuras infectivas. Este tipo de estudio puede ser comparado con similares observaciones hechas en la superficie del hospedero (Blakeman and Fokkema 1982).

Spurr (1977) utilizó para comparar la actividad de microorganismos epífitos y endófitos contra la mancha del tabaco, discos de hojas de plantas sanas de este cultivo. Dichos discos fueron asperjados con suspensiones de conidias de los distintos microorganismos.

El comportamiento del antagonista en el hospedero puede ser estudiado primero en un cuarto de crecimiento donde las densidades poblacionales del antagonista puedan ser controladas.

Un ensayo donde se compruebe solamente la presencia de los microorganismos antagónicos es insuficiente. En el caso de hongos hifales, la medición del tamaño de la colonia o la longitud de las hifas al observarlas al microscopio, son las más apropiadas. En el caso de levaduras y bacterias el método de cultivo en agar es también utilizado (Blakeman y Fokkema, 1982).

2.5.2 Estudios *in vivo*

Según Bashi y Fokkema (1977), el desarrollo del patógeno en plantas tratadas con antagonistas debe ser cuidadosamente comparado con plantas no tratadas. Para tal propósito, el invernadero o cuarto de crecimiento son más recomendables, ya que poseen una microflora limitada. Spurr Jr. (1979) ha

utilizado la esterilización parcial de las hojas con etanol al 70%.

Vasudeva *et al* (1954) reportaron experimentos en invernadero para evaluar la acción de *Bacillus subtilis* en relación a ciertos hongos, en especial a *Alternaria solani*.

Bussey *et al* (1991) utilizaron discos de hojas en experimentos para detectar la resistencia al tizón temprano causado por *Alternaria solani* en plantas de papa.

En experimentos de campo es importante la determinación de la microflora, tanto en las hojas tratadas como en las que no lo fueron. Esto es esencial para entender las interacciones entre los microorganismos: patógeno y antagonista. Pueden dirigirse también experimentos para comparar el efecto de la aplicación de un solo antagonista o la mezcla de dos o más sobre el desarrollo del patógeno y la enfermedad. El efecto de los agentes de control biológico en experimentos de campo deberían compararse con un control químico para una adecuada evaluación (Blakeman and Fokkema 1982).

2.6 Métodos para aplicación de antagonistas

Existen diversas formas de aplicar los microorganismos antagonistas a las plantas.

Newhook (1957) previno la enfermedad del tomate causada por *Botrytis cinerea* mediante la aplicación de *C. herbarum* al suelo. Otros investigadores a través de aplicaciones foliares a las plantas logran la disminución de los síntomas de enfermedades. Sherff (1973) mediante un alislamiento de *Bdellovibrio bacteriovorus* al ser aplicado en hojas de frijol previno el desarrollo de síntomas de la marchitez bacterial.

2.6.1 Bacterización en semillas y plántulas

La inoculación de semillas con microorganismos ha sido estudiada ultimamente. Este tipo de tratamiento ha resultado positivo en varios experimentos efectuados, ya que se ha obtenido un incremento en el rendimiento de las plantas aplicadas, aparentemente, por el control de algunos patógenos de la raíz (Hagedorn *et al* 1993).

Al realizar ensayos de campo para evaluar la inoculación de algunas bacterias en algodón para el control de los patógenos *Pythium ultimum* Trow y *Alternaria solani* Kuhn, Hagedorn *et al* (1993) encontraron que de 19 razas de bacterias estudiadas 10 de éstas y varias combinaciones de las mismas incrementaron la cosecha en pie de las plantas en muchos de los sitios estudiados, disminuyendo la presión de la enfermedad. Uno de los tratamientos bacteriales utilizados resultó superior al tratamiento con fungicida.

2.6.2 Aplicación de antagonistas combinada con una base alimenticia

Debido a que existe un balance microbiológico en el suelo, puede dificultarse el establecimiento de otro microorganismo en éste. Según Baker y Cook (1982), dicho balance puede ser alterado por cambios mayores en el ambiente, un shock ecológico que estimule, inhiba o destruya algunos elementos de la población; por lo que la adición de una enmienda favorable, por ejemplo residuos de leguminosas, es usada con *Bacillus subtilis* contra la sarna de la papa con el fin de destruir algunos patógenos y saprófitos, y mantener viva la flora de antagonistas. Estos autores mencionan la existencia de experimentos donde se intenta utilizar microorganismos del suelo en prácticas de control biológico, bajo condiciones de campo, a través de enmiendas orgánicas.

Hoitink *et al* (1986) han realizado experimentos para controlar enfermedades causadas por patógenos del suelo en plantas, utilizando compost. Encontraron que la supresión de la enfermedad, causada por *Sclerotinia minor*, está correlacionada con incrementos en la actividad microbial del suelo, pero a la vez, con cambios en N, P, Mg, Ca, y contenidos totales de materia orgánica del suelo tratado.

2.6.3 Método de inoculación endofítica inundativa a través del hipocotilo

Uno de los métodos de control biológico que ha sido implementado ultimamente, es la inoculación directa de microorganismos benéficos en plantas, a través del hipocótilo. En estudios realizados con algunos géneros de plantas, los microorganismos capaces de penetrar en éstas como lo hacen los patógenos, se establecerán en las mismas después de inocularlos. Entre los microorganismos que se han utilizado con éste propósito se encuentran cepas de *Fusarium* no patogénicas, VMT avirulento, *Glomus* (Mycorrhizae) y *Xanthomonas* como bacterias en simbiosis con la planta (Kijima 1993).

Aunque el establecimiento de microorganismos en plantas depende de la especie tratada, se ha confirmado la colonización de microorganismos en 9 familias de plantas: Solanaceae, Cucurbitaceae, Cruciferae, Leguminosae, Umbelliferae, Chenopodiaceae, Ranunculaceae, Rosaceae y Compositae.

En el futuro, es probable que los organismos aislados, seleccionados e inoculados mediante esta técnica puedan ser utilizados en una más amplia gama de plantas (Kijima 1993).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Localización de los experimentos

Los experimentos fueron realizados en el laboratorio de diagnóstico MIP-CATIE y en un invernadero del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE); Turrialba, Costa Rica.

3.2 Selección de microorganismos antagónicos a *A. solani*

3.2.1 Aislamiento de microorganismos epífitos

Para el aislamiento de microorganismos en tomate se utilizaron hojas de plantas de tomate comercial (*Lycopersicon esculentum*) cultivar Hayslip obtenidas en fincas de pequeños productores del cantón Guayabo, Turrialba, y hojas del cultivo silvestre de tomate (*Lycopersicon pimpinelifolium*) conocido como tomatillo, colectadas en el CATIE.

Las hojas recolectadas en el campo fueron llevadas al laboratorio. Con la ayuda de una tijera se cortaron pequeños trozos del material, de aproximadamente 1 cm², se pesaron 3.5 g del mismo, los que fueron colocados en un erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de agua destilada estéril. Estos se agitaron durante 30 min en un agitador (reciprocal shaker). De la solución obtenida se tomó 1 ml que fué colocado en un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril.

Posteriormente se procedió a realizar las diluciones desde 100 hasta 10^{-3} , según la técnica empleada por Leben (1961). De las diluciones se tomó 0.5 ml que fué rayado en platos petri que contenían los medios nutritivos papa-dextrosa-agar (PDA), para el crecimiento de hongos, y agar nutriente (AN) para el crecimiento de bacterias. Los platos petri fueron depositados en una incubadora a 26°C para favorecer el crecimiento de los distintos microorganismos. Se seleccionaron 20 cepas (12 fungosas y 8 bacteriales) por sus diferencias morfológicas. Las cepas se purificaron en los medios nutritivos mencionados y se conservaron en viales a los que se les colocó aceite mineral estéril, para evitar la contaminación y degeneración de las características de los microorganismos.

3.2.2 Aislamiento de microorganismos endofíticos

3.2.2.1 Desinfección del material

Fueron efectuadas diferentes pruebas de desinfección para el aislamiento de microorganismos endofíticos. El material utilizado fueron trozos de hojas del cultivo. Se empleó un rango de tiempos de desinfección desde 2 hasta 20 min para determinar el más adecuado para el aislamiento. A través de la desinfección del material se pretendió eliminar los microorganismos epifíticos de las hojas y determinar de ésta manera la presencia de los endofíticos.

A continuación se detallan los diferentes tratamientos:

- Hipoclorito de sodio al 1% durante 2 minutos
- Alcohol 70% durante 2 minutos
- Hipoclorito de sodio al 1% durante 5 minutos
- Alcohol al 70% durante 5 minutos
- Hipoclorito de sodio al 1% durante 10 minutos
- Alcohol 70% durante 10 minutos
- Hipoclorito al 1% durante 15 minutos
- Alcohol 70% durante 15 minutos
- Hipoclorito de sodio al 1% durante 20 minutos
- Alcohol 70% durante 20 minutos

Cada uno de los tratamientos fué comparado con un testigo el cual consistió en trozos de hojas del material sin desinfección.

Para comprobar si los microorganismos obtenidos después de la desinfección eran organismos endofíticos y no organismos epifíticos que escaparon a ésta, se realizó una prueba con las bacterias *Pseudomonas* spp, *Serratia* sp y el hongo *Aspergillus* sp, en tres tratamientos para cada uno de los organismos, los cuales consistieron en:

Testigo: Discos de papel filtro inoculados con una suspensión de 10⁴ (cfc) de los organismos mencionados.

Tratamiento 1: Discos de papel filtro inoculados con una suspensión de 10⁴ (cfc) de los organismos mencionados. Los

discos fueron posteriormente desinfectados con hipoclorito de sodio al 1% en dos tiempos, 2 y 5 min.

Tratamiento 2: Discos de hojas de tomate inoculadas con una suspensión de 10^4 (cfc) de los organismos mencionados. Los discos de hojas fueron posteriormente desinfectados con hipoclorito de sodio al 1% en dos tiempos, 2 y 5 min.

Todos los tratamientos contaron con tres repeticiones.

Después de la desinfección e inoculación de los discos, tanto de papel filtro, como de hojas de tomate, éstos fueron tomados con pinzas y depositados por 30 seg en platos petri con los medios PDA, en el caso de *Aspergillus* sp y AN en el caso de *Pseudomonas* sp y *Serratia* sp. Los platos petri fueron colocados en una incubadora a 260 C. El crecimiento microbial fué observado en las bacterias a las 48 h, y en el hongo a las 72 h.

Los microorganismos mencionados anteriormente, fueron seleccionados debido a sus diferentes características de crecimiento. La bacteria *Serratia* sp se considera bastante persistente en la superficie de las hojas y de rápido crecimiento (González 1995).

El medio PDA, fué utilizado para el crecimiento de hongos y bacterias. Para evitar que éstas últimas, por su característica de rápido crecimiento, inhibieran el desarrollo de microorganismos fungosos, se usó ácido

láctico en el medio de cultivo donde se definía dicho crecimiento.

3.2.2.2 Aislamiento de microorganismos

El aislamiento de los microorganismos endofíticos de tomate se realizó como se describe a continuación:

Las hojas, tanto de tomate comercial como de tomate silvestre recolectadas en el campo, fueron llevadas al laboratorio siendo cortadas en trozos pequeños de aproximadamente 1 cm². Se procedió a continuación a la desinfección del material (3.5 g) con hipoclorito de sodio al 1% durante 5 minutos, seguidos de 3 enjuagues con agua destilada estéril. En una copa de acero estéril fueron licuados los 3.5 g por separado, para cada especie utilizada. De la solución obtenida se tomó 1 ml, el cual fué colocado en un tubo de ensayo que contenía 9 ml de agua destilada estéril. De acuerdo a la técnica de diluciones (Leben 1961), se trabajó con concentraciones desde 10⁰ hasta 10⁻³. Al igual que en el aislamiento de microorganismos epífitos, los endófitos fueron rayados en platos petri con medio nutritivo PDA y AN. Se seleccionaron 3 cepas fungosas y 4 bacteriales con base en su morfología, las cuales fueron purificadas en los medios nutritivos ya mencionados. Finalmente, los platos petri fueron colocados en una incubadora a 26°C.

Los microorganismos se conservaron en viales con aceite mineral estéril.

3.3 Prueba de antagonismo

Para realizar este experimento se utilizaron algunos de los microorganismos aislados en el laboratorio. Además se trabajó con aislamientos antagónicos a *A. solani* y *P. infestans* previamente seleccionados en el laboratorio MIP-CATIE.

Estos microorganismos fueron:

- *Bacillus* A28
- *Bacillus* B51
- *Bacillus* B53
- *Fusarium* sp (52H)
- Bact.crema-5
- Bact.crema-6
- Bact. crema-7

Los microorganismos epifíticos y endofíticos aislados con anterioridad de las hojas de tomate, se prepararon en suspensiones, ajustándose éstas con ayuda de la cámara de contaje Petroff-Hausser a 10⁹ células bacteriales o fungosas por ml.

Para obtener la suspensión del patógeno, fueron sembrados en platos petri con el medio nutritivo V-8, trozos de hojas de tomate de un tamaño aproximado de 1cm², las cuales se encontraban infectadas con *A. solani*. Los platos petri se mantuvieron a una temperatura de 21 OC. Después de 10 días fueron colocados bajo un chorro de agua suave durante 24 horas; luego se eliminó el agua de los platos petri exponiéndose éstos a 12 horas de luz ultravioleta y 12 horas de obscuridad por espacio de 3 días, de esta manera se estimuló la esporulación del hongo (Dhingra y Sinclair 1985). Finalmente, se cosecharon las esporas lavando la superficie del medio con agua destilada estéril. Las esporas fueron colectadas en un beaker.

Para calibrar la suspensión a la concentración requerida, el inóculo se centrifugó inmediatamente antes de la inoculación a 3000 rpm durante 20 minutos. La suspensión fué llevada a una concentración de 10⁴ conidios por ml, diluyéndose con agua destilada estéril.

Las pruebas de antagonismo se realizaron de acuerdo a la metodología de Bussey y Stevenson (1991), con la modificación de utilizar foliolos enteros. Se colectaron hojas de plantas de tomate de invernadero de 3 semanas a 2 meses de emergidas. Se tomaron las hojas totalmente expandidas de las plántulas.

Las hojas fueron inoculadas con los distintos microorganismos sumergiéndolas en una solución previamente

calibrada de los mismos. El material fué dejado al aire libre durante 20 min después de lo cual, fueron inoculadas con el patógeno por medio de un aspersor De vilbiss.

Para colocar los distintos tratamientos se emplearon platos petri que contenian un papel filtro húmedo en su base, encima de éste un tubo de vidrio en forma de V y finalmente un porta objeto sobre el cuál fueron colocados los folioloos tratados. Cada tratamiento contó con tres repeticiones las que fueron puestas en cajas plásticas de 30 x 7 x 5 cm. Los tratamientos se mantuvieron a una temperatura de 18 a 23 OC.

Se efectuaron dos evaluaciones, a los 3 y 5 días después de inoculado el material. Se midió el área del foliolo sirviendo como base el área de un triángulo. También se contó el número de lesiones por foliolo y el tamaño de 15 lesiones, para luego calcular el área de la hoja afectada por la enfermedad, en este caso se utilizó el área de una elipse.

El diseño experimental fué un DCA con tres repeticiones. La unidad experimental correspondió a un foliolo. Se realizó una comparación del testigo con los diferentes tratamientos mediante la prueba Dunnett, para determinar posibles microorganismos antagonistas. Se realizó la transformación de $\ln(x+1)$ para número de lesiones y para el porcentaje de lesiones el arc-sen de la raíz cuadrada.

3.4 Selección de microorganismos antagónicos a *Mycosphaerella fijiensis*

3.4.1 Aislamiento de microorganismos epífitos

El aislamiento de microorganismos en plátano fué realizado a partir de hojas de este cultivo obtenidas de la finca experimental "La Montaña", del CATIE. Se utilizaron hojas 2 y 3 según Stover (1987) de plátano de la variedad Curraré, y hojas de plátano silvestre (*Canna edulis*). Se realizó la misma técnica descrita anteriormente en el aislamiento de microorganismos de tomate.

Se seleccionaron 6 cepas fungosas y 14 bacteriales con base en su morfología. Los platos petri fueron puestos dentro de una incubadora a 26°C para favorecer el crecimiento de los microorganismos. Estas cepas también fueron conservadas en viales con aceite mineral estéril.

3.4.2 Aislamiento de microorganismos endofíticos

Al igual que para el aislamiento de microorganismos epífitos el material de plátano Curraré y plátano silvestre fué obtenido de la finca experimental "La Montaña" y de los alrededores del CATIE respectivamente.

La técnica de aislamiento fué la misma utilizada en el cultivo del tomate. Con este procedimiento se pudieron obtener distintas cepas bacteriales, las que fueron colocadas en una incubadora a 26°C para favorecer su crecimiento, siendo conservadas también en viales con aceite mineral estéril.

3.5 Eficiencia del método de inoculación endofítica

3.5.1 En tomate contra *A. solani*

La prueba fué realizada en invernadero, con plántulas de tomate que tenían de 2 a 3 hojas verdaderas. Estas fueron tratadas con los siguientes microorganismos considerados antagónicos a *A. solani* en las pruebas efectuadas en el laboratorio:

- Bacteria crema-2
- Bacteria crema-4
- *Bacillus* A 28
- *Serratia entomophyla*
- *Fusarium* sp (52H)
- *Trichoderma harzianum*
- Extracto fermentado de Bocashi (9:1- agua-bocashi)

Se utilizó el método de inundación endofítica por el hipocótilo, ya mencionado. El hipocótilo de las plántulas de

tomate fué cortado inmediatamente antes de sumergirlas en la solución con los microorganismos antagónicos. Estas suspensiones fueron calibradas, en el caso de bacterias, en el contador Petroff-Hausser (French y Hebert 1982) y para hongos en un hematocimetro. Las plántulas se mantuvieron dentro de las suspensiones durante 4 horas. Después de este tiempo fueron sembradas en macetas de 2 kg con tres diferentes tratamientos de sustrato para determinar si habia interacción entre éstos y los microorganismos estudiados. Los sustratos son descritos a continuación:

- 1- suelo esterilizado + abono orgánico Bocashi esterilizado
- 2- suelo esterilizado + abono orgánico Bocashi no esterilizado
- 3- suelo esterilizado

El Bocashi consiste en una mezcla en proporciones iguales de tierra, semolina de arroz, carbón en polvo, gallinaza y cáscara de arroz pasados por un proceso de fermentación. En el experimento fué mezclado con el suelo en una proporción 12% v/v.

A los diferentes tratamientos de sustrato se les realizó un análisis de fertilidad. Los resultados de éste se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Análisis de fertilidad de suelos, efectuado para los sustratos: suelo esterilizado + bocashi esterilizado (1); suelo esterilizado + bocashi no esterilizado (2) y suelo esterilizado (3).

Trat	Prof (cm)	pH Agua	P mg/l	Ca (meq/100 ml suelo)	Mg	K	Acid Ext	M.O %	N %
1	0-20	5.75	46.1	5.00	1.83	1.28	0.30	6.35	0.35
2	0-20	6.41	73.5	5.90	2.33	2.18	0.20	8.40	0.43
3	0-20	5.38	18.2	4.02	1.00	0.73	0.45	5.55	0.29

El manejo agronómico dado al material consistió en: riegos diarios; aplicación del fungicida benomyl debido a un brote de *Cladosporium* en el invernadero; y finalmente una aplicación del abono foliar Nutrifoska.

A los 32 días de la aplicación endofítica de microorganismos en las plantas, éstas fueron inoculadas con el patógeno *A. solani* calibrado a 104 conidias por ml. Catorce días después se realizó una segunda inoculación. La inoculaciones se efectuaron con la ayuda de un atomizador De vilbiss y un compresor General electric a 15 lb de presión.

Para cada inoculación fueron efectuadas dos evaluaciones, a los 3 y 6 días, respectivamente.

Las variables evaluadas fueron: número y tamaño de lesiones, índice de enfermedad y finalmente, se evaluó la altura de planta para conocer el efecto de la aplicación de microorganismos vía endofítica en el desarrollo de las mismas.

Se utilizó un DCA en un arreglo factorial, con tres repeticiones. Los factores estudiados fueron: el sustrato y los diferentes microorganismos antagonicos. Se usó la transformación $\ln(x+1)$ para numero de lesiones y el arc-sen de la raíz cuadrada para el índice de enfermedad.

3.5.2 En plátano contra *M. fijiensis*

Las pruebas de antagonismo in vivo fueron realizadas en el invernadero. Se utilizaron plántulas de plátano de cultivo de tejidos de 30 días en la etapa de aclimatación. Debido a que no se realizó la etapa de prueba para los organismos antagonistas en este cultivo, las plántulas fueron tratadas con microorganismos seleccionados previamente como promisorios antagonistas a *M. fijiensis* en el laboratorio de fitopatología del proyecto Manejo Integrado de Plagas (MIP) del CATIE.

Los organismos estudiados fueron:

- *Serratia entomophyla* (SE)
- *Fusarium* sp (52H)
- *Bacillus* spp cepa A30 (A30)
- *Serratia marcescens* (R1)
- *Bacillus* spp cepa A28 (A28)
- Extracto fermentado de Bocashi: (BM)

Para la aplicación de los microorganismos vía endofítica, se siguió la metodología de inoculación endofítica inundativa a través del hipocótilo (Kijima 1993).

Las plántulas fueron sacadas de los tubos de ensayo lavándose el agar depositado en las raíces, en un chorro de agua suave. Una vez que las raíces estuvieron limpias, se introdujo la plántula en la suspensión de microorganismos, cortándose todas las raíces dentro de la suspensión con la ayuda de una tijera curva para facilitar el proceso. La calibración de la suspensión de microorganismos se llevó a cabo, en el caso de bacterias en la cámara de contaje Petroff-Hausser (French y Hebert 1982), y en el caso de hongos en un hematocimetro .

Las plántulas permanecieron durante 4 horas en las distintas suspensiones. Luego fueron sembradas en macetas de 2 kg que contenían suelo obtenido en la finca Cabiria. El suelo se esterilizó por 17 horas en un horno a temperatura de 180 °C.

Las plantas recibieron 3 riegos diarios para mantener una humedad constante.

A los 37 días las plantas fueron inoculadas con una suspensión calibrada de 104 conidios por ml del patógeno (*M. fijiensis*) Los conidios fueron obtenidos de acuerdo a la metodología de Tapia (1993), la cual consiste en realizar descargas de ascosporas obtenidas de tejido necrosado por la

enfermedad sobre agar-agua al 5%. A continuación se toma una ascospora por cultivo poniéndose a crecer ésta en un tubo inclinado con Mycophyl-agar durante diez días, después de los cuales se traslada a platos petri con el medio V-8 modificado, colocándose en una cámara de crecimiento a 25°C y luz constante durante 10 días. La suspensión de conidios para la inoculación, fué obtenida macerando con agua estéril el micelio logrado por el procedimiento anterior, y al cual se le agregó gelatina al 1% para favorecer la adherencia de los conidios a la superficie inoculada. Después de la inoculación se esperó aproximadamente durante 20 min para que la solución se secase en la superficie de las hojas. A continuación las plantas fueron llevadas a una cámara de crecimiento con humedad y luz constante, y una temperatura de 25°C. En estas condiciones las plantas permanecieron por espacio de cinco días después de los cuáles fueron transferidas a cámaras plásticas en el invernadero. El objetivo de las cámaras fué mantener las condiciones propicias para la penetración del patógeno.

Debido a la aparición de un hongo contaminante se realizó labor de saneamiento en las hojas afectadas. Las plantas además, fueron sometidas a períodos de estrés hídrico para la eliminación de dicho contaminante.

Las inoculaciones con conidios de *M. fijiensis* fueron repetidas por 3 veces.

Los síntomas fueron evaluados según la escala de Foure (1989) tomando en cuenta el parámetro periodo de incubación, el cual corresponde a la aparición de los primeros síntomas de la enfermedad, a partir de la fecha de inoculación del patógeno.

Se inocularon plántulas únicamente con el patógeno para comparar el efecto de retardo sobre la aparición de los síntomas en las plantas aplicadas con los microorganismos. De manera paralela se midió la altura de las plantas.

El diseño experimental que se utilizó fue un DCA con cinco repeticiones. Se realizó un análisis de comparación de medias mediante la prueba Dunnett.

Se efectuó un análisis de correlación entre los tratamientos y la altura de planta.

4. RESULTADOS

4.1 Procedimiento de desinfección para aislar microorganismos endofíticos

Al desinfectar las hojas de tomate, se pretendió eliminar cualquier microorganismo que estuviera creciendo epifíticamente sobre el material, de tal manera, que el microorganismo endofítico pudiera crecer sin contaminación. Para tal efecto, ver cuadro 2, los tiempos de exposición de 10, 15 y 20 min con hipoclorito de sodio al 1% y de 15 y 20 con alcohol al 70% no permitieron el crecimiento de microorganismos. Con la desinfección durante 2 min si apareció el desarrollo de hongos y bacterias contaminantes del filoplano. Cuando se usó una exposición de 5 min no se observaron microorganismos epifíticos pero si endofíticos.

Cuadro 2. Desinfección de trozos de hojas de tomate para el aislamiento de microorganismos endofíticos de acuerdo al uso de hipoclorito de sodio 1% y alcohol al 70% en diferentes tiempos de exposición.

Desinfectante	Tiempo de exposición (min)	Presencia de microorganismos en discos de hojas	
		enteras Epifitos	licuadas Endófitos
Hipoclorito de sodio 1%	2	si	si
	5	no	si
	10	no	no
	15	no	no
	20	no	no
Alcohol 70%	2	si	si
	5	si	si
	10	si	si
	15	no	no
	20	no	no

Mediante los experimentos con discos de hojas, se determinó que la mejor desinfección para el aislamiento de microorganismos endofíticos, fué la de exposición a hipoclorito de sodio durante 5 min. Debido a que éste tratamiento no permitió el crecimiento de *Pseudomonas* sp *Aspergillus* sp y *Serratia* sp, microorganismos utilizados como indicadores en el experimento (Cuadro 3). A pesar que en los tratamientos de discos de papel filtro, solo se observó crecimiento de *Serratia* sp con la exposición de dos minutos en hipoclorito de sodio, se comprobó la presencia de los 3 microorganismos en los tratamientos de discos de hojas (Cuadro 3). Por lo tanto, se consideró este tiempo de exposición insuficiente para eliminar los microorganismos de la superficie de las hojas.

La bacteria *Serratia* sp se detectó en todos los tratamientos a excepción de discos de hojas tratados con hipoclorito de sodio por 5 min.

Cuadro 3. Prueba de crecimiento de los microorganismos *Pseudomonas* sp, *Aspergillus* sp y *Serratia* sp con desinfección de hipoclorito de sodio por 2 y 5 minutos, para determinar la mejor desinfección en el aislamiento de endofíticos.

Tratamiento	Exposición a NAOCL (min)	Crecimiento de microorganismos*		
		P	A	S
Discos de papel + microorganismos	0	si	si	si
Discos de papel + microorganismos	2	no	no	si
Discos de hojas + microorganismos	2	si	si	si
Discos de papel + microorganismos	5	no	no	no
Discos de hojas + microorganismos	5	no	no	no

* P: *Pseudomonas* sp; A: *Aspergillus* sp ; S: *Serratia* sp

4.2 Selección en laboratorio de microorganismos antagónicos *A. solani*.

De los diferentes aislamientos realizados en hojas de plantas de tomate comercial y silvestre, con las diluciones 10^0 , 10^{-1} y 10^{-2} , se observaron de 608 colonias, entre bacterias y hongos. Solo 76 colonias fueron de origen endofítico, lo que representa apenas el 12.5% de la población total. De las diluciones 10^{-3} no se obtuvo ningún organismo. Muchas de éstas colonias presentaron crecimiento y color similar, por lo que fueron tomadas solo 48 de ellas. De éste número , 28 colonias fueron aisladas de hojas de tomate

(*Lycopersicon esculentum*) cultivar comercial Hayslip, y las otras 20 de hojas de tomate silvestre (*Lycopersicon pimpinelifolium*).

Después de que las colonias aisladas fueron purificadas en los medios de cultivo PDA y AN, se seleccionaron 26 microorganismos con base en su morfología y color (Cuadro 4 y 5). La mayoría de microorganismos endofíticos fueron bacterias, encontrándose solamente los hongos *Cladosporium* sp y *Curvularia* sp.

Cuadro 4. Hongos seleccionados para las pruebas *in vivo* de antagonismo hacia *A. solani* en tomate.

Microorganismo fungoso	Tipo de aislamiento
<i>Cladosporium</i> sp (1)	Endofítico
<i>Cladosporium</i> sp (2)	Epifítico
<i>Cladosporium</i> sp (3)	Endofítico
<i>Cladosporium</i> sp (4)	Epifítico
<i>Cladosporium</i> sp (5)	Epifítico
<i>Curvularia</i> sp	Endofítico
<i>Curvularia</i> sp	Epifítico
<i>Curvularia</i> sp	Epifítico
<i>Curvularia</i> sp	Epifítico
<i>Fusarium</i> sp (52H)	Epifítico
<i>Fusarium</i> sp	Epifítico
<i>Nigrospora</i> sp	Epifítico
<i>Pestalotia</i> sp	Epifítico
<i>Aspergillus</i> sp	Epifítico

Cuadro 5. Bacterias seleccionadas por color y morfología de colonia para las pruebas *in vivo* de antagonismo hacia *A. solani* en tomate.

Color de colonia bacterial	Tipo de aislamiento
crema-1	Endofítica
crema-2	Endofítica
crema-3	Endofítica
crema-4	Endofítica
rosada-1	Epifítica
rosada-2	Epifítica
amarilla-1	Epifítica
amarilla-2	Epifítica
amarilla-3	Epifítica
anaranjada-1	Epifítica
<i>Bacillus</i> sp	Epifítico
amarilla-crema-1	Epifítica

En las pruebas *in vivo* se seleccionaron como antagonistas a *A. solani*, 13 de los organismos estudiados. Estos tratamientos mostraron un porcentaje de área afectada por la enfermedad significativamente menor que el testigo (Cuadro 6).

Cuadro 6. Pruebas *in vivo*. Evaluación del porcentaje de área afectada, número de lesiones y tamaño de las mismas causadas por el tizón temprano *A. solani* en tomate, en los diferentes tratamientos estudiados.

Tratamiento	Prueba Dunnette		
	% de área afectada	Número de lesiones	Tamaño de lesiones
<i>Bacterias</i>			
crema-1	N.S	N.S	N.S
crema-2	*	*	*
crema-3	N.S	N.S	N.S
crema-4	*	*	*
crema-5	*	N.S	*
crema-6	*	N.S	*
crema-7	*	*	N.S
rosada-1	N.S	N.S	N.S
rosada-2	*	*	N.S
amarilla-1	*	N.S	N.S
amarilla-2	N.S	N.S	N.S
amarilla-3	N.S	N.S	N.S
amarilla-4	N.S	*	N.S
amarilla-5	N.S	N.S	*
anaranjada-1	N.S	*	N.S
<i>Bacillus</i> sp	N.S	N.S	N.S
<i>Bacillus</i> A28	*	*	N.S
<i>Bacillus</i> B51	N.S	N.S	N.S
<i>Bacillus</i> B53	N.S	N.S	N.S
<i>Hongos</i>			
<i>Pestalotia</i> sp	N.S	N.S	N.S
<i>Cladosporium</i> sp	N.S	N.S	N.S
<i>Fusarium</i> sp (52H)	*	N.S	*
<i>Curvularia</i> sp	*	N.S	N.S
<i>Cladosporium</i> sp (1)	*	N.S	N.S
<i>Nigrospora</i> sp	*	N.S	*
<i>Fusarium</i> sp	*	N.S	*

N.S= no significativo

* nivel de significancia al 1% según la prueba de Dunnett.

Para los experimentos en invernadero, se tomaron los tratamientos que presentaron un porcentaje de control mayor al 50%, éstos valores son mostrados en el cuadro 7.

Cuadro 7. Comportamiento de diferentes tratamientos en relación al porcentaje de área afectada por el tizón temprano en folíolos de hojas de tomate desprendidos, y el porcentaje de control de la enfermedad dado por cada uno.

Microorganismo probado	Area foliar afectada		Control de la enfermedad (%)
	Tratamiento	Testigo	
Bact.crema-2	21	70	70
<i>Fusarium</i> sp (52H)	28	99	72
Bact.crema-4	35	97	64
<i>Bacillus</i> A28	44	97	55
<i>Fusarium</i> sp	45	67	33
Bact.crema-6	49	69	30
<i>Curvularia</i> sp	49	67	27
Bact. crema-5	50	69	28
<i>Nigrospora</i> sp	50	67	25
Bact.rosada-2	51	70	27
Bact.crema-7	60	90	39
<i>Cladosporium</i> sp	78	99	21
Bact. amarilla-1	60	90	39

4.3 Efecto de los tratamientos sobre el tizón temprano en plantas de tomate en invernadero.

En este experimento fueron analizados el efecto de los tratamientos *Fusarium* sp (52H), *Bacillus* A28, bacteria crema-2, bacteria crema-4, Extracto de Bocashi fermentado, *Serratia entomophyla* y *Trichoderma harzianum*; el efecto de los suelos: suelo estéril+Bocashi estéril, suelo estéril+Bocashi no estéril y suelo estéril; finalmente se analizó el efecto de la interacción tratamiento y suelo.

Se evaluaron las variables número de lesiones, el tamaño de lesiones y el índice de enfermedad.

Se realizaron dos inoculaciones del patógeno *A. solani* en las plantas de tomate de invernadero. Debido a esto, los resultados fueron separados de acuerdo a la primera y segunda inoculación.

4.3.1 Primera Inoculación

Esta inoculación se realizó a los 32 días después de ser tratadas las plantas de tomate con los diferentes microorganismos mediante la técnica de corte del hipocótilo.

En la Figura 1 se presenta el desarrollo de la enfermedad, en cuanto al número de lesiones, tamaño de lesiones e índice de enfermedad, en las dos evaluaciones efectuadas a los 3 y 6 días después de inoculadas las plantas con *A. solani*.

En la primera evaluación se observó diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) entre tratamientos (Anexo 1) para la variable número de lesiones. De acuerdo a la prueba de Dunnett el único tratamiento diferente al testigo fue el extracto de Bocashi fermentado, el cual presentó el menor número de lesiones.

En esta misma Figura se muestran las medias del tamaño de lesiones a los 3 y 6 días después de inoculadas las plantas. Se encontró diferencia estadísticamente significativa entre tratamientos ($p < 1\%$) para el tamaño de

lesiones, y para la interacción tratamiento por suelo (Anexo 1) en la primera evaluación. Sin embargo, la prueba de Dunnett no mostró diferencias entre los tratamientos con el testigo.

En la Figura 1 se observa el índice de enfermedad para los diferentes tratamientos en las evaluaciones a los 3 y 6 días de inoculadas las plantas (DDI). Se encontró diferencia estadísticamente significativa ($p < 5\%$) entre los tratamientos (Anexo 1 y 2), pero no entre éstos y el testigo, para la primera evaluación.

Se observó una correlación positiva entre la altura de planta y el número de lesiones (0.705); y la altura de planta y el tamaño de lesiones (0.414).

En la segunda evaluación, no se observó diferencia estadísticamente significativa para ninguna de las variables estudiadas.

La altura de planta resultó significativamente menor ($p < 0.01$) (Anexo 5) para el tratamiento extracto de Bocashi fermentado (Figura 3). Estos resultados fueron los mismos para los 3 y 6 días de inoculadas las plantas.

Se encontró una correlación positiva entre la altura de planta y el número (0.782) y tamaño de lesiones (0.403).

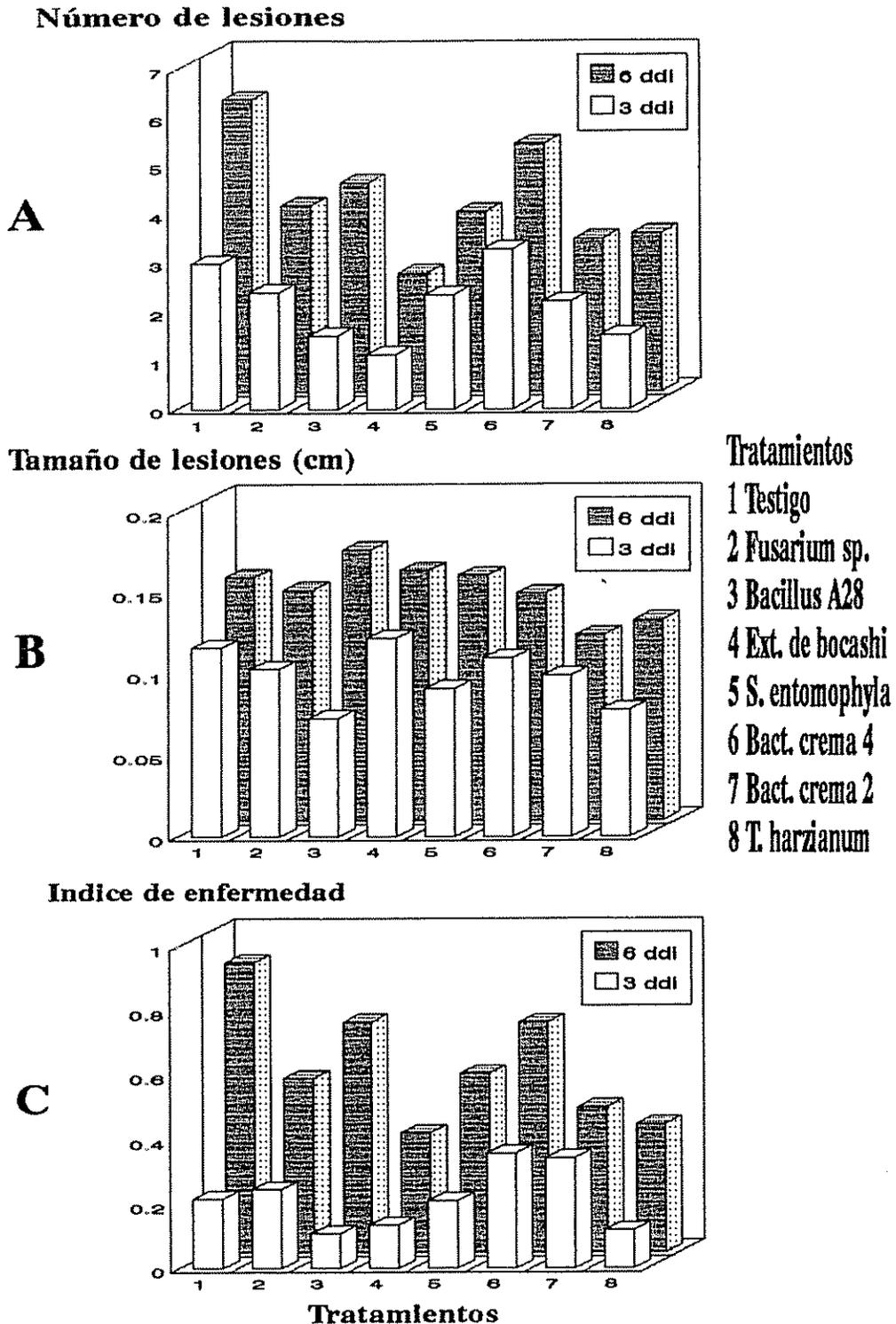
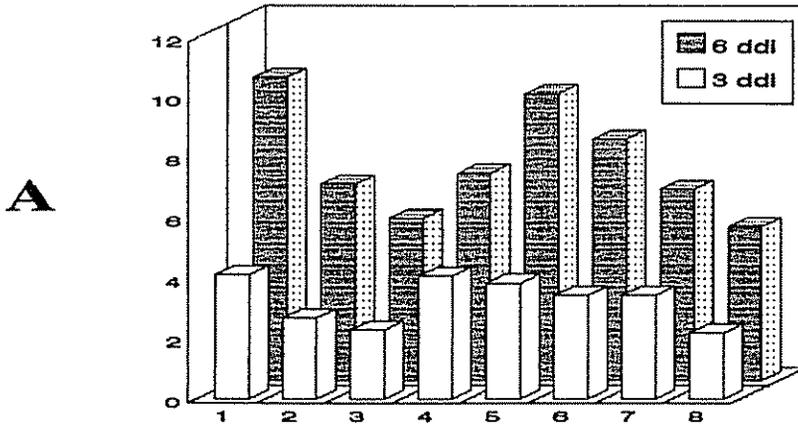
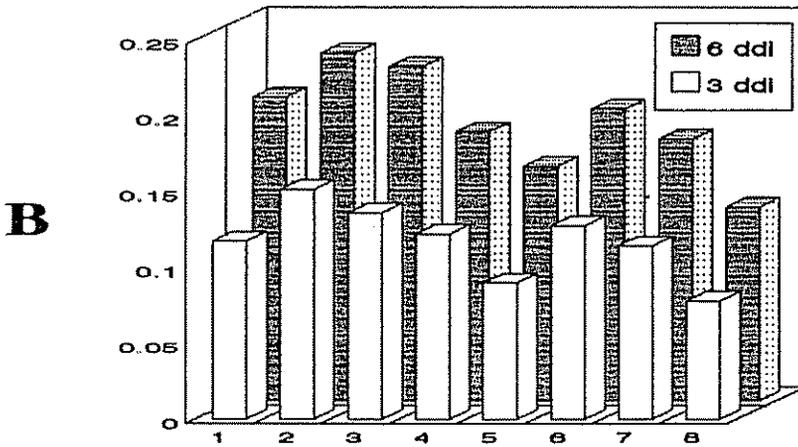


Figura 1. Número de lesiones (A), tamaño de lesiones (B) e índice de enfermedad (C), en plantas de tomate de invernadero a los 3 y 6 días después de inoculadas (ddi) con *A. solani*. Primera inoculación.

Número de lesiones



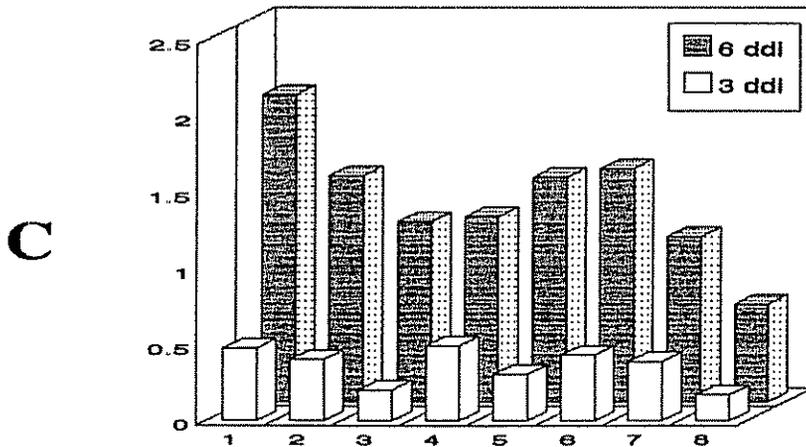
Tamaño de lesiones (cm)



Tratamientos

- 1 Testigo
- 2 *Fusarium* sp.
- 3 *Bacillus* A28
- 4 Ext. de bocashi
- 5 *S. entomophyla*
- 6 Bact. crema 4
- 7 Bact. crema 2
- 8 *T. harzianum*

Índice de enfermedad



Tratamientos

Figura 2. Número de lesiones (A), tamaño de lesiones (B) e índice de enfermedad (C), en plantas de tomate de invernadero a los 3 y 6 días después de inoculadas (ddi) con *A. solani*. Segunda inoculación.

Altura de plantas (cm)

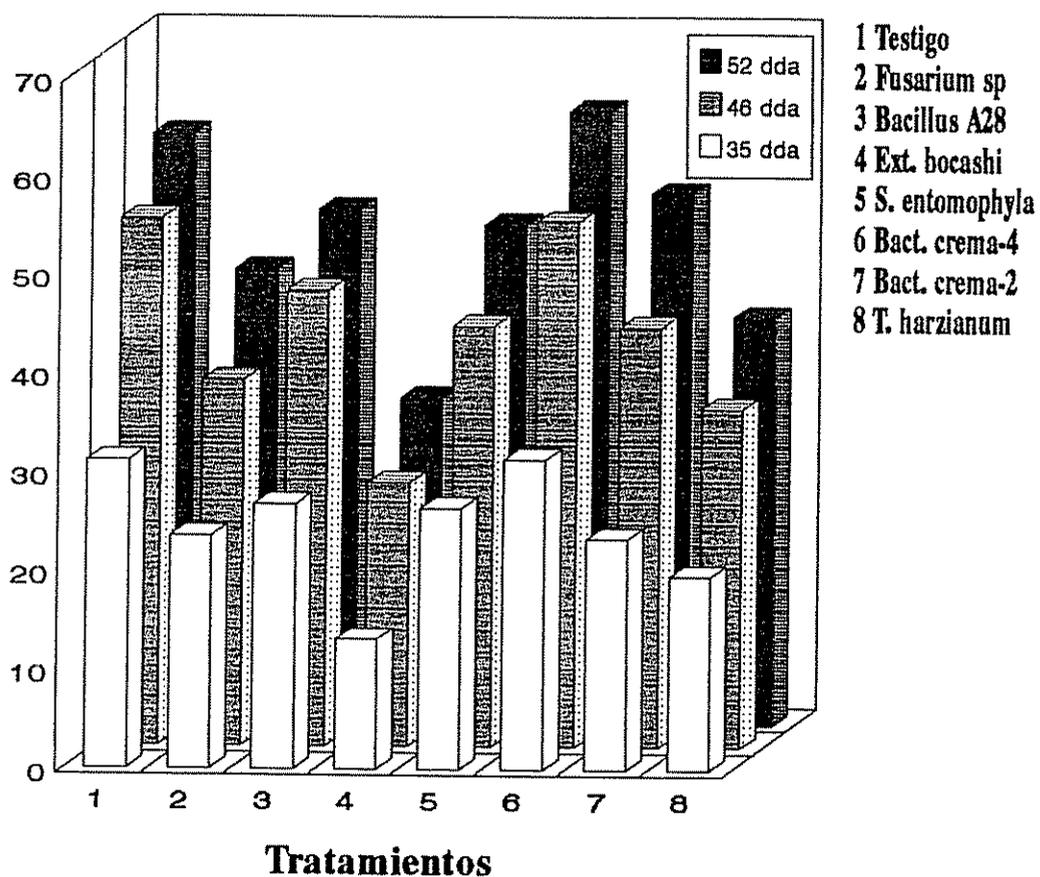


Figura 3. Altura de plantas de tomate a los 35, 46 y 52 días después de aplicados (dda) los diferentes tratamientos vía endofítica.

4.3.2 Segunda inoculación

La segunda inoculación de *A.solani* en las plantas de tomate de invernadero, fué realizada a los 14 días después de la primera. Fueron efectuadas 2 evaluaciones, a los 3 y 6 días después de la inoculación.

En la Figura 2 se observa el comportamiento de la enfermedad, en función del número de lesiones desarrolladas durante las dos evaluaciones. La primera evaluación (3 DDI) mostró diferencia estadística altamente significativa ($p < 1\%$) entre los tratamientos, y para la interacción tratamiento y suelo (Anexo 3).

Los tratamientos *Trichoderma harzianum* y el *Bacillus* A28, mostraron en la prueba de Dunnett diferencias con el testigo, siendo los tratamientos con el menor número de lesiones (Figura 2).

Se encontró también en ésta evaluación, diferencia estadística significativa ($p < 1\%$) del tamaño de lesiones entre tratamientos (Figura 2), no así para la interacción tratamiento y suelo (Anexo 3).

La variable índice de enfermedad presentó diferencia estadística altamente significativa ($p < 1\%$) entre tratamientos, y para la interacción tratamiento y suelo (Figura 2), Los tratamientos *Trichoderma harzianum* y el *Bacillus* A28, tuvieron el menor índice de enfermedad.

La altura de planta fué menor, al igual que en la primera inoculación para el tratamiento extracto de Bocashi fermentado (Figura 3).

Se correlacionó la altura de planta con el número y tamaño de lesiones, resultando esta correlación negativa para el tamaño de lesión (-0.077) y positiva para el número de lesiones (0.066).

A los 6 días de la inoculación se encontró diferencia estadística significativa ($p < 5\%$) entre tratamientos, para el número de lesiones (Figura 2). La prueba de Dunnett mostró diferencia entre el tratamiento *Trichoderma harzianum* y el testigo (Anexo 4).

La variable índice de enfermedad mostró diferencias estadísticas significativas ($p < 0.1$) entre tratamientos. El tratamiento *T. harzianum* presentó el menor índice de enfermedad en relación al testigo (Anexo 4).

No se presentó correlación entre la altura de planta y el número y tamaño de lesiones. El tratamiento extracto de Bocashi fermentado mostró diferencias estadísticamente significativas (Anexo 5) con el testigo, lo cual puede observarse en la Figura 3.

No se determinó efecto del suelo en el comportamiento de los microorganismos sobre el tizón temprano. A pesar de que los tratamientos 1 (suelo estéril+bocashi estéril) y 3 (suelo

estéril), mostraron respectivamente, niveles crítico y deficiente de magnesio (Cuadro 1), esto no influyó en los resultados del experimento.

El tratamiento 2 (suelo estéril+bocashi no estéril) presentó los mayores niveles de materia orgánica y nitrógeno (Cuadro 1). El tratamiento 1, suelo estéril+bocashi estéril, al parecer debido al proceso de esterilización con calor, perdió parte de materia orgánica y nitrógeno, posiblemente por la volatilización de los compuestos.

4.4 Efecto de los tratamientos sobre Sigatoka negra en plantas de plátano en invernadero.

Los primeros síntomas de la Sigatoka negra aparecieron 10 días después de la inoculación. Sin embargo, paralelamente al crecimiento de *M. fijiensis*, se observó el crecimiento de otro hongo, el cual presentó lesiones oscuras que se desarrollaron más rápidamente que las del patógeno objeto del estudio.

Debido a que los objetivos del experimento fueron determinar el antagonismo de los microorganismos a *M. fijiensis*, a través de la evolución de los síntomas tomando en cuenta los parámetros: periodo de incubación, periodo de evolución y periodo de desarrollo de la enfermedad, y dado que el hongo contaminante impidió la observación de éstos, se procedió a una segunda inoculación del patógeno en las

plantas 19 días después de la primera. Nuevamente los primeros síntomas de la Sigatoka negra fueron observados aproximadamente a los 10 días después de la inoculación. Sin embargo los síntomas del contaminante aparecieron simultáneamente a los de *M. fijiensis*, debido a lo cual, las hojas afectadas fueron eliminadas.

Dado el nuevo brote del contaminante, las plantas fueron podadas y sometidas a estres hídrico. Las plantas fueron inoculadas nuevamente con *M. fijiensis*, a una concentración de 104 conidios por ml.

De acuerdo a la prueba de Dunnett, no se encontró diferencias estadísticamente significativas para el periodo de incubación.

5. DISCUSION GENERAL

5.1 Procedimiento de desinfección para aislar microorganismos endofíticos

La desinfección con hipoclorito de sodio durante 2 minutos permitió el crecimiento de microorganismos, se logró determinar mediante el uso de los indicadores *Pseudomonas* sp, *Aspergillus* sp y *Serratia* sp, que en parte eran organismos epifíticos.

En esta prueba con tres indicadores, se pudo establecer que *Serratia* sp tiene mejor adherencia y protección en el filoplano que *Aspergillus* sp o *Pseudomonas* sp, y solo fué eliminado en el tratamiento de discos de hojas con hipoclorito de sodio al 1% durante 5 min, por lo tanto este tiempo de desinfección fué considerado el más adecuado para la obtención de endofíticos en tomate. No se descarta la posibilidad de que otros organismos de mejor adherencia que *Serratia* sp, puedan presentarse con esta desinfección bajo otras condiciones de lugar y hospedante; sin embargo podría usarse como un indicador confiable.

Misaghi y Dondelinger en 1990, utilizaron para aislar microorganismos endofíticos de diferentes partes de plantas de algodón, varios desinfectantes, entre los que incluyeron al hipoclorito de sodio. Estos investigadores usaron tallos jóvenes, tallos viejos e interior de flores no cubiertas. Los distintos materiales estuvieron expuestos a la desinfección por periodos largos, en un rango de 15 a 30 minutos. A pesar

de que obtuvieron resultados satisfactorios en el aislamiento de endofíticos, mencionan el hecho de que es difícil que todos los organismos epifíticos o contaminantes de la superficie de la hoja fueran eliminados.

Los tiempos de exposición al desinfectante mayores de 20 min , debido a la naturaleza frágil de las hojas de tomate, produjeron la muerte total del tejido.

El bajo número de microorganismos endofíticos encontrados, coincide con lo reportado por Misaghi y Dondelinger (1990), quienes hallaron solo 6 especies de bacterias en la parte interna de los tejidos de las plantas de algodón.

5.1.1 Selección de microorganismos antagónicos a *A. solani* en laboratorio.

El hecho de que la mayor cantidad de microorganismos, (87.5%), fueran encontrados en la superficie de las hojas, podría deberse a la mayor facilidad de colonización o establecimiento de estos microorganismos. Según Kostka *et al* (1988), los endofíticos posiblemente involucren una íntima relación con su planta hospedera a través de un proceso de coevolución, lo cual indicaría mayor dificultad y tiempo por parte de los organismos para establecerse de esta manera. Lo anterior no sucede en el establecimiento de organismos epifíticos los que pueden ser trasladados fácilmente hacia la superficie de las hojas por el viento, lluvia o animales, y

permanecen allí siempre que las condiciones del medio lo permitan.

En el presente estudio se aislaron hongos y bacterias representando estas últimas el mayor número de microorganismos endofíticos. De los hongos aislados, *Cladosporium* sp y *Curvularia* sp, fueron también encontrados por Spurr y Welty (1974) en las partes internas de hojas de *Nicotiana* spp.

La presencia dominante de bacterias en el interior de los tejidos de plantas, se pueda deber a la facilidad de las mismas de transportarse a través de los vasos conductores, y a su rapidez de multiplicación y adaptación.

Los tratamientos que presentaron mejor control de la enfermedad (mayor al 50%), fueron: la bacteria crema-2; *Fusarium* sp (52H); la bacteria crema-4 y el *Bacillus* A28 (cuadro 7). De éstas, las bacterias cremas eran endófitas y el resto epifitas.

Hasta el momento no ha sido reportado el antagonismo del hongo *Fusarium* sp (52H) hacia *A. solani*, Sánchez (1994) encontró antagonismo de este hacia *Phytophthora infestans*. Sin embargo, en las pruebas *in vivo* de antagonismo a *A. solani* en hoja desprendida, el hongo presentó mayor control de la enfermedad que el *Bacillus* A28 el cual fué reportado por Okumoto (1992) como antagonista a dicho patógeno en pruebas *in vitro*. El efecto antagónico del *Bacillus* A28 se da

a través de la producción de antibióticos y quitinasa, la última le confiere la capacidad de degradar la pared celular del hongo (Okumoto 1992). La forma en que ejerce el antagonismo el *Fusarium* sp aún no ha sido estudiada. Una posible explicación al mejor control de la enfermedad por este hongo, podría ser la presencia de otros metabolitos que impidan el desarrollo de los tubos germinativos y la penetración del patógeno al tejido vegetal.

5.2 Efecto de los tratamientos sobre el tizón temprano en plantas de tomate en invernadero.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la primera inoculación de *A. solani*, las plantas de tomate tratadas con extracto de Bocashi fermentado (BM) presentaron menor número de lesiones que las inoculadas con los demás tratamientos (Figura 1). Este comportamiento fue el mismo para las dos evaluaciones efectuadas a los 3 y 6 días después de la inoculación. Los tratamientos no mostraron diferencias en el tamaño ni en el índice de enfermedad.

El posible efecto de este tratamiento sobre patógenos no ha sido reportado hasta la fecha. Sin embargo, con base en las observaciones efectuadas, considero que este podría ejercer un fuerte estrés sobre las plantas, posiblemente por obstrucción parcial de los haces vasculares, debido a la consistencia viscosa de la melaza, uno de los componentes de

este tratamiento, ya que concentraciones mayores causaron la marchitez de las plantas.

Por otro lado, la reducción de la altura de planta observada en este tratamiento, se puede considerar como un síntoma del retardo en el desarrollo fisiológico de la planta, de tal manera que aunque todas tenían la misma edad, las tratadas con el extracto de Bocashi fermentado presentaron menor desarrollo. Lo anterior se analiza en el sentido de lo reportado por Bedi y Dhiman (1980), los cuales mencionan que plantas jóvenes de tomate presentan un alto grado de resistencia al tizón temprano, disminuyendo la misma con la madurez de la planta.

Algunos tipos de compost han mostrado efecto supresivo sobre enfermedades de plantas, pues muchos de ellos contienen microorganismos antagonistas a algunos patógenos (Harwiger and Loschke 1991). En el presente experimento no se observó efecto del suelo sobre el tizón temprano. Pero si, se encontró un efecto significativo en la interacción tratamiento y suelo en las dos inoculaciones efectuadas. Los microorganismos bacteria crema-2, y *Trichoderma harzianum* y el extracto de bocashi fermentado disminuyeron el tamaño de lesión de acuerdo al sustrato, resultando con el menor tamaño de las mismas el suelo estéril. *Serratia entomophyla*, y la bacteria crema-4 tuvieron un comportamiento diferente pues presentaron el mayor tamaño de lesiones en este suelo.

En la segunda inoculación, el número de lesiones disminuyó, con los microorganismos bacteria crema-2, *Fusarium* sp (52H) y *Trichoderma harzianum* en el suelo estéril. El número de lesiones aumentó con la bacteria crema-4 y el *Bacillus* A28.

Los microorganismos se comportaron de la misma manera en la variable índice de enfermedad.

Las diferentes relaciones de interacción encontradas podrían deberse a algún tipo de simbiosis entre algunos de los microorganismos aplicados a las plantas y los microorganismo del sustrato. Harwiger y Loschke (1991) observaron que microorganismos del compost pueden actuar en simbiosis con los aplicados directamente a la planta. Los autores mencionan una mejoría del antagonista, sin embargo, se conoce que también puede existir una competencia entre estos microorganismos, lo cual podría provocar una reducción en el efecto del antagonista.

Los tratamientos que presentaron menor número y tamaño de lesiones en la segunda inoculación fueron el A28 y TRIH (Figura 2). Los resultados de antagonismo endofítico del *Bacillus* A28 coinciden con los encontrados por Okumoto (1992) quien reportó este microorganismo como uno de los mejores antagonistas a *A. solani* a nivel de la filosfera con una inhibición de la longitud del tubo germinativo del 91.8%.

En estas pruebas, el hongo *Fusarium* sp (52H), el cual había inhibido más eficientemente al patógeno, que el *Bacillus* A28, en los estudios con folíolos desprendidos, no presentó ningún tipo de control hacia la enfermedad. Estos resultados indicaron que el hongo no se estableció endofíticamente en las plantas de tomate, por lo que su efecto no se presentó..

El hongo *T. harzianum* (TRIH) mostró, al igual que el *Bacillus* A28, una reducción significativa del número de lesiones. Este microorganismo ha sido reportado como un exitoso inhibidor del crecimiento y desarrollo de algunos patógenos (Elad *et al* 1971). Benhamou y Chet (1993) encontraron antagonismo de *T. harzianum* hacia el patógeno *Rhizoctonia solani*. Andreu *et al* (1992), en estudios *in vitro* concluyeron que *Trichoderma* spp inhibió el crecimiento micelial de *A. solani*. Al parecer, la acción antagonista se da con algunas especies de *Trichoderma* mediante la producción de antibióticos (Denis and Webster 1971).

Al realizarse la segunda evaluación, 6 días después de la inoculación con el patógeno, solamente *T. harzianum* conservó su antagonismo hacia *A. solani*, pues mantuvo la reducción en el número de lesiones y el índice de enfermedad.

La aplicación de este hongo, sin embargo, disminuyó significativamente el crecimiento de las plantas tratadas con el mismo. En ensayos con plántulas de manzana, Smith *et al*

(1990), encontraron que *T. harzianum* estimuló el crecimiento de éstas. Los autores desecharon la posibilidad de que este incremento fuera debido a la eliminación de patógenos menores de la rizosfera por el hongo, ya que usaron sustrato estéril. La otra posible causa de este fenómeno fué sugerida por Windham *et al* (1986), quienes encontraron que *Trichoderma* spp produce reguladores de crecimiento que incrementan la tasa de germinación y peso seco de brotes y tallos de tomate. La reducción de la altura de planta en este experimento pudo deberse a la forma de aplicación del tratamiento, la cual se realizó a través del corte del hipocótilo. El efecto de la temperatura sobre la eficacia de aislamientos de este hongo, es considerada también por Roiger y Jeffers (1991).

El tratamiento *Bacillus* cepa A28 no se expresó significativamente como antagonista en esta evaluación. El efecto no consistente del *Bacillus* podría deberse, a que su influencia disminuye al establecerse el patógeno, en los tejidos de la planta; o el tratamiento puede inducir resistencia en la planta, siendo esta misma disminuída a través del tiempo. Ogawa y Komada (1986) reportaron que la resistencia lograda en plantas de camote hacia la marchitez por *Fusarium*, a través de protección cruzada con *Fusarium oxysporum* no patogénico, se perdió al hacer una excisión en el explante, inmediatamente después de aplicado éste.

Se observó, hasta los 35 días de tratadas las plantas con los diferentes microorganismos, una correlación positiva

entre la altura de la planta y el número y tamaño de lesiones. Este comportamiento no fué el mismo en las dos últimas evaluaciones (46 y 52 DDA). Lo anterior podría deberse, a que las poblaciones de microorganismos que lograron establecerse en las plantas o su efecto, lo hicieran por un corto periodo. Después del cual disminuyeron por diversas causas.

Se debe considerar, además que el uso del fungicida sistémico benomyl, para el control de *Cladosporium*, pudo haber influido este fenómeno. Spurr y Welty (1972) lograron reducir la incidencia de *Cladosporium* sp al utilizar este fungicida. Dichos investigadores no encontraron efecto del benomyl sobre el resto de la microflora. Sin embargo Frahm (1973) reportó que el uso del benomyl incrementó la ocurrencia de patógenos relativamente insensibles. Este resultado lo considera debido a la reducción de la flora fungosa saprofítica, la cual generalmente juega un papel antagonista a patógenos.

5.3 Efecto de los tratamientos sobre *M. fijiensis* en plantas de plátano en invernadero.

Las plantas utilizadas en el experimento fueron homogéneas en cuanto a edad y altura, por ser éstas producidas a través de cultivo de tejidos. Sin embargo al momento de la evaluación de síntomas se observó diferencia en la altura de las mismas. Lo anterior no presentó correlación

alguna con los tratamientos, por lo que se podría atribuir al tamaño de los explantes en el proceso de multiplicación *in vitro*. El material utilizado no presentaba hojas verdaderas, ya que fueron utilizadas plantas con apenas 30 días en período de aclimatación. Las primeras hojas producidas por estas plantas *in vitro* son poco funcionales y sobre éstas se realizó la primera inoculación. Otros investigadores (Tapia 1993) han utilizado plantas con 5 o 6 hojas verdaderas para la inoculación artificial de *M. fijiensis*, lo que representa 90 días en período de aclimatación.

La inoculación de antagonistas via endofítica, no ha sido reportada hasta la fecha en Musáceas u otras monocotiledóneas. Al evaluar el período de incubación de la enfermedad no se encontró diferencia estadística entre los tratamientos.

Los resultados del experimento fueron influidos por un hongo contaminante, común en explantes pequeños pero no en plantas de 5 o 6 hojas verdaderas. Este hongo, además, impidió la evaluación de los periodos de desarrollo y de evolución de la enfermedad, importantes para determinar el antagonismo de los microorganismos estudiados a *M. fijiensis*. Por tal motivo, no se pudo estudiar el efecto de los tratamientos en el control de la Sigatoka negra, dado que el tiempo asignado para la conclusión del experimento, no permitió evaluar las plantas en el estado de seis hojas verdaderas.

6. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en esta investigación, se presentan las siguientes conclusiones:

1. La desinfección con hipoclorito de sodio al 1% por 5 min es la más adecuada para el aislamiento de microorganismos endofíticos.
2. El número de microorganismos aislados de la filosfera fué mayor que el de los tejidos, a su vez las bacterias fueron tres veces más abundantes que los hongos.
3. En el experimento de antagonismo en hoja desprendida, los microorganismos antagónicos produjeron una inhibición de *A. solani* que varió entre el 20 y 72%.
4. El hongo *Trichoderma harzianum* disminuyó significativamente la severidad del tizón temprano y el tamaño de plantas de tomate de invernadero, al aplicarse endofíticamente.
5. Los suelos utilizados no influyeron en el efecto antagónico de los microorganismos.
6. El periodo de incubación de *M. fijiensis* no fué afectado por los microorganismos

7. RECOMENDACIONES

Diferentes cepas de *Trichoderma harzianum*, *Bacillus* A28 y otros microorganismos como *Gliocladium* spp deberían ser probados como posibles antagonistas vía endofítica.

En el caso de aplicaciones vía endofítica en plátano, se recomienda hacer las pruebas de patogenicidad cuando las plantas *in vitro* tengan 90 días de etapa de aclimatación.

Para la desinfección de microorganismos de plátano se recomienda probar la desinfección del filoplano con hipoclorito de sodio al 1% en exposiciones de 2, 5 y 10 min.

8. BIBLIOGRAFIA

- ADEVITAN, S.A; IKOTUN, T; DASHIELL, K; SINGH, S. 1988. Use of three inoculation methods in screening cowpea genotypes for resistance to two *Colletotrichum* species. Plant Disease. 76: 1025-1028.
- ANDREU, C.M; CUPULL, R; MAYEA, S; REINOSO, M. 1992. Relaciones antagónicas sobre el crecimiento micelial de *Alternaria solani* Sorauer, por *Trichoderma* spp y *Verticillium* spp. Comunicaciones breves . Facultad de Ciencias Agropecuarias, UCLV. La Habana, Cuba. pp 114-116.
- ANDREWS, J. 1992. Biological control in the phyllosphere. Annual Review of Phytopathology. 30:603-635.
- BAKER, R. 1981. Ecology of the fungus, *Fusarium*: Competition. In P.E. Nelson, T.A. Toussoun and R.J. Cook (Eds), *Fusarium: Diseases, biology and taxonomy*. Penn. State Univ. Press, University Park. pp 245-249.
- BAKER, R. 1987. Involving concepts of biological control of plant pathogens. Annual Review of Phytopathology. 25:67-85.
- BAKER, K.; COOK, R. 1982. Biological control of plant pathogens. Minnesota, APS. 433 p.
- BAKER, K.F; COOK, R.J. 1974. Biological control of plant pathogens. W.H. Freeman & Co; San Francisco.
- BASHI, E; FOKKEMA, N.J. 1977. Environmental factors limiting growth of *Sporobolomyces roseus*, an antagonist of *Cochliobolus sativus*, on wheat leaves. Trans. Br. Mycol. Soc. 68: 17-25.
- BEDI, P.S; DHIMAN, J. S. 1980. Ontagenic predisposition of tomato foliage to early blight caused by *Alternaria solani*. Indian Phytopathology 33(1): 83-86.
- BENHAMOU, N; CHET, I. 1993. Hyphal interactions between *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*: Ultrastructure and gold cytochemistry of mycoparasitic process. Phytopathology 83: 1062-1071.

- BLAKEMAN, J.; FOKKEMA, N. 1984. Potential for biological control of plant disease on the phylloplane. Annual Review of Phytopathology 20:169-192.
- BLAKEMAN, J.P; FOKKEMA, N.J. 1982. Potential for biological control of plant disease on the phylloplane. Annual Review of Phytopathology 20: 167-192.
- BRUEHL, G.W; MILLAR, R.L; CUNFER, B. 1969. Significance of antibiotic production by *Cephalosporium gramineum* to its saprophytic survival. Can. J. Plant Sci. 49: 235-246.
- BUSSEY, M.J; STEVENSON, W.R. 1991. A leaf disk assay for detecting resistance to early blight caused by *Alternaria solani* in juvenile potato plants. Plant Dis. 75: 385-390.
- CATIE. 1990. Guia para el manejo integrado de plagas en tomate. Turrialba, C.R. 138 p.
- CATIE. 1986. Inventario de plagas y enfermedades de Costa Rica. CATIE (C.R). Serie técnica. Informe técnico no. 80 25 p
- CLARK, F.E. 1963. The concept of competition in microbial ecology, pp. 339-345. In: K.F. Baker and W.C. Snyder (Eds), Ecology of soil-borne plant pathogens. Univ. Calif. Press, Berkeley.
- CLAY, K. 1991. Endophytes as antagonist of plant pests. Microbial Ecology of Leaves. New York: Springer-Verlag. p 331-57.
- COOK, R.J; BAKER, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. The American Phytopathological Society. St Paul, Minnessota. 539p.
- COOKSEY, D.A; MOORE, L.W. 1982. High frequency spontaneous mutations to agrocin 84 resistance in *Agrobacterium tumefaciens* and *A. rhizogenes*. Physiol. Plant Pathol. 20: 129-135.

- DENNIS, C; WEBSTER, J. 1971. Antagonistic properties of species-groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. Trans. Br. Mycol. Ecol. 7:29-38.
- DHINGRA, O.D; SINCLAIR, J.B. 1985. Basic plant pathology methods. Boca Ratón, FL. CRC press. 355 p.
- ELAD, Y; CHET; BAKER, R. 1987. Increased growth response of plant induced by rhizobacteria antagonistic to soilborne pathogenic fungi. Plant soil 98, 325-30.
- FOKKEMA, N.J; SCHIPPERS, B. 1986. Phyllosphere versus rhizosphere as environments for saprophytic colonization. See Ref. 75 pp 137-59.
- FOKKEMA, N.J; LORBEER, J.W. 1974. Interactions between *Alternaria porri* and the saprophytic mycoflora of onion leaves. Phytopathology 64: 1128-33.
- FRAHN, J. 1973. Verhalten und Nebenwirkungen von benomyl (sammelbericht). Seitschrift fur pflanzenkrankheiten und pflanzenschutz 80, 431-446.
- FRAVEL, D.R; SPURR, H.W. Jr. 1977. Biocontrol of tobacco brown-spot disease by *Bacillus cereus* subsp mycoides in controlled enviroment. Phytopathology 67: 930-932.
- FRENCH, E.R; HEBERT, T.T. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. Ed. Instituto Interamericano de cooperación para la agricultura (IICA). San José, Costa Rica. 289 p.
- FROMMEL, M.I; NOWAK, J; LAZAROVITS, G. 1991. Growth enhancement and development modifications of *in vitro* grown potatoes (*Solanum tuberosum* ssp *tuberosum*) as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. Plant Physiol. 96: 928-936.
- FRY, W. 1988. Principles of plant disease management. Academic Press, Orlando. p. 175-288.

- FOURE, E. 1982. Les cercosporioses du bananier et leurs traitements. Comportement des variétés. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et plantains a *Mycosphaerella fijiensis*, Morolet, au Gabon (maladie des raies noires) I. Incubation et évolution de la maladie. *Fruits* 37 (12): 749-759.
- GAUHL, F. 1992. Epidemiología y ecología de la Sigatoka negra. UPEB, Panamá. 114 p.
- GONZALEZ, R. 1995. Efecto de microorganismos quitinolíticos en el desarrollo de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE.
- HAGEDORN, C; GOULD, W.D; BARDINELLI, T.R. 1993. Field evaluation of bacterial inoculants to control seedling disease pathogens on cotton. *Plant Disease* 77: 278-282.
- HAMILTON, R.I. 1980. Defenses triggered by previous invaders: viruses. *Plant Disease*. vol 5. p 279-303.
- HARWIGER, L.A; LOSCHKE, D.C. 1981. Molecular communication in host-parasite interactions: Hexosamine polymers (chitosan) as regulatory compounds in race-specific and other interactions. *Phytopathology* 71: 756-762.
- HENIS, Y; GNAFFAR, A; BAKER, R. 1979. Factors affecting suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology* 69: 1164-1169.
- HOITINK, H.A. 1986. Basis for the control of soilborne plant pathogens with composts. *Ann Rev. Phytopathol* 24: 93-114.
- JACOBS, M.J; BUGBEE, W.M; GABRIELSON, D.A. 1985. Enumeration, location, and characterization of endophytic bacteria within sugar beet roots. *Can. J. Bot.* 63: 1262-1265.
- JACOBSEN, B.; BACKMAN, A. 1993. Biological and cultural plant disease controls: Alternatives and supplements to chemicals in IPM systems. *Plant disease* 77(3):311-315.

- JACOBSEN, B. J. 1992. Biological and cultural plant disease controls: Alternatives and supplements to chemicals in IPM systems. *Plant disease* 77: 311-315.
- JIMENEZ, J.; GALINDO, J; RAMIREZ, C. (1985). Estudios sobre combate biológico de *Mycosphaerella fijiensis* var *difformis* mediante bacterias epífitas. In Reunión ACORBAT (7: 1985), San José. Memorias VII reunión. C.R, Turrialba. CATIE. In forme interno CATIE. p. 105-109.
- KIJIMA, T. 1993. Control de enfermedades a través de microorganismos antagónicos. Uso de productos biológicos Ed.Noubunkyou. Tokio, Japan. p 193 (In Japanese). Traducción 103-113 p.
- KOSTKA, S.J; TOMASINO, S.F; TURNER, J.T; REESER, P.W. 1988. Field release of a transformed strain of *Clavibacter syli* subsp *cynodontis* containing a delta-endotoxic gene from *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* (BT) (abstr.) *Phytopathology* 78: 1540.
- LARGE, E.C. 1966. Measuring plant disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 4: 9-28.
- LEBEN, C. 1961. Microorganisms en cucumber seedlings. *Phytopatology* 51: 553-557.
- LEIFERT, C; SIGEE, D.C; STANLEY, R; KNIGHT, C; EPTON, N.A. 1973. Biocontrol of *Botrytis cinerea* and *Alternaria brassicicola* on Dutch white cabbage by bacterial antagonist at cold-store temperatures. *Plant pathology.* 42: 270-279.
- LINDOW, S. E. 1985. Integrated control and role of antibiosis in biological control of fire blight and frost injury. In *Biological control on the Phylloplane*. The American Phytopathological Society, St. Paul, MN. pag 83-85.
- Mc LAUGHLIN, R.J; WILSON, C.L; DROBY, S; BEN-ARIE, R; CHALUTZ, E. 1988. Biological control of postharvest diseases of grape, peach, and apple with the yeasts *Kloeckera apiculata* and *Candida guilliermondii*. *Plant disease* 76: 470-473.

- MISAGHI, I.J; DONDELINGER, C.R. 1990. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology* 80: 808-811.
- NEWHOOK, F. J. 1951. Microbiological control of *Botrytis cinerea*. The role of pH changes and bacterial antagonism. *Annals of applied biology* 39:169-184.
- OIRSA. 1988. Manejo y control de la Sigatoka negra. Ministerio de Desarrollo Agropecuario, Panamá. 12 p.
- OGAWA, K.; KOMADA, H. 1986. Induction of systemic resistance against *Fusarium* wilt of sweet potato by non-pathogenic *Fusarium oxysporum*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 52:15-21.
- OKUMOTO, S. 1992. Efecto de enmiendas sobre bacterias antagónicas a *Alternaria solani* en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Tesis Mag. Sc. Turrialba, C.R., CATIE. 114 p.
- PEREZ, V. 1983. Las manchas de las hojas del banano y los plátanos causadas por *Mycosphaerella musicola* (Sigatoka amarilla), *M. fijiensis* (raya negra) y *M. fijiensis* var *difformis* (Sigatoka negra). Boletín de reseñas (Protección de plantas). (Cuba) No. 11:1-37.
- ROIGER, D. J; JEFFERS, S.N. 1991. Evaluation of *Trichoderma* spp for biological control of *Phytophthora* crown and root rot of apple seedling. *Phytopathology* 81: 910-917.
- ROWE, P. 1985. Mejoramiento de plátanos y bananos. Trad. Vielka Chang-Yan. Panamá, UPEB. 19 p.
- SCHERFF, R. H. 1973. Control of bacterial blight of soybean by *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Phytopathology* 63: 400-402.
- SHILLINGFORD, C.A. 1990. Use of systemic fungicides to control leaf spot disease in *Musa* sp. In Sigatoka leaf spot diseases of bananas: proceeding of international workshop, San José, 1989. Eds. R.A Fullerton; R.H. Stover. Montpellier, INIBAP. p 75-83.

- SLEESMAN, J.P; LEBEN, C. 1976. Microbial antagonists of *Bipolaris maydis*. *Phytopathology*. 66: 1214-1218.
- SMITH, V.L; WILCOX, W.F; HARMAN, G.E. 1990. Potential for biological control of *Phytophthora* root and crown rots of apple by *Trichoderma* and *Gliocladium* spp. *Phytopathology* 80: 880-885.
- SNEH, B; AGAMI, O; BAKER, R. 1985. Biological control of *Fusarium*-wilt in carnation with *Serratia liquefaciens* and *Hafnia alvei* isolated from rhizosphere of carnation. *Phytopathology* 113: 271-276.
- SPURR, H; WELTY, R. 1975. Characterization of endophytic fungi in healthy appearing leaves of *Nicotiana* spp. *Phytopathology* 65: 417-422.
- SPURR, H; WELTY, R. 1974. Characterization of endophytic fungi in healthy leaves of *Nicotiana* spp. *Phytopathology* 65: 417-422.
- SPURR, H; WELTY, R. 1972. Incidence of tobacco leaf microflora in relation to brown spot disease and fungicidal treatment. *Phytopathology* 62: 916-920.
- SPURR, H.W. JR. 1979. Ethanol treatment a valuable technique for foliar biocontrol studies of plant disease. *Phytopathology* 69: 773-76.
- SPURR, H.W. JR; 1977. Protective applications of conidia of nonpathogenic *Alternaria* sp isolates for control of tobacco brown spot disease. *Phytopathology* 67: 128-132.
- SPURR, H. W. JR. 1976. Experiments on foliar disease control using bacterial antagonist. *Annual Review of Phytopatology* 369-381.
- SPURR, H. W.JR. 1973. An efficient laboratory method for producing tobacco brown spot disease. *Tob. Sci.* 17: 145-148.
- STEEL, R.G.D; TORRIE, J.H. 1980. Principles and procedures of statistics. 2nd ed. McGraw-Hill. New York. 633.

- STOVER, R. 1987. Producción de plátanos en presencia de Sigatoka negra. In Plagas y enfermedades de carácter epidémico en cultivos frutales de la región Centroamericana. Ed. J. Pinochet. Panamá, CATIE. p 27-36.
- STOVER. R. 1980. Sigatoka leaf spots of bananas and plantains. Plant disease 64(8):750-57.
- TAPIA, A.C. 1993. Distribución altitudinal de la Sigatoka amarilla (*Mycosphaerella musicola*) y la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en Costa Rica. Tesis Mg Sc. San José C.R. Universidad de Costa Rica. 77 p.
- TOMASHOW, L.S; WELLER, D.M. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*. J. Bacteriol. 170: 3499-3508.
- UPEB. 1979. Epidemiología Y medios de diseminación del hongo *Mycosphaerella fijiensis* var *difformis*, agente causal de la Sigatoka negra. 1979. In Unión de Países Exportador es de Banano. Programa coordinado de investigaciones: Proyectos. Panamá. pp. 64-72.
- VASUDEVA, R.S; CHAKRAVARTHI, B.P. 1954. The antibiotic action of *Bacillus subtilis* in relation to certain parasitiungi, with special reference to *Alternaria solani* (Ell & Mart) Jones & Grout. Ann. Appl. Biol. 41(4): 612-618.
- WELLER, D. M; HOWIE, W. J; COOK, R.J. 1988. Relation ship between in vitro inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var *tritici* and suppression of take-all of wheat by fluorescent pseudomonads. Phytopathology 78: 1094-1100.
- WINDHAM, M. T; ELAD, Y; BAKER, R. 1986. A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. Phytopathology 76: 518-521.

9. ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza para el efecto de tratamientos, suelo y la interacción tratamiento y suelo, sobre el número de lesiones (1A), tamaño de lesiones (1B) e índice de enfermedad (tizón temprano) (1C) en plantas de tomate en invernadero a los tres días de inoculadas. Primera inoculación.

1A

F.V	G.L	S.C	C.M	F.c
Trat	7	2.32305907	0.33186558	2.08 *
Suelo	2	0.25347945	0.12673972	0.79
Trat*suelo	14	2.0586716	0.14399051	0.90

* nivel de significancia al 6%

1B

F.V	G.L	S.C	C.M	Fc
Trat	7	0.04233699	0.00604814	3.01 **
Suelo	2	0.00628824	0.00314412	1.57 n.s
Trat*suelo	14	0.05434164	0.00388155	1.93 *

** nivel de significancia al 1%

* nivel de significancia al 5%

n.s no significativo

1C

F.V	G.L	S.C	C.M	Fc
Trat	7	0.09781565	0.01397366	2.20*
Suelo	2	0.01746558	0.00873279	1.37n.s
Trat*suelo	14	0.11339063	0.00809933	1.27n.s

* nivel de significancia al 1%

n.s no significativo

Anexo 2. Análisis de varianza para el efecto de tratamientos, suelo y la interacción tratamiento y suelo, sobre el número de lesiones (2A), tamaño de lesiones (2B) e índice de enfermedad (tizón temprano) (2C) en plantas de invernadero a los 6 días de inoculadas. Primera inoculación.

2A

F.V	G.L	S.C	C.M	Fc
Trat	7	4.01865974	0.57409425	1.75n.s
Suelo	2	0.66421777	0.33210888	1.01n.s
Trat*suelo	14	3.30832350	0.23630882	0.72n.s

n.s no significativo

2B

F.V	G.L	S.C	C.M	F.c
Trat	7	0.07459546	0.01065649	1.56n.s
Suelo	2	0.00266801	0.00133401	0.20n.s
Trat*suelo	14	0.06862391	0.00490171	0.72n.s

n.s no significativo

2C

F.V	G.L	S.C	C.M	F.c
Trat	7	0.20038171	0.02862596	1.45n.s
Suelo	2	0.03896488	0.01948244	0.99n.s
Trat*suelo	14	0.17928852	0.01280632	0.65n.s

n.s no significativo

Anexo 3. Análisis de varianza para el efecto de tratamientos, suelo y la interacción tratamiento y suelo, sobre el número de lesiones (3A), tamaño de lesiones (3B) e índice de enfermedad (3C) (tizón temprano) en plantas de invernadero a los tres días de inoculadas. Segunda inoculación.

3B

F.V	G.L	S.C	C.M	Fc
Trat	7	3.84216750	0.54888107	4.42 **
Suelo	2	0.02761159	0.01380580	0.11 n.s
Trat*suelo	14	4.68125160	0.33437511	2.69 **

** nivel de significancia al 1%

n.s no significativo

3B

F.V	G.L	S.C	C.M	Fc
Trat	7	0.01865051	0.00266436	3.40**
Suelo	2	0.00056948	0.00028474	0.36
Trat*suelo	14	0.01845891	0.00131849	1.68

** significancia al 1%

3C

F.V	G.L	S.C	C.M	Fc
Trat	7	0.10845522	0.01549360	5.34**
Suelo	2	0.00123052	0.00061526	0.21n.s
Trat*suelo	14	0.12381661	0.00884404	3.05**

** significativo al 1%

n.s no significativo

Anexo 4. Análisis de varianza para el efecto de tratamiento, suelo y la interacción suelo y tratamiento sobre las variables número de lesiones (A), tamaño de lesiones (B) e índice de enfermedad (tizón temprano) en plantas de invernadero a los 6 días de inoculadas. Segunda inoculación.

4A

F.V	G.L	S.C	C.M	Fc
Trat	7	6.10486833	0.87212405	2.11n.s
Suelo	2	0.24726086	0.12363043	0.30n.s
Trat*suelo	14	5.29837905	0.37845565	0.91n.s

n.s no significativo

4B

F.V	G.L	S.C	C.M	Fc
Trat	7	0.63412322	0.09058903	2.42*
Suelo	2	0.02239464	0.01119732	0.30n.s
Trat*suelo	14	0.54054265	0.03861019	1.03n.s

* significativo al 5%

n.s no significativo

4C

F.V	G.L	S.C	C.M	Fc
Trat	7	0.14822558	0.02117508	1.89n.s
Suelo	2	0.00568811	0.00284406	0.25n.s
Trat*suelo	14	0.19039788	0.01359985	1.21n.s

n.s no significativo

Anexo 5. Análisis de varianza para el efecto de tratamiento, suelo y la interacción tratamiento y suelo sobre la altura de plantas de tomate de invernadero, a los 35, 46 y 52 días después de aplicadas con los tratamientos (5A, 5B y 5C respectivamente).

5A

F.V	G.L	S.C	C.M	Fc
Trat	7	2630.712462	375.816066	3.52**
Suelo	2	320.187783	160.093891	1.50
Trat*suelo	14	831.909440	59.422103	0.56

* altamente significativo.

5B

F.V	G.L	S.C	C.M	Fc
Trat	7	3592.044444	513.149206	3.01**
Suelo	2	453.631036	226.815518	1.33
Trat*suelo	14	670.404381	47.886027	0.28

** altamente significativo

5C

F.V	G.L	S.C	C.M	Fc
Trat	7	5853.402588	836.200370	3.25**
Suelo	2	450.402751	225.201376	0.88
Trat*suelo	14	1671.375027	119.383930	0.46

** altamente significativo