

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE
INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA

PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y
LA CONSERVACION

**Evaluación en *Phaseolus vulgaris*, del antagonismo por
bacterias e inducción de resistencia de un fosfato, hacia
Isariopsis griseola y *Uromyces phaseoli*.**

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

MAGISTER SCIENTIAE

Por

ANDRES WILFREDO RIVAS FLORES

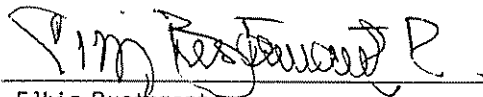
Turrialba, Costa Rica

1996

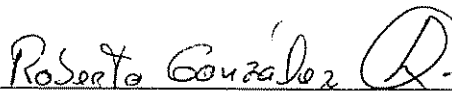
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Jefatura del Area de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

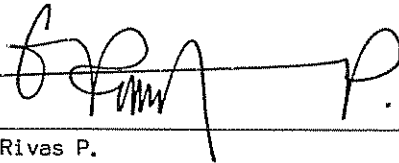
FIRMANTES:



Elkin Bustamante
Profesor Consejero



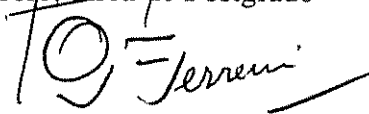
Roberto González
Miembro Comité Asesor



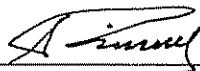
Galileo Rivas P.
Miembro Comité Asesor



Juan A. Aguirre
Jefe, Area de Postgrado



Pedro Ferreira
Director, Programa de Enseñanza



Andrés Wilfredo Rivas Flores
Candidato

DEDICATORIA

A mis padres, María de la Paz Rivas y José Angel Ortíz, por su esfuerzo y amor, en la lucha por mi bienestar y educación.

A mi esposa Areli Díaz de Rivas, por su amor, comprensión y apoyo en todo momento.

A mi hijo, José Alexander, con todo mi amor.

A mis hermanos Douglas, William, Reyna y sus respectivas familias, por sus muestras de cariño y apoyo.

A la memoria de mi abuela Isabel Rivas.

A todos mis tíos, primos y demás familia, por sus muestras de apoyo y confianza.

A mis amigos presentes, por su sinceridad y colaboración en los momentos requeridos y a la memoria de los que no están entre nosotros, por el legado de su eterna amistad.

A mis compañeros y amigos de promoción, por los momentos compartidos.

AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso por haberme iluminado, en la conclusión de mis estudios.

Mi agradecimiento a las siguientes personas, que colaboraron en una u otra forma, para la realización de mi trabajo de tesis:

Al Dr. Elkin Bustamante y M.Sc. Galileo Rivas Platero, por sus sugerencias, amistad y tiempo dedicado al desarrollo de este trabajo.

Al M.Sc. Roberto González Quesada, por su apoyo, sugerencias y amistad brindada durante mi estadía en CATIE y realización del trabajo.

Al Ing.Agr. Arturo Gamboa, Ing.Agr. Herbert González y M.Sc. Nelly Vásquez, por su desinteresada amistad y colaboración en los momentos requeridos.

Al señor Ramón Sánchez, por su valiosa ayuda en el trabajo de campo.

Al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD), por haber financiado mis estudios de maestría en CATIE.

INDICE

DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
INDICE.....	v
INDICE DE CUADROS.....	vii
INDICE DE FIGURAS.....	ix
RESUMEN.....	x
SUMMARY.....	xii
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1 Generalidades del cultivo del frijol (<i>Phaseolus</i> <i>vulgaris</i> L.).....	4
2.2 Importancia de las enfermedades en el frijol.....	5
2.2.1 Mancha angular (<i>Isariopsis griseola</i>) Sacc.....	6
2.2.2 Roya (<i>Uromyces phaseoli</i> (Reben)) Wint.....	9
2.3 Inducción de resistencia como componente del manejo integrado de enfermedades.....	11
2.4 Control de patógenos de la parte aérea de la planta.....	14
2.5 Inducción de resistencia por agentes químicos.....	21
3. MATERIALES Y METODOS.....	25
3.1 Localización.....	25
3.2 Búsqueda y aislamiento de microorganismos.....	25
3.2.1 Recolección y mantenimiento de los hongos <i>I. griseola</i> y <i>U. phaseoli</i>	26

3.3	Prueba de supresión de la germinación, de uredosporas de <i>U. phaseoli</i> , con suspensiones bacterianas.....	27
3.3.1	Prueba de compatibilidad de bacterias con fungicidas.....	29
3.3.2	Prueba de supresión de la germinación, de conidios de <i>I. griseola</i> , con suspensiones bacterianas.....	29
3.4	Prueba de sustratos.....	30
3.5	Experimento de invernadero.....	31
3.6	Experimento de campo.....	33
3.7	Análisis de resultados.....	34
4.	RESULTADOS Y DISCUSION.....	36
4.1	Aislamiento de bacterias, posibles antagonistas a <i>U. phaseoli</i>	36
4.2	Prueba de supresión bacteriana, a la germinación de uredosporas de <i>U. phaseoli</i> , <i>in vitro</i>	37
4.3	Prueba de compatibilidad de bacterias antagónicas con fungicidas.....	41
4.4	Prueba de supresión de la germinación de conidias de <i>I. griseola</i> , <i>in vitro</i> , a las 9h.....	44
4.5	Prueba de sustratos en invernadero.....	48
4.6	Experimento de invernadero.....	49
4.7	Experimento de campo.....	51
5.	CONCLUSIONES.....	64
6.	RECOMENDACIONES.....	66
7.	LITERATURA CITADA.....	67
8.	ANEXOS.....	74

INDICE DE CUADROS

Número	Página
Cuadro 1. Selección de cepas bacterianas, por características macroscópicas, aisladas de hojas de frijol, posibles antagonistas a <i>I. griseola</i> y <i>U. phaseoli</i> . Turrialba, Costa Rica, 1996.....	36
Cuadro 2. Porcentaje de supresión de la germinación de uredosporas de <i>U. phaseoli</i> , por suspensiones bacterianas, con respecto al testigo, a las 9h.....	39
Cuadro 3. Efecto de diferentes concentraciones de fungicidas, sobre el crecimiento promedio de cuatro cepas bacterianas. Turrialba, Costa Rica, 1996.....	42
Cuadro 4. Resultados del porcentaje de control de la germinación, por efecto de diferentes cepas bacterianas, sobre conidios de <i>I. griseola</i> , a las 9h.....	46
Cuadro 5. Resultados de la prueba de Duncan (5%), para el número promedio de pústulas/planta, para el experimento con <i>U. phaseoli</i>	49
Cuadro 6. Resultados de la prueba de Duncan (5%), para el número promedio de lesiones/planta, para el experimento con <i>I. griseola</i>	50
Cuadro 7. Areas bajo la curva de progreso de la enfermedad, correspondientes al experimento de campo, con la roya del frijol (<i>U. phaseoli</i>).....	58

Número	Página
Cuadro 8. Areas bajo la curva de progreso de la enfermedad, correspondientes al experimento de campo, con la mancha angular del frijol (<i>I. griseola</i>).....	59
Cuadro 9. Rendimiento promedio, en g por parcela de frijol, afectado por roya, utilizando 6 tratamientos como control.....	60
Cuadro 10. Rendimiento promedio, en g por parcela de frijol, afectado por la mancha angular, utilizando 6 tratamientos como control.....	60

INDICE DE FIGURAS

Número	Página
Figura 1. Efecto <i>in vitro</i> , de diferentes tratamientos, en el control biológico de la germinación de uredosporas de <i>U. phaseoli</i> , con respecto al testigo, a las 9h.....	40
Figura 2. Efecto <i>in vitro</i> , de diferentes tratamientos, en el control biológico de la germinación de conidios de <i>I. griseola</i> , con respecto al testigo, a las 9h.....	47
Figura 3. Curvas de progreso de la roya del frijol (<i>U. phaseoli</i>), con 6 tratamientos utilizados como control, en condiciones de campo...55	55
Figura 4. Curvas de progreso de la mancha angular del frijol (<i>I. griseola</i>), con 6 tratamientos utilizados como control, en condiciones de campo.....	56
Figura 5. Comparación entre el porcentaje de severidad, vs. rendimiento, de parcelas de frijol afectadas por roya, con 6 tratamientos, utilizados como control.....	62
Figura 6. Comparación entre el porcentaje de severidad, vs. rendimiento, de parcelas de frijol afectadas por mancha angular, con 6 tratamientos, utilizados como control.....	63

Rivas Flores, A.W. 1996. Evaluación en *Phaseolus vulgaris*, del antagonismo por bacterias e inducción de resistencia de un fosfato, hacia *Isariopsis griseola* y *Uromyces phaseoli*.

Palabras claves: frijol, *Isariopsis griseola*, *Uromyces phaseoli*, antagonismo, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas cepacia*, *Serratia marcescens*, inducción de resistencia, fosfato, control biológico.

RESUMEN

La roya (*Uromyces phaseoli*) y la mancha angular (*Isariopsis griseola*), son serias limitantes para la producción del frijol en las regiones tropicales, en donde las condiciones ambientales en muchas zonas, favorecen un continuo desarrollo de las enfermedades, ocasionando pérdidas del rendimiento entre un 50 y 80%, respectivamente.

El objetivo del presente trabajo, fué reducir los daños causados por *I. griseola* y *U. phaseoli*, mediante la utilización de agentes antagonistas y un inductor de resistencia. El ensayo se realizó en el laboratorio de Fitopatología, invernadero y lotes experimentales de la finca "La Montaña", ubicados en la sede del CATIE, en Turrialba, Costa Rica.

De la búsqueda y aislamiento de posibles microorganismos antagonistas, se escogieron diez cepas bacterianas, provenientes del follaje de plantas de frijol y tres cepas de la colección MIP-CATIE, siendo estas *Bacillus cereus* A-30, *Pseudomonas cepacia* y *Serratia marcescens* R1.

La prueba de antagonismo hacia los patógenos mostró, que las cepas bacterianas aisladas y las de la colección MIP-CATIE, son eficientes para el control *in vitro*, de la germinación de uredosporas de *U. phaseoli*. Para el control de la germinación de conidios de *I. griseola in vitro*, se evaluaron solamente las cepas MIP-CATIE, obteniéndose los mejores resultados con *P. cepacia*, la cual superó al fungicida benomil.

La compatibilidad de las cepas bacterianas MIP-CATIE, con los fungicidas oxicarboxin, benomil y mancozeb, así como sus antecedentes en biocontrol influyó en su selección para las pruebas de invernadero y campo.

Para evaluar la persistencia de las poblaciones de bacterias, aplicadas al follaje en la etapa de invernadero, se probaron los sustratos agua, leche y melaza, efectuándose conteos de colonias recuperadas sobre agar nutriente, a las 24, 48 y 168h, los cuales no mostraron diferencias entre ellos, determinándose aplicar las bacterias en agua.

En el experimento de invernadero, a las plantas de frijol se les aplicaron los diferentes tratamientos, a los 15 días de la germinación y a los 7 días después los patógenos *U. phaseoli* e *I. griseola*. Los resultados obtenidos demuestran que los tratamientos con *B. cereus* A-30, *P. cepacia*, fosfato, *Bt* (Javelín) y oxicarboxin, fueron estadísticamente similares, en el control de la roya. Con respecto al control de la mancha angular, los mejores tratamientos resultaron ser el fosfato y el fungicida benomil.

En el experimento de campo, los tratamientos se aplicaron a los 15 días de la germinación y la inoculación de patógenos 7 días después. Una segunda aplicación de tratamientos, excepto el fosfato, se realizó a los 36 días de la germinación. Para el control de la roya todos los tratamientos fueron estadísticamente similares al fungicida oxicarboxin, lo mismo que sus respectivas áreas bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) y sus rendimientos. En el control de la mancha angular, los mejores tratamientos resultaron ser el fungicida benomil, seguido del *Bacillus thuringiensis* (Javelín), los cuales mantuvieron las menores ABCPE, lográndose con el fungicida, un rendimiento más alto que el promedio.

Rivas Flores, A.W. 1996. Evaluation in *Phaseolus vulgaris* of antagonism caused by bacteria and by the induction of resistance by one phosphate against *Isariopsis griseola* and *Uromyces phaseoli*.

Key words: beans, *Isariopsis griseola*, *Uromyces phaseoli*, antagonism, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas cepacia*, *Serratia marcescens*, induction of resistance, phosphate, biological control.

SUMMARY

Rust disease (*Uromyces phaseoli*) and angular leaf spot (*Isariopsis griseola*), constitute serious limitants to beans production in tropical areas, where the environmental conditions prevailing in some regions, favour a continuous development of diseases which cause yielding losses ranging between 50 to 80 percent, respectively.

The purpose of this work was to reduce the damages produced by *I. griseola* and *U. phaseoli*, employing antagonist agents and a resistance inductor. This experiment was carried out at the Phytopathology Laboratory, greenhouse and experimental plots of "La Montaña" farm, located at CATIE, Turrialba, Costa Rica.

After searching for possible antagonist microorganism, ten bacterial strains belonging to bean plants' foliage and three strains from MIP-CATIE's collection (*Bacillus cereus* A-30, *Pseudomonas cepacia* and *Serratia marcescens* R1) were selected.

The pathogens' antagonism test showed that both the isolated bacterial strains and those from MIP-CATIE's collection were enough to control *in vitro* *U. phaseoli*'s uredospores germination. For the *in vitro* control of *I. griseola* conidia germination, only MIP-CATIE's strains were evaluated obtaining the best results with *P. cepacia* which surpassed the benomyl fungicide.

MIP-CATIE's bacteria strains compatibility with oxycarboxin, benomyl and mancozeb fungicides and their biocontrol history, favoured their selection for greenhouse and field evaluations.

In order to evaluate the persistence of bacteria populations applied to the foliage during the greenhouse stage, water, milk and molasses substrata were tested, counting recovered colonies on nutrient agar after 24, 48 and 168 hours. Since the countings showed no differences, it was determined to use water.

For the greenhouse experiment, bean plants were exposed to the different treatments 15 days after germination and seven days later, they were inoculated with *U. phaseoli* and *I. griseola* pathogens. The results obtained demonstrate that *B. cereus* A-30, *P. cepacia*, phosphate, *Bt* (Javelin) and oxycarboxin treatments were statistically similar to control rust. Regarding the angular leaf spot control, the best treatments were phosphate and benomyl.

For the field experiment, treatments were applied 15 days after germination and the pathogens' inoculation occurred 7 days after. A second treatments application without phosphate was carried out 36 days after germination. It was found that all treatments were statistically similar to the oxycarboxin fungicide in order to control rust as well as their respective areas under the disease progress curve (AUDPC) and their yields. It was found that the best treatments to control the angular leaf spot disease were the benomyl fungicide and the *Bacillus thuringiensis* (Javelin), which maintained the lowest AUDPCs. The fungicide also allowed to attain a yielding higher than the average.

1. INTRODUCCION

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es entre las leguminosas de grano alimenticias, la especie más importante para el consumo humano (Voyses, 1983). Esta leguminosa proporciona a la población de los países en desarrollo el 16% de la proteína total consumida, ocupando un lugar predominante en América Latina, África y el lejano Oriente. La producción de frijol seco en América Latina generalmente la realizan pequeños productores y en su mayor proporción en asocio con otros cultivos, principalmente el maíz. El menor precio por unidad de proteínas, con relación a la proteína animal, lo convierte en un alimento favorable para incrementar su consumo (Infante et al., 1974).

En Centroamérica el consumo de frijol varía mucho cada año, dependiendo de la producción, las importaciones, las exportaciones, donaciones, precios y existencias. Además de los problemas ocasionados por la política de precios y comercialización, existen otra serie de problemas relacionados con los sistemas de producción. Estos se suman a las pérdidas en el campo y durante el almacenamiento (Tapia y Camacho, 1988).

El trópico de América Latina es, la zona de mayor producción y consumo. Se estima que el 30% de la producción total mundial proviene de esta área (Voyses, 1983). Comparada con

otras regiones del mundo, el rendimiento promedio que es de 600 kg/ha, se considera bajo (Sanders y Alvarez, 1978). Algunas causas que explican la baja productividad del frijol en la zona tropical son las siguientes: 1) las condiciones de temperatura y humedad, y las características de los suelos de la región tropical, 2) el efecto causado por plagas y 3) la falta de tecnología avanzada y la carencia de medios para difundir la existente y explotar el cultivo en forma eficiente.

De las causas anteriores, las enfermedades constituyen el factor limitante de mayor importancia para la producción del frijol en las regiones tropicales (Camacho, 1973). La incidencia y daño ocasionado por patógenos varía significativamente entre estaciones y año. Varios patógenos se encuentran restringidos a ciertas regiones cultivadoras cuyos factores ambientales específicos son apropiados para su supervivencia y multiplicación; otros están difundidos en toda América Latina y en diversas regiones del mundo.

Como no es probable incorporar de inmediato resistencia a todos los patógenos principales para sistemas específicos de producción, la búsqueda de alternativas viables de control resultan de mucho interés (CIAT, 1980).

Las zonas bajas del trópico, se caracterizan por climas húmedos y temperaturas altas en determinadas épocas del año; estas condiciones son propicias para dos enfermedades

fungosas : la roya (*Uromyces phaseoli*) y mancha angular (*Isariopsis griseola*). Ambas son serias limitantes de producción en Centroamérica, que reducen los rendimientos en un 50% y 80% respectivamente (Tapia y Camacho, 1988).

En vista de la problemática en la producción del frijol y que los plaguicidas en algunos casos no se encuentran disponibles para el control económico de enfermedades, se hace necesaria la búsqueda de técnicas alternativas económicamente viables.

Estas deberán ejercer menor impacto ambiental y a la vez, ser incorporadas a los programas de manejo integrado de plagas existentes en diversos sistemas de producción, para la búsqueda de resistencia a través del tratamiento de plantas, con diversos microorganismos y agentes químicos. Esta situación ha sido demostrada anteriormente en 25 cultivos de diversas familias, contra un amplio número de patógenos foliares y radicales (Tuzun y Kuc, 1991).

El objetivo del trabajo fue reducir los daños causados por *Isariopsis griseola* y *Uromyces phaseoli*, mediante la utilización de agentes antagonistas e inductores de resistencia.

La hipótesis se fundamentó, en que los microorganismos y agentes químicos no tienen efecto inductor de resistencia o antagonista hacia *I. griseola* y *U. phaseoli*, en plantas de frijol.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 Generalidades del cultivo del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.).

El frijol común, es una planta anual, herbácea. Es uno de los cultivos mas antiguos. México es probablemente su centro de origen. Investigaciones arqueológicas han permitido ubicar restos en diversos sitios de Estados Unidos, México y Perú, lo que indica que era conocido desde hace unos 7000 años (Voysest, 1983; Tapia y Camacho, 1988).

El frijol se cultiva extensamente en diferentes partes del mundo. Como especie termófila no soporta heladas y así su cultivo se extiende desde el trópico hasta las zonas templadas (Tapia y Camacho, 1988).

El frijol es considerado el prototipo del género *Phaseolus* y su nombre científico es *Phaseolus vulgaris* L., asignado por Linneo en 1753. Pertenece a la tribu *Phaseoleae* de la subfamilia *Papilionoideae*, dentro del orden *Rosales* (Tapia y Camacho, 1988).

Dentro de los factores ambientales necesarios al cultivo, se encuentra que requiere de temperaturas entre los 18 a 24 C, precipitaciones de 300 a 2600 mm bien distribuidas y suelos

con buena aireación y drenaje, con un pH óptimo de 6.5 a 7.5 (Alfaro, 1983).

2.2 Importancia de las enfermedades en el frijol.

Muchos patógenos infectan la planta de frijol, tanto en el trópico como en las zonas templadas del mundo, debido a la poca distancia de siembra, a lo continuo del cultivo y a las diversas condiciones ambientales favorables para el desarrollo de la infección y para la supervivencia del patógeno. La importancia de un patógeno, está determinada por las pérdidas económicas que produce. La magnitud de estas pérdidas depende de su frecuencia, así como de la severidad del daño ocasionado durante cada ciclo de cultivo (CIAT, 1980).

En América Latina se utilizan muchos sistemas de control de enfermedades del frijol, que incluyen prácticas culturales, rotación de cultivos, medidas sanitarias, producción de semilla limpia y control químico; esta última se debe considerar como una solución a corto plazo para los agricultores, mientras se incorpora resistencia a las variedades comerciales, como un componente del control integrado (CIAT, 1980).

Cuando existen muchas razas de un patógeno, es mayor la posibilidad de pérdida efectiva de la resistencia, especialmente en el trópico, en donde las condiciones

ambientales en muchas zonas favorecen un continuo desarrollo de la enfermedad (CIAT,1980).

La presencia de algunos patógenos está restringida a ciertas regiones específicas; por ejemplo, el organismo causante de la mustia hilachosa y el virus del mosaico dorado del frijol prevalecen en regiones bajas, mientras que la antracnosis aparece en regiones altas. Por otra parte, algunos patógenos se presentan en todas las regiones, por ejemplo, el virus del mosaico común del frijol y el organismo causante de la roya (CIAT,1978)

Dos enfermedades fungosas del frijol común son muy importantes en las zonas bajas tropicales: la roya (*U.phaseoli*) y la mancha angular (*I.griseola*), con pérdidas hasta del 50% y 80%, respectivamente (Tapia y Camacho, 1988).

En Costa Rica, en las zonas ecológicas de bosque muy húmedo subtropical (Turrialba, Tilarán, San Isidro de El General), las principales enfermedades limitantes para la producción del frijol, son la mancha angular y la roya, entre otras (Echandi, 1966).

2.2.1 Mancha angular (*Isariopsis griseola*) Sacc.

I. griseola pertenece a la Clase de los hongos imperfectos (Deuteromicetos), del orden Moniliales, familia Stilvaceae; se le conoce también con los siguientes sinónimos: *Isariopsis*

laxa (Ell.) Sacc.; *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris; *Cercospora columnare* Ell. y Ev.; *Lyndaomyces griseola* Gonz. Frag.; *Arthrobotryum puttemansii* Henn.; *Cercospora sthulmanni* Henn. (Campos, 1987).

El agente causal *I. griseola*, ataca el follaje, vainas y tallos. En las hojas produce lesiones angulares de color oscuro delimitadas por las nervaduras, que se tornan circulares cuando envejecen (Campos y Fucikovsky, 1980). Estas lesiones tienden a unirse durante el avance de la enfermedad, ocupando mayores áreas. Finalmente las hojas afectadas muestran grandes zonas necróticas y se desprenden del tallo. La enfermedad comienza por las hojas inferiores; notándose que en algunas plantas todo el follaje es invadido. Una defoliación casi completa, ocurre durante el período de formación del fruto (Díaz et al., 1965).

Algunos autores afirman que la enfermedad ataca de preferencia plantas jóvenes; otros sostienen que el patógeno prefiere los tejidos de las hojas más viejas, especialmente las inferiores. El rendimiento en variedades susceptibles, se reduce considerablemente si la incubación se inicia a los 20 días de desarrollo de la planta, o en la floración, en ambos casos se producirá, después de aparecer los primeros síntomas, un amarillamiento y una posterior defoliación (Olave, 1958).

En el campo el hongo produce grupos de 8 a 40 conidióforos, los cuales se yuxtaponen, formando un fascículo columnar oscuro que recibe el nombre de coremio o sinema, en cuya parte superior se forman los conidióforos. Estos fructifican en la madurez, produciendo conidios grises, de formas cilíndricas a fusiformes, levemente curvados, y miden de 7 a 8 X 50 a 60 μ , con uno a cinco septos (CIAT,1980). Las esporas de *Isariopsis* germinan en ocho horas, bajo condiciones favorables infectan el tejido de la hoja al penetrar a través de los estomas, avanzando intercelularmente en el mesófilo y en el parénquima en empalizada. A los 19 días el hongo se desarrolla intracelularmente en las lesiones necróticas; 12 días después, en la cavidad subestomática el hongo desarrolla un estroma de donde emergen los conidióforos que forman el sinema. Cuando en las hojas sólo se notan las manchas angulares, al someterlas a una humedad relativa de 95% durante 48 horas se obtiene una abundante esporulación bajo condiciones de invernadero. En el campo, la esporulación ocurre entre 16 y 24 C (Campos, 1987).

La infección y desarrollo de este hongo se favorecen con temperaturas de 18-25 C y períodos de alta humedad. Las lesiones son angulares a causa de su delimitación por las venas. Las lesiones angulares aparecen primero en el envés de la hoja, como manchas grises, luego se tornan color café y se cubren de pequeñas columnas de hifas (sinema). Las lesiones de las vainas y los tallos son de color café-rojizas y frecuentemente rodeadas por un borde más oscuro. (CIAT,1978).

Posteriormente las lesiones pueden unirse y causar una necrosis parcial y amarillamiento de las hojas, seguido de una defoliación prematura (CIAT,1980).

Las lesiones ocasionadas por el patógeno aparecen 9 días después de la infección. El desarrollo de epidemias depende de la clase de sistema agrícola utilizado en las zonas productoras del frijol. La enfermedad se desarrolla rápidamente a 24 C, y la severidad aumenta cuando los períodos de alta humedad relativa sobrepasan las 24h (Hagedorn y Wade, 1974). La mancha angular es más severa en el frijol cultivado en asocio con maíz, que con camote o yuca, o en monocultivo (Moreno,1977). El patógeno puede encontrarse internamente en la semilla y la transmisión también puede ocurrir por esporas diseminadas por el viento (CIAT,1978).

2.2.2 *Roya (Uromyces phaseoli (Reben)) Wint.*

La roya del frijol fue encontrada por primera vez en Alemania el año de 1795 (Rey y Lozano, 1961). Es una enfermedad común a nivel mundial, y se considera como uno de los problemas más importantes que afectan la producción de frijol en muchas regiones de América Latina. Las pérdidas en rendimiento son mayores cuando las plantas son infectadas durante los períodos de prefloración, o sea de 30 a 45 días después de la siembra (CIAT,1980).

El hongo *U.phaseoli* es un parásito obligado que pertenece a la Clase de los Basidiomicetes. Este hongo tiene un ciclo de vida autoico, es decir que es capaz de completar todo su ciclo en el frijol. Además es macrocíclico (CIAT, 1980 y Rey y Lozano, 1961).

En el trópico se hallan dos tipos de esporas: 1) la uredosporas o esporas vegetativas que son las que generalmente inician e incrementan la enfermedad y 2) la teliosporas o esporas sexuales.

En variedades de frijol muy susceptibles se pueden observar 5 a 6 días después de la inoculación, manchas muy pequeñas, clóroticas o blancas ligeramente protuberantes tanto en el haz como en el envés de la hoja. Estas manchas crecen hasta formar pústulas pardo-rojizas que al romperse la epidermis de la hoja, liberan una especie de polvillo herrumbroso (masas de uredosporas). El ciclo completo de infección tarda de 10 a 15 días; alrededor de la pústula principal pueden formarse pústulas secundarias (Tapia y Camacho ,1988).

Cuando la infección es muy severa, o aparece antes de la floración, puede ocurrir defoliación prematura con una disminución drástica en la formación y llenado de vainas; cuando más jóvenes sean las vainas, más susceptibles son al ataque. El patógeno también puede atacar tallos y pecíolos (Tapia y Camacho , 1988).

Los períodos prolongados (10 a 18h) de humedad relativa mayores que 95% y las temperaturas moderadas de 17 a 27 C son condiciones favorables para la infección producida por *Uromyces phaseoli*. Las temperaturas mayores que 32 C pueden acabar con el hongo y las menores que 15 C retardan su desarrollo. Las condiciones de humedad y temperatura también influyen en la producción y liberación de uredosporas (CIAT,1980).

La diseminación de la roya es muy fácil; cualquier objeto que haya estado en contacto con las hojas infectadas o que hayan entrado en contacto directo con la masa de uredosporas, será un agente diseminador. El viento es el vehículo de dispersión por excelencia a grandes distancias. Este hongo no es transmitido por semilla (Tapía y Camacho , 1988).

2.3 Inducción de resistencia como componente del manejo integrado de enfermedades

Cuando las plantas sobreviven a las infecciones por un patógeno, ellas desarrollan un incremento en la resistencia para subsecuentes infecciones. Este es un fenómeno similar a la repuesta de inmunidad en mamíferos. Por lo tanto, la inducción de resistencia sistémica es un importante componente, que contribuye significativamente a la salud de la planta (Kuc y Strobel, 1992).

La resistencia puede ser inducida por el tratamiento de plantas, con una variedad de patógenos de plantas y microorganismos no patogénicos y sus metabolitos. Otros inductores incluyen materiales derivados de plantas, químicos inorgánicos y químicos orgánicos. La bacteria *Bacillus thuringiensis*, ha sido reportada como inductora de resistencia local en un ámbito de especies hospederas. La resistencia puede ser inducida en el follaje o sistémicamente dentro de las raíces en algunos casos. La resistencia sistémica es inducida por el tratamiento de semillas, raíces, tallos, cotiledones o láminas foliares. La resistencia local es inducida directamente por el tratamiento de los órganos de la planta a proteger (Kuc y Strobel, 1992).

La inmunización de plantas puede tener su nicho en la agricultura sostenible, como una de las variadas prácticas que promueven la salud de la planta y reducen las enfermedades. La reducción en el uso de plaguicidas sintéticos para el control de enfermedades, a través de la inmunización de plantas, es una práctica a incorporar en los programas del manejo integrado de plagas (MIP), en donde el nivel de reacción de defensa de la planta, puede ser detectado mediante indicadores de actividad enzimática ó de tratamientos inductores ó tratamientos con plaguicidas (Tuzun y Kuc, 1991).

Tuzun y Kuc (1991), manifiestan que algunas de las ventajas de la inmunización de plantas son: la inmunización es

efectiva contra enfermedades virales, bacterianas y fúngicas, puede ser lograda por medio de agentes biológicos y químicos, es sistémica y puede durar toda la vida de la planta, es transmisible de raíces a yemas o por vía del cultivo de tejidos en algunas especies.

La inmunización de plantas de pepino, melón y sandía, utilizando razas atenuadas del hongo *Colletotrichum lagenarium*, el virus de la necrosis del tabaco (TNV), y sus componentes liberados, son agentes inmunizantes, que protegen sistémicamente a las plantas contra unas 13 enfermedades, causadas por diferentes patógenos (Kuc y Strobel, 1992).

La posible manipulación de estos mecanismos naturales en la práctica del control de enfermedades puede ser muy provechosa, efectiva, persistente, económica y una alternativa más segura de proteger las plantas contra virus, bacterias y hongos patógenos, bajo condiciones de invernadero y campo. Investigaciones en laboratorio alrededor del mundo han demostrado que la inmunización es viable, contra un amplio ámbito de patógenos foliares y patógenos radicales en aproximadamente 25 cultivos, incluyendo cereales, cucurbitáceas, leguminosas, solanáceas, árboles y pequeños frutales. El tipo de protección puede variar entre las especies de plantas (Tuzun y Kuc, 1991).

2.4 Control de patógenos de la parte aérea de la planta.

En los últimos años, se ha aceptado que grandes poblaciones de microorganismos epifíticos viven sobre los órganos de las plantas y que ellos pueden influir la habilidad de las especies patogénicas, para infectar las hojas y tallos. El uso de microorganismos no patógenos, en el control de enfermedades es muy promisorio debido a que los saprófitos, pueden ser considerados más tolerantes a los químicos que los patógenos y por lo tanto pueden ser compatibles con diversas medidas de control (Corke y Rishbeth, 1981).

El medio ambiente en la superficie de las hojas fluctua mucho más rápidamente que en las superficies de las raíces. Las hojas de la parte interna del follaje, son menos afectadas por cambios en el clima, que las ubicadas en la parte superior. Las temperaturas pueden variar sobre la superficie de una hoja, pero generalmente, en un ámbito promedio de 2 a 3 C (Burrage, 1971).

La humedad relativa (HR), en la superficie de la planta es comúnmente el factor más importante de influencia para el crecimiento y supervivencia de microorganismos en este habitat. El soporte del crecimiento de muchos microorganismos, en las superficies de las plantas, puede estar sobre el 95% de HR. La humedad de las hojas, es afectada por la velocidad del viento y las características de la superficie de la hoja. Las irregularidades de la

superficie de la hoja, tales como: tricomas, células epidermales y cristales de ceras epicuticulares (Martin y Juniper, 1970), pueden causar repelencia del agua, en la superficie de la hoja.

Los nutrientes pueden estar disponibles sobre las hojas, permitiendo el crecimiento de los saprófitos epifíticos. Sin embargo los nutrientes también son requeridos por los patógenos que exhiben una fase temporal saprofítica, antes de la penetración. La fuente de estos nutrientes son los productos vertidos de los tejidos de la planta, a la superficie de las hojas. Las cantidades de carbono y nitrógeno contenido en estos compuestos son mínimas. Un amplio ámbito de otros compuestos, también son expulsados de las células, incluyen elementos minerales, hormonas del crecimiento, así como sustancias fenólicas y terpenoides, que pueden inhibir el crecimiento microbial (Tukey, 1971).

El perfil de distribución de nutrientes vertidos sobre la superficie de la hoja, no es uniforme, pero tiende a aumentar sobre las venas, a lo largo de las líneas de unión en las paredes anticlinales de las células epidermales y alrededor de las bases de los tricomas. La inducción de secreciones de nutrientes y diferencias en el microclima, son responsables del incremento de microorganismos en esas áreas. La deposición de sustratos adicionales fomenta el crecimiento de saprófitos, actuando como recolectores de basura (Fokkema, 1981).

La aplicación de microorganismos antagonistas a fitopatógenos del follaje, puede ser más efectiva, si se aplica a un tiempo con grupos taxonómicos similares, de ocurrencia natural en el filoplano. Antagonistas extraños, son comúnmente menos adaptados para crecer y sobrevivir en las superficies de las plantas, la necesidad de persistencia de los antagonistas en este habitat, puede ser cubierta por repetidas aplicaciones. Los diferentes grupos de patógenos foliares reaccionan en diferentes vías, a la presencia de microorganismos antagonistas a su alrededor. Esto es debido a diferencias fundamentales en el comportamiento de los patógenos, durante su fase de penetración en la superficie de la planta. Así por ejemplo, las bacterias como antagonistas, se pueden encontrar como habitantes foráneos sobre el follaje y afectan a patógenos no especializados, necrotróficos y biotróficos, por fenómenos de parasitismo, producción de antibióticos y competencia por nutrientes (Brodie y Blakeman, 1975).

El control de patógenos de las partes aéreas, por medio de agentes biológicos se basa en el fenómeno de antibiosis, antagonismo mediado por metabolitos específicos o no específicos de origen microbial, debido a agentes líticos, enzimas, compuestos volátiles u otras sustancias tóxicas. Este antagonismo también puede mediar en mecanismos de competencia, parasitismo y depredación (Fravel, 1988).

El control biológico de enfermedades inducidas por infecciones de la parte aérea de la planta, es confinado a

interacciones en la filosfera. Las investigaciones en ésta área son relativamente limitadas, comparando con los estudios de control biológico de enfermedades del suelo. La principal razón para esta causa es probablemente el eficiente control de enfermedades foliares con fungicidas (Fokkema, 1991).

Leben et al., (1965), mencionan como una de las causas del escaso uso de bacterias antagonistas en el control de enfermedades foliares, la muerte rápida de las células bacterianas bajo condiciones de campo y que el 99% de células bacterianas, no son viables 24 horas después de la aplicación, según trabajos de control sobre la roña del manzano, antracnosis del pepino y tizón temprano del tomate.

Actualmente el control biológico es una alternativa viable y económica, debido a un menor impacto ambiental. Además el uso de fungicidas a ocasionado resistencia en algunos patógenos foliares (Fokkema, 1991).

Rahe et al., (1969), inocularon con aspersiones de *Colletotrichum lindemuthianum* (5 a 10×10^6 conidios/ml), *Helminthosporium carbonum* y *Alternaria* sp. (1 a 2×10^6 conidios/ml), hipocótilos de *Phaseolus vulgaris*, induciendo resistencia por hipersensibilidad. Estos autores determinaron la producción de sustancias inhibitorias, en este caso las fitoalexinas, pisatina y faseolina, que se originan como respuesta al microorganismo.

Pruebas de campo, tratando de controlar la mancha foliar causada por *Cercospora* en el cultivo del maíz, fueron efectuadas, usando células de la bacteria *Pseudomonas cepacia* en cultivo líquido y un concentrado comercial de esporas de *Bacillus thuringiensis* (Bt). El fungicida clorotalonil (Bravo), y los agentes de biocontrol, a una concentración de 10^7 ufc/ml, fueron asperjados sobre las plantas. *P. cepacia* y Bt, causaron una reducción de manchas foliares por *Cercospora* y una significativa disminución de la defoliación. Las esporas de Bt, probablemente se mantuvieron viables sobre la superficie de la hoja por más tiempo que las células de *P. cepacia*. Estos resultados demostraron la factibilidad y eficiencia en el control de enfermedades foliares en campo, mediante la aplicación de bacterias antagónicas (Spurr, 1978).

Estudios anteriores han demostrado que *Bacillus subtilis* es un antagonista de la roya del frijol (*U. phaseoli*), a través de la producción de antibióticos, más eficaz que las aplicaciones semanales del fungicida mancozeb (Baker et al., 1985).

La duración de los períodos de incubación y latencia de *Hemileia vastatrix*, se prolongaron con aplicaciones de *Bacillus thuringiensis* y quitina al 0,5% en plantas de cafeto (Rivera, 1992).

La inducción de resistencia en frijol contra *U. phaseoli* mediante inoculaciones con *H. vastatrix*, podría tener una aplicación práctica en zonas cafetaleras en donde, se esté promoviendo el cultivo del frijol (Castaño y Allen, 1985).

Fokkema (1991), hace referencia a interacciones antagonistas a royas en trabajos de Rytter et al., (1989). (*B. subtilis* - *Puccinia recondita*), Kempt y Wolf, (1989) (*Erwinia herbicola* - *P. recondita*), Roveratti et al., (1989) (*B. thuringiensis* - *Hemileia vastatrix*), como posibles agentes de control en condiciones de campo.

Tres hospederos y sus interacciones con patógenos: frijol con *Colletotrichum lindemuthianum*; cucurbitáceas con hongos, bacterias y virus; y tabaco con *Peronospora hyoscyami* fs. *tabacina*, fueron estudiadas por Kuc (1982) y en los tres, la activación de las defensas bioquímicas parecen ser una parte de los mecanismos de resistencia y protección contra enfermedades, esto al parecer se explica por métodos que se asemejan a la inmunización en animales.

Centurion y Kimati (1994), aislaron microorganismos del filoplano de hojas de frijol frescas y de hojas secas recogidas del suelo, provenientes del cultivar Rosinha, inoculadas previamente con uredosporas de *U. phaseoli*. Los microorganismos aislados se aplicaron en una suspensión sobre plantas del mismo cultivar. A través de esta metodología comprobaron la existencia de microorganismos habitantes de el

suelo y del filoplano, con capacidad de inhibir la formación de pústulas de roya en el frijol. Entre los microorganismos evaluados destacaron *Arthrobacter* sp., aislamiento B-138, *Bacillus* sp., aislamiento B-206 y *Bacillus subtilis*, aislamiento AP-401.

Así mismo, Centurion y Kimati (1994), trabajando con bacterias previamente aisladas, mencionan que *Bacillus subtilis*, *Bacillus* sp. y *Arthrobacter* sp., presentan ser eficientes cuando se aplican en suspensiones concentradas de células (solución acuosa de Tween 20, al 0,01%), reduciendo en más del 95% el número de pústulas de roya en el frijol. Suspensiones con bajas concentraciones de células proporcionan una reducción superior al 80% del número de pústulas de roya, en hojas asperjadas con *B. subtilis* y *Bacillus* sp., y cerca del 70% en hojas asperjadas con *Arthrobacter* sp. *B. subtilis* y *Bacillus* sp., en solución concentrada afectaron parcialmente la viabilidad de las uredosporas de *U. phaseoli*, cuando se aplicaron sobre pústulas de roya. *B. subtilis* y *Arthrobacter* sp., probadas en invernadero, mostraron ser eficientes en la reducción del número de pústulas de roya por un período de tiempo mayor, que el aislamiento de *Bacillus* sp.

Cristancho y Leguizamón (1995), encontraron que aislamientos y productos comerciales de *Bacillus thuringiensis* (Bt), en las concentraciones evaluadas, sobre discos de hojas y plantas jóvenes de *Coffea arabica* var. Caturra, presentaron

efecto protector contra la roya del cafeto, evidenciado por la reducción en el grado de infección de *Hemileia vastatrix*. En plantas jóvenes de var. Caturra, el efecto inductor fue al menos de 16 días y tuvo un máximo de acción a los 8 días, después de la aplicación de la suspensión bacteriana. La mayor reducción en el desarrollo de la infección por roya, fue obtenida en plantas jóvenes en condiciones de umbráculo asperjadas con la formulación comercial de la bacteria DIPEL, a una concentración de 10g./L. Con la aspersión simultánea de *Bt* y el hiperparásito *Verticillium lecanii*, no fue observado un mayor efecto protector que con los dos microorganismos aplicados individualmente. Todos los aislamiento de la bacteria afectaron la tasa de germinación de *H. vastatrix*.

2.5 Inducción de resistencia por agentes químicos.

La lista de agentes que se proponen como inductores sistémicos de resistencia a fitopatógenos incluyen varias sales inorgánicas como silicón, oxalatos, fosfatos y ácidos nucleicos y grasos no saturados, etc. En muchos casos, estos agentes, cuando son aplicados sobre las superficies foliares pueden ocasionar una necrosis local, probablemente debida a una vía dependiente del ácido salicílico, similar a la inducida por la infección de un patógeno. Con algunos de los agentes inductores, la protección observada puede no ser sistémica y confundirse con efectos antimicrobiales directos (Kessmann et al., 1994).

La aspersión de plantas de pepino con oxalato, K_2HPO_4 y K_2PO_4 , protegen sistémicamente al pepino contra *Colletotrichum lagenarium* (antracnosis), *Pseudomonas lachrymans* (mancha angular) y contra el virus de la necrosis del tabaco (TNV), evidenciando que los inductores químicos dan resistencia contra hongos, bacterias y virus, a diferentes niveles (Mucharromah y Kuc, 1991).

Cohen (1991) y Okuno (1991), citados por Hammerschmidt y Kuc (1995), mencionan que tratamientos con químicos como ácidos grasos insaturados ; herbicidas del grupo de las dinitroanilinas ; y el ácido salicílico, pueden inducir resistencia.

Hammerschmidt (1991), sugiere la posibilidad de utilizar químicos que no tienen actividad directa contra patógenos, efectivamente para inducir resistencia sistémica, bajo condiciones de campo.

Wicks et al., (1991), manifiestan que la aplicación de ácido fosfórico (H_3PO_3), a dosis de 1,2g/L, después de la infección, reducen la incidencia y severidad de *Plasmopara viticola*. Cuando se aplicó a los 13 días después de la infección el ácido redujo la esporulación del hongo. En algunos experimentos, la actividad del ácido durante la postinfección, fue mejor que la del fungicida metalaxil, aunque, en otros mostró ser menos efectiva.

Reuveni et al., (1994), demostraron que la simple aspersion foliar de 0.1M de una solución de sales de fósforo, aplicada sobre el haz de hojas de maíz cv. Jubilee, en las hojas 1, 2 y 3, 2-4 horas antes de la inoculación con *Puccinia sorghi*, inducen resistencia sistémica contra la roya común y se expresa por la reducción en un 98% del número de pústulas de *P. sorghi*, desarrolladas sobre las hojas 5, 6 y 7. Una significativa reducción (90%), en el número de pústulas fué obtenido cuándo las aplicaciones foliares se realizaron 6 días antes de la inoculación. La aplicación foliar de K_2HPO_4 , sobre las hojas 1, 2 y 3, 6 días antes de la inoculación, estimulan el crecimiento de la planta, indiferentemente de la inoculación con el hongo. La aspersion foliar el mismo día de la inoculación, fué menos efectiva, en estimular el crecimiento.

Reuveni et al., (1995), demostraron que el mildiú polvoriento, causado por *Sphaerotheca fuliginea* en plantas de pepino, es significativamente controlado con una simple aspersion de una solución acuosa a base de fosfatos y sales de potasio, a concentraciones de 25mM. Los fosfatos fueron supresivos cuándo se aplicaron solos. La eficiencia en el control se expresó por la desaparición del 99% de las pústulas, después de 1 ó 2 días de la aplicación individual de las soluciones de sales de fósforo y potasio. Las primeras aspersiones inhibieron el desarrollo de la enfermedad en comparación con el testigo, pero no redujeron el número de lesiones existentes. Los fosfatos resultaron

más efectivos que el fungicida sistémico pirifenox y redujeron el establecimiento de la infección por mildiú, a los 11 días después de la aplicación. Consistentemente, las aplicaciones de K_2HPO_4 y KH_2PO_4 , dieron los mejores resultados para inducir protección sistémica.

Los fosfatos de potasio son la principales fuentes inorgánicas, para el crecimiento de la mayoría de microorganismos (Brock y Madigan, 1991). Esto da la pauta para pensar en la utilización de fosfatos-microorganismos, como componentes de programas de manejo integrado de enfermedades.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Localización

El trabajo se desarrolló en tres etapas: laboratorio, invernadero y campo. Las primeras dos se realizaron en el laboratorio de Fitopatología y casa de mallas, de la unidad de Fitoprotección. La tercera, en la Finca "La Montaña", (CATIE, Turrialba, Costa Rica). Las coordenadas geográficas del lugar son 9°54' de latitud Norte y 83° de longitud Oeste.

La temperatura media anual es de 21.6 C y la humedad relativa del 87%. La precipitación promedio anual es de 2673 mm. La zona de vida corresponde a bosque muy húmedo subtropical (bmh-st), a un promedio de 600msnm, (Echandi, 1966).

3.2 Búsqueda y aislamiento de microorganismos.

Se recolectaron hojas de plantas de frijol (*Phaseolus vulgaris*), de un cultivo ubicado en la Finca "La Montaña", propiedad del CATIE, en Turrialba.

Las hojas se cortaron en trozos pequeños, de éstos se obtuvo una muestra de 30g, posteriormente se colocaron en 270ml de agua destilada estéril. Se agitaron por 45min en un incubador-agitador Orbit, a 75rpm. Después de transcurrido este tiempo, se prepararon las siguientes diluciones de 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} , siendo esta última la empleada para la

multiplicación. De esta dilución se tomó 0.1ml, y se colocó en platos de Petri conteniendo agar nutriente. Se realizó un estriado por toda la superficie del medio y se incubaron a temperatura ambiente por 48h.

Transcurrida la incubación, se observó el crecimiento de microorganismos, se eliminaron aquellos platos con crecimiento de hongos, pues se buscaba únicamente bacterias, y en aquellos en donde aparentemente solo había presencia de éstas se escogieron 10 bacterias supuestamente diferentes (las cuales se clasificaron como b_1, b_2, \dots, b_{10}), con base en características macroscópicas. Estas bacterias se sembraron individualmente en platos de Petri con agar nutriente, para utilizarlas en pruebas posteriores.

3.2.1 Recolección y mantenimiento de los hongos *Isariopsis griseola* y *Uromyces phaseoli*.

La recolección de *I. griseola* se realizó de muestras de hojas de frijol que mostraban los síntomas típicos de la mancha angular. El tejido afectado se lavó y desinfectó con hipoclorito de sodio, disuelto en agua (1:9), por 2 min, después se lavó 2 veces en agua destilada estéril.

Posteriormente se secó y se colocaron en cámara húmeda por 48h, para permitir el apareamiento de sinemas y su esporulación. Una vez ocurrida ésta, se tomó una pequeña porción (aproximadamente 2mm^2) de agar agua con una aguja

estéril y con mucho cuidado se tocó el sinema para que las conidias se adhirieran al agar. Luego la pequeña porción de agar se transfirió a un plato de Petri con medio V8 (Anexo 1). Una vez sembradas las conidias en este medio, se envolvieron los platos en papel aluminio y se incubaron a 24 C. El proceso se repitió varias veces hasta obtener colonias puras y con abundante esporulación.

Con respecto a *U. phaseoli*, la recolección se hizo de hojas infectadas en el campo, por medio del raspado de pústulas en laboratorio y por el sacudido de hojas infectadas sobre papel encerado en el cultivo. En ambos casos las uredosporas se guardaron en viales, dentro de otro frasco conteniendo sílica-gel y en refrigeración a una temperatura promedio de 7 C, para mantener su viabilidad.

3.3 Prueba de supresión de la germinación, de uredosporas de *U. phaseoli*, con suspensiones bacterianas.

De las uredosporas de roya previamente almacenadas, se tomó una muestra, y se preparó una suspensión en 10 ml, de agua destilada estéril, a una concentración de 30 a 50 uredosporas por campo microscópico (objetivo 10X); de ésta se colocaron 5 gotas en platos Petri con agar agua. De cada gota se tomaron 5 lecturas por campo microscópico a las 9h. El tiempo de almacenamiento de las uredosporas al momento de la prueba de viabilidad, era de 2 semanas. La prueba se consideró

positiva cuando el tubo germinativo de la uredospora alcanzó una longitud similar a 2 veces su diámetro.

Con la misma suspensión y concentración de uredosporas, se procedió a la prueba de supresión de la germinación. En platos Petri con agar-agua se colocaron 5 gotas de la suspensión haciéndolo en forma de cruz, poniendo una en cada extremo y una en el centro (Anexo 2). Luego sobre cada punto se puso una gota de la dilución bacteriana y se marcaron con los números 3,6,9,12 y 24, que fué el tiempo en horas, en que el proceso de germinación fué detenido, con la aplicación de una gota de azul-algodón. Concluidas las 24h se procedió a observar 5 campos microscópicos (10X) por cada período de tiempo de evaluación, con el fin de determinar el porcentaje de uredosporas germinadas.

Se probó el efecto de 10 bacterias aisladas previamente del follaje de frijol, las bacterias *Pseudomonas cepacia*, *Serratia marcescens* (cepa R1), *Bacillus cereus* (cepa A-30) pertenecientes a la colección MIP-CATIE, con buenos antecedentes en biocontrol (González, 1995; González, 1996), el fungicida oxicarboxin (Plantvax, a 1.2g/L) y un testigo absoluto.

Para cada uno de los tratamientos se efectuaron 3 repeticiones en un diseño completamente al azar.

3.3.1 Prueba de compatibilidad de bacterias con fungicidas.

Se esterilizaron discos de papel filtro de 7 mm., de diámetro, los cuáles se impregnaron de la dilución bacteriana y se colocaron en platos Petri con una pinza estéril sobre medio agar nutriente, los cuales llevaban incorporados los fungicidas mancozeb (Dithane M-45), benomil (Benlate) y oxicarboxin (Plantvax) en concentraciones de 0,10,100 y 1000 ppm. Cada plato Petri se dividió en cuadrantes en donde se colocó el disco impregnado de cada bacteria (Anexo 3) y posteriormente se midió la compatibilidad del fungicida evaluando el crecimiento bacteriano, desde la periferia del disco hasta el borde de la colonia (mm). Los platos se incubaron a temperatura ambiente por 24h.

3.3.2 Prueba de supresión de la germinación, de conidios de *Isariopsis griseola*, con suspensiones bacterianas.

Para la esporulación del hongo *I. griseola*, se procedió a sembrarlo sobre medio de cultivo V8 a 24 C, en donde forma conidióforos sueltos (septados de color café claro), en cuyo ápice y lados se forman los conidios (Campos, 1987).

De los platos Petri con el hongo esporulado, se sacaron bocados de aproximadamente 8mm de diámetro, se pusieron en tubos de ensayo con agua destilada estéril, y se agitaron vigorosamente para desprender los conidios. Se llevó el

contenido a una suspensión de concentración aproximada de 30 a 50 conidios por campo microscópico de 10X.

De esta suspensión se pusieron 5 gotas en platos Petri con agar-agua, y posteriormente sobre cada una de ellas, una gota de la dilución bacteriana. El procedimiento de evaluación es el mismo que para la prueba de supresión de la germinación de las uredosporas de roya (Anexo 2), a las 3,6,9,12 y 24h, deteniendo el crecimiento con azul-algodón a su momento.

Se probó el efecto de las bacterias *Bacillus cereus* (cepa A-30), *Pseudomonas cepacia*, *Serratia marcescens* (cepa R1), el fungicida benomil (Benlate) a 1.2 g/L, y un testigo absoluto.

Para cada uno de los tratamientos se efectuaron 3 repeticiones, en un diseño completamente al azar.

3.4 Prueba de sustratos.

Plantas de frijol mantenidas en el invernadero (20 días de edad) se asperjaron al follaje, con diluciones acuosas de las bacterias *Bacillus cereus* (cepa A-30), *Pseudomonas cepacia* y *Serratia marcescens* (cepa R1) a concentraciones promedio de 2.28×10^7 ufc/ml, 6.81×10^6 ufc/ml y 4.98×10^7 ufc/ml respectivamente.

Inmediatamente después se aplicaron por aspersión al follaje los sustratos leche y melaza, según el procedimiento descrito por Ruiz, 1995 (Anexo 4).

Transcurridas 24 h, se recogió una hoja trifoliada, de cada tratamiento, se cortó en trocitos y se pesó 1g, el cual se colocó en 9 ml., de agua destilada estéril contenida en tubos de ensayo, agitando vigorosamente por 45min, a 75rpm, en un incubador-agitador Orbit. De este lavado se puso, 0.1 ml., de la dilución sobre platos Petri con agar nutriente y se estrió sobre la superficie de el medio. Se dejaron en incubación a temperatura ambiente por 1 día y después se procedió al conteo de colonias bacterianas por plato. El procedimiento se repitió en igual forma a los 2 y 7 días.

Para cada bacteria y sustrato se efectuaron 3 repeticiones en un diseño completamente al azar.

3.5 Experimento de invernadero.

Para esta etapa se emplearon macetas de 5kg de capacidad, se llenaron con tierra proveniente de la Finca "La Montaña", la cual fue previamente esterilizada con el fumigante dazomet (Basamid granulado, en dosis de 40g/m², por capa de suelo de 25cm).

En cada maceta, se sembraron 3 semillas de frijol de la variedad 27R. Esta variedad está clasificada dentro de los

frijoles rojos, de la colección de germoplasma CIAT y susceptible a las enfermedades de roya y mancha angular (CIAT,1980).

Las plantas se dividieron en 2 grupos y a los 11 días de edad se les aplicaron en igual forma los siguientes tratamientos: las bacterias *Bacillus cereus* A-30 (t4), *Pseudomonas cepacia* (t6), *Serratia marcescens* R1(t1), a concentraciones de 6.8×10^6 , 2.28×10^7 y 4.98×10^7 ufc/ml, respectivamente, una formulación comercial de *Bacillus thuringiensis* (Javelin) a 10g/L (t7), fosfato (k_2HPO_4) a 50 mM (t3), un testigo absoluto (t5) y un testigo con fungicida (t2), utilizando para un grupo oxicarboxin (Plantvax), en el caso de roya y benomil (Benlate), contra la mancha angular, ambos a una dosificación de 1.2g/L. El fosfato (k_2HPO_4) se aplicó únicamente a la primera hoja trifoliada y los demás tratamientos por aspersión total al follaje.

A los 14 días después de la germinación, a cada grupo se le inoculó el hongo fitopatógeno correspondiente: *Uromyces phaseoli* ó *Isariopsis griseola*, dejando las plantas en cámara húmeda por 24 y 48h respectivamente, luego se trasladaron al invernadero.

Se evaluó la presencia de lesiones típicas de cada enfermedad, contando el número de éstas en el follaje, para cada tratamiento y enfermedad.

Se empleó 4 repeticiones, en un diseño completamente al azar, para cada enfermedad.

3.6 Experimento de campo.

El experimento de campo se realizó en la finca "La Montaña", y comprendió parte del mes de Junio hasta Agosto de 1996.

En parcelas de 5.46m², se sembraron 4 surcos de la variedad de frijol 27R, poniendo 3 semillas por postura a 20 cm, entre cada una de ellas.

Se utilizó 2 diseños de bloques completamente al azar, con 4 repeticiones cada uno, un experimento para evaluar mancha angular (Anexo 5) y el otro para roya (Anexo 6).

Los tratamientos aplicados a las parcelas, fueron los siguientes: *S. marcescens* R1 (t1), testigo relativo con fungicida (t2), K₂HPO₄ (t3), *B. cereus* A-30 (t4), *P. cepacia* (t5) y *B. thuringiensis*, Javelín (t6). No se incluyó testigo absoluto, porque previamente se determinó comparar cada tratamiento contra el tratamiento químico convencional, para evaluar su efectividad con respecto a este.

La primera aplicación de tratamientos se efectuó a las 2 semanas después de la germinación. La inoculación de los hongos fitopatógenos correspondientes a cada enfermedad se efectuó 7 días después, a concentraciones promedio de 3x10⁴

uredosporas/ml, para *U. phaseoli* y de 2×10^4 conidios/ml, para *I. griseola*, según recomendaciones de CIAT (1985).

La evaluación del desarrollo de la enfermedad se hizo, comparando las lesiones, con las escalas de severidad propuestas por Castaño, 1989 (Anexo 9 y 10). La primera evaluación se hizo a los 25 días después de la germinación y posteriormente cada semana hasta los 53 días, con un total de 5 evaluaciones.

De cada parcela se muestreó el follaje de 10 plantas, tomadas al azar, en los dos surcos centrales, eliminando los bordes.

A los 36 días de la germinación se efectuó una segunda aplicación de tratamientos, exceptuando el fosfato, al que se le evaluó la duración del posible efecto sistémico.

En ambos experimentos se aplicó al suelo una cobertura de aserrín de madera, con el objetivo de reducir la infección por el hongo *Thanatephorus cucumeris*.

3.7 Análisis de resultados.

Los análisis de los resultados para las pruebas de laboratorio, invernadero y campo, se efectuaron mediante pruebas de Dunnett y Duncan.

En el experimento de campo, los datos semanales de severidad se utilizaron para graficar y determinar el área bajo la curva de progreso de la enfermedad: ABCPE, el cuál se expresa en unidades de proporción de enfermedad-día. Es un parámetro que cuantifica el comportamiento de las enfermedades, y de mucha utilidad para comparar tratamientos (Tamayo, 1995 y Rivas-Platero, 1996).

La fórmula matemática es: $ABCPE = \sum (Y_i + Y_{i+1}) / 2 \times dt_i$, donde:
 Y_i = proporción de enfermedad (incidencia o severidad) afectada en la i ésima observación.

t_i = tiempo (días) después de la inoculación en la i ésima observación.

Σ = Sumatoria de n observaciones.

4.0 RESULTADOS Y DISCUSION

4.1 Aislamiento de bacterias, posibles antagonistas a *Isariopsis griseola* y *Uromyces phaseoli*.

El lavado de hojas de frijol demostró, que existe una población epífita de microorganismos sobre el follaje de plantas de frijol, ya que mediante diluciones y siembra sobre agar nutriente, se obtuvo, después de 24h abundante crecimiento de diversos grupos de microorganismos. De estos, se escogieron 10 cepas bacterianas, en base a sus características macroscópicas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Selección de cepas bacterianas, por características macroscópicas, aisladas de hojas de frijol, posibles antagonistas a *Isariopsis griseola* y *Uromyces phaseoli*. Turrialba, Costa Rica, 1996.

Cepa bacteriana	Color de la colonia	Morfología de colonia	Consistencia	Crecimiento sobre AN
b ₁	amarilla	circular	mucoide	moderado
b ₂	blanca	circular	mucoide	moderado
b ₃	amarilla	circular	mucoide	moderado
b ₄	blanca	circular	mucoide	moderado
b ₅	amarillenta	circular	mucoide	moderado
b ₆	amarillenta	circular	mucoide	moderado
b ₇	blanca	circular	mucoide	abundante
b ₈	amarillenta	circular	mucoide	moderado
b ₉	blanca	irregular	mucoide	moderado
b ₁₀	blanca	circular	mucoide	abundante

Los resultados obtenidos concuerdan con los de Palleroni y Holmes, mencionados por Castaño (1994), que afirman que ciertos grupos de bacterias, incluyendo *Pseudomonas fluorescens*, *Xanthomonas* y especies de *Erwinia*, se encuentran en densidades relativamente altas sobre el follaje. Miembros no patogénicos de estos grupos, han sido reconocidos como agentes potenciales de control biológico.

4.2 Prueba de supresión bacteriana, a la germinación de uredosporas de *Uromyces phaseoli*, in vitro.

Para la prueba de supresión bacteriana, a la germinación de uredosporas de *U. phaseoli*, se evaluaron 10 cepas bacterianas aisladas de hojas de frijol, más las bacterias *Bacillus cereus* (A-30), *Pseudomonas cepacia* y *Serratia marcescens* (R1), pertenecientes a la colección MIP-CATIE y que tienen antecedentes como antagonistas a hongos fitopatógenos, debido a su capacidad quitinolítica (González, 1995).

Con respecto a las lecturas de 3 y 6 h, se observó que el porcentaje de no germinación, para todas las bacterias fue muy alto, mayor del 90%, esto debido a que en este lapso de tiempo, una gran cantidad de uredosporas aún no iniciaban el proceso germinativo, a partir de las 9, 12 y 24h el porcentaje de control se mantuvo constante.

Esto indica que la evaluación se debe hacer a las 9h, de acuerdo con trabajos de Rey y Lozano (1961), que confirman, que la mayoría de uredosporas viables, pueden germinar y entrar en las hojas, en un período de 8-10h, bajo condiciones favorables de humedad.

El antagonismo o supresión de la germinación se debió, posiblemente, a mecanismos de competencia, parasitismo ó producción de antibióticos (Fravel, 1988).

El análisis de varianza, de los datos obtenidos, mostró que existieron diferencias altamente significativas ($p < 0.01$) entre tratamientos (cepas bacterianas), con respecto al testigo.

El testigo absoluto controló la germinación en un 5%. A continuación se muestran cuáles de los tratamientos resultaron comportarse estadísticamente, de manera similar al testigo químico (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentaje de supresión de la germinación de uredosporas de *U. phaseoli*, por suspensiones bacterianas, con respecto al testigo, a las 9h.

Cepa bacterial	% de Supresión	Diferencia entre promedios ($\alpha=0.01$)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	90.00	85.00 **
oxicarboxin	90.00	85.00 **
<i>Bacillus cereus</i> A-30	87.94	82.93 **
b4	84.83	79.82 **
b1	81.71	76.71 **
b9	81.14	76.14 **
<i>Serratia marcescens</i> R1	80.00	74.99 **
testigo absoluto	5.00	--

**= valores significativos al 0.01 de probabilidad, para una diferencia mínima de 10.58, según prueba de Dunnett.

En general todas las cepas bacterianas tuvieron un buen control sobre la germinación de uredosporas de *U. phaseoli*, ya que el menor porcentaje de supresión fue de 72.64%, pero la prueba de Dunnett al 1% de confianza, permitió utilizar únicamente los valores de supresión más altos.

Al analizar los porcentajes de control de la germinación de uredosporas, a las 9h, se observó que todos los tratamientos se comportaron de manera similar, en pruebas *in vitro*, (Fig. 1).

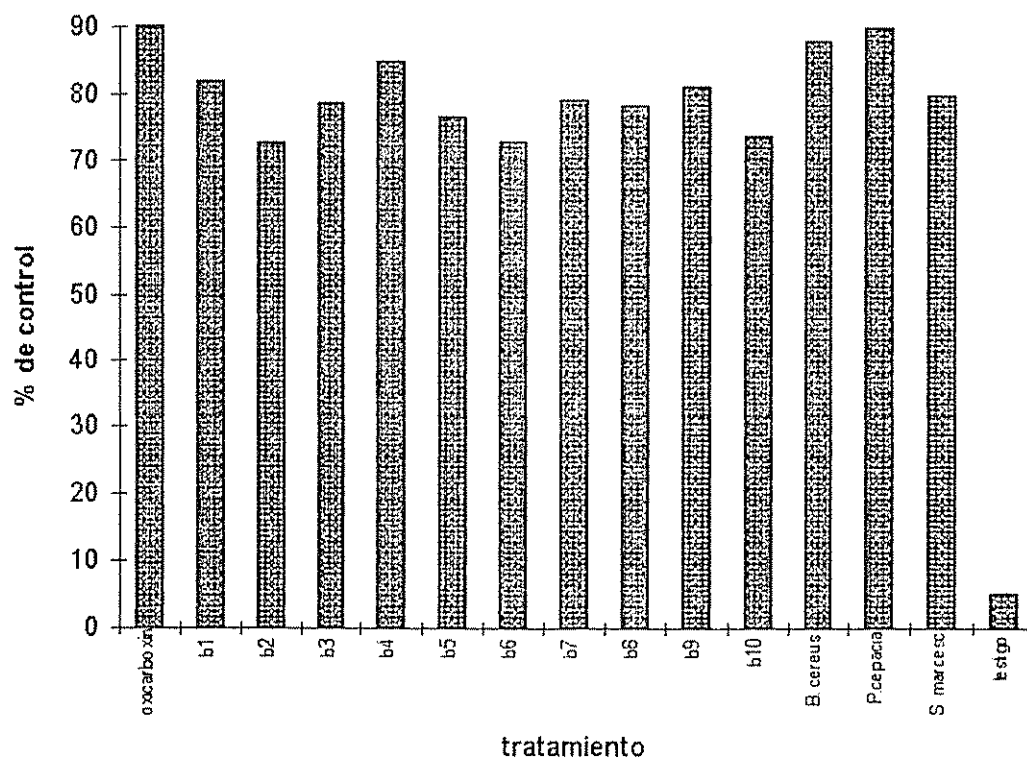


Figura 1. Efecto *in vitro*, de diferentes tratamientos, en el control biológico de la germinación de uredosporas de *U. phaseoli*, con respecto al testigo, a las 9h.

Estos resultados confirman que algunas bacterias como *Bacillus subtilis*, un antagonista a la roya del frijol, según Weller (1988), es capaz de inhibir *in vitro* a algunos otros patógenos de plantas, esto mediante la producción de antibióticos (Baker et al., 1985).

Bacillus thuringiensis, alarga el período de incubación y latencia de *Hemileia vastatrix*, en plantas de cafeto (Rivera, 1992).

4.3 Prueba de compatibilidad de bacterias antagónicas con fungicidas.

Para la prueba de compatibilidad, en este trabajo, se escogieron las bacterias *b₄*, y *Pseudomonas cepacia*, por su capacidad de supresión a la germinación de uredosporas de *U. phaseoli* (84.83% y 90% respectivamente) y las bacterias *Serratia marcescens* (R1) y *Bacillus cereus* (A-30), por su compatibilidad con diferentes fungicidas, según antecedentes y también por su capacidad de supresión (80% y 87.94% respectivamente).

Los fungicidas evaluados fueron los de uso común para controlar roya y mancha angular en frijol, siendo estos mancozeb (Dithane M-45), benomil (Benlate) y oxicarboxin (Plantvax), a concentraciones de 0, 10, 100 y 1000ppm (Cuadro 3).

Cuadro 3. Efecto de diferentes concentraciones de fungicidas, sobre el crecimiento promedio de cuatro cepas bacterianas. Turrialba, Costa Rica, 1996.

Fungicida	Concentración (ppm)	Crecimiento Bacterial (mm)			
		b4	<i>B.cereus</i> (A-30)	<i>P.cepacia</i>	<i>S.marcescens</i> (R1)
mancozeb	0	1.0	3.6	2.0	2.0
	10	1.0	3.6	1.6	2.0
	100	0.0	2.0	1.0	1.0
	1000	0.0	0.0	0.0	0.0
benomil	0	1.0	3.6	2.0	2.0
	10	1.0	2.6	1.6	1.6
	100	1.0	2.0	1.6	1.6
	1000	0.0	0.0	1.0	1.6
oxicarboxin	0	1.0	3.6	2.0	2.0
	10	1.0	3.0	1.0	1.3
	100	1.0	3.0	2.0	2.0
	1000	0.0	0.0	0.5	0.6

Los resultados mostraron que la bacteria b₄, es compatible con los fungicidas evaluados, pero crece muy poco sobre agar nutriente, por lo tanto, se decidió eliminarla de los tratamientos evaluados en el campo.

Pseudomonas cepacia y *Serratia marcescens* (R1), resultaron ser compatibles con los fungicidas evaluados en sus

diferentes concentraciones, excepto con el mancozeb a 1000ppm.

Bacillus cereus (A-30), mostró ser compatible con todos los fungicidas evaluados, hasta una concentración máxima de 100ppm, y todos lo afectaron en el crecimiento a 1000ppm.

P. cepacia es altamente compatible con fungicidas, especialmente benomil y oxicarboxin, comúnmente empleados contra mancha angular y roya respectivamente, y en pruebas *in vitro* ejerce un buen control a la germinación de uredosporas de *U. phaseoli* y conidias de *I. griseola*, convirtiéndola en un buen agente de control biológico para contrarrestar ambas enfermedades en un patosistema determinado.

Esto coincide con lo documentado por Corke y Rishbeth (1981) y González (1995), con respecto a la compatibilidad con diversos fungicidas.

Lo anterior podría considerarse para incorporar a los agentes biológicos, a los programas de manejo integrado de enfermedades. El MIP, pretende el máximo uso de enemigos naturales, incluyendo manejo del agua, agentes infecciosos, depredadores y parásitos, así como técnicas de modificación de habitats (Bottrell, 1979).

La incompatibilidad de los agentes biológicos, con el uso de plaguicidas regularmente usados en campo, es uno de los grandes problemas del MIP (Andrews y Kenerly, 1978).

Según trabajos realizados por Corke y Rishbeth (1981), los microorganismos epífitos pueden ser considerablemente más tolerantes a los químicos, que los patógenos y su uso puede ser compatible con estos. Esos datos coinciden con lo reportado por, González (1995 y 1996), que mediante pruebas *in vitro*, encontró que las bacterias *Bacillus cereus* (cepa A-30) y *Serratia marcescens* (cepa R1), fueron altamente compatibles con los fungicidas mancozeb, propiconazole, trimorf y benomil, evaluados a concentraciones de 0, 10, 100 y 1000ppm, demostrando así que la aplicación de fungicidas de uso común contra sigatoka negra (*Micosphaerella fijiensis*) en banano, se puede combinar con las aplicaciones de las bacterias mencionadas.

4.4 Prueba de supresión de la germinación de conidias de *Isariopsis griseola*, *in vitro*, a las 9h de exposición a suspensiones bacterianas.

En esta prueba se usaron aquellas bacterias que resultaron ser eficientes, para el control de la germinación de uredosporas de *U. phaseoli* y compatibles con fungicidas de uso común en cultivo del frijol. La elección también se basó en la pretensión de poder usar las mismas bacterias que mostraron un buen control a la germinación de uredosporas de

U. phaseoli y conidias de *I. griseola*, y que pueden ser usadas en el MIP, para el control de la roya y la mancha angular, ya que generalmente ambas enfermedades son limitantes a la producción del frijol en las mismas zonas ecológicas (Echandi, 1966).

Los resultados mostraron que el mejor tratamiento, en cuanto al control de la germinación de conidias de *I. griseola*, se logró con la bacteria *Pseudomonas cepacia*, la cual superó al control con el fungicida benomil, en un 5.3%, el cual fue el segundo en el control.

Las bacterias *Bacillus cereus* (A-30) y *Serratia marcescens* (R1), mostraron un control muy bajo y podrían utilizarse, ya sea a concentraciones más altas y con mayor número de aplicaciones, particularmente *B. cereus* (A-30). Además se consideró su compatibilidad con plaguicidas químicos.

La evaluación del control se realizó a las 3, 6, 9, 12 y 24h, mostrando el mismo patrón observado en el caso de *U. phaseoli*. Se tomó por lo tanto el control a las 9h, ya que las conidias provenientes de cultivos puros, son perfectamente viables y germinan satisfactoriamente a las 8h (Llanos, 1957).

Los resultados del análisis de varianza mostraron que existen diferencias altamente significativas, entre los tratamientos evaluados, mediante Dunnett al 1% (Cuadro4).

Cuadro 4. Resultados del porcentaje de control de la germinación, por efecto de diferentes cepas bacterianas, sobre conidios de *I. griseola*, a las 9h.

Cepa bacterial	% de supresión	diferencia entre promedios ($\alpha=0.01$)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	80.35	73.37 **
benomil	75.05	68.05 **
<i>Bacillus cereus</i> A-30	41.50	34.53 **
<i>Serratia marcescens</i> R1	28.05	21.08 ns
testigo absoluto	6.97	—

**= valores significativos al 0.01 de probabilidad, para una diferencia mínima de 31.98, según Dunnett.
ns= no significativo.

S. marcescens, no alcanza la diferencia mínima al 0.01 de probabilidad, pero si al 0.05, por lo tanto se decidió incluirla también por su compatibilidad con plaguicidas químicos.

En la figura 2 se muestra el efecto de los tratamientos sobre los conidios de *I. griseola*, con respecto al testigo. El mejor control sobre la germinación se ejerció por la bacteria *P. cepacia*, la cual superó al fungicida benomil, que fue el segundo en el control. Las bacterias *B. cereus* A-30 y *S. marcescens* R1, mostraron poco control, sobre la germinación de conidios de *I. griseola*.

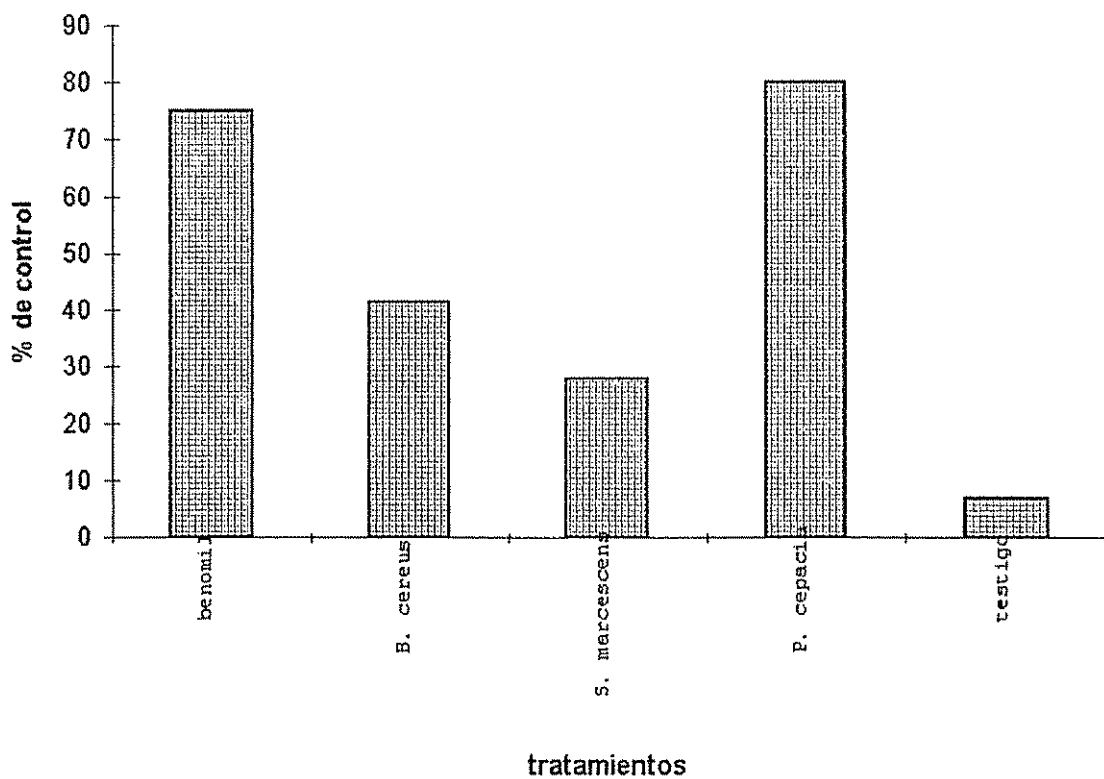


Figura 2. Efecto *in vitro*, de diferentes tratamientos, en el control biológico de la germinación de conidios de *I. griseola*, con relación al testigo, a las 9h.

4.5 Prueba de sustratos en invernadero.

Se evaluó la población de las bacterias *Bacillus cereus* (A-30), *Pseudomonas cepacia* y *Serratia marcescens* (R1), con los sustratos agua, melaza y leche, a las 24, 48 y 168h.

En cuanto a la viabilidad de las bacterias, los resultados mostraron que los tratamientos no son estadísticamente significativos. Por esta razón se decidió que en las pruebas posteriores se aplicarían en agua.

Según análisis de los resultados, se puede suponer que las hojas de frijol, vierten al exterior algunas sustancias que permiten la supervivencia de microorganismos epífitos, las cuales podrían ser comparables con las aplicaciones de los sustratos leche y melaza, a las concentraciones utilizadas. Estos datos, se pueden fundamentar, con los trabajos de Tukey, (1971), quien manifiesta que las plantas secretan en su superficie foliar compuestos con pequeñas cantidades de carbono y nitrógeno, que no logran soportar la carga bacterial en muchos sitios, explicando las bajas poblaciones microbiales en ellos.

Según Fokkema, (1981), el suplemento de sustratos exógenos para el mantenimiento de estos microorganismos, fomenta el incremento de las poblaciones, al actuar como nutrimentos estimulantes del crecimiento o como inductores de competencia entre microorganismos epífitos (El Ghaouth et al., 1995).

Los resultados no mostraron diferencias, probablemente, porque las concentraciones de aminoácidos (sustrato leche) y carbohidratos (sustrato melaza), fueron muy bajas, para los requerimientos de la población de microorganismos.

4.6 Experimento de invernadero

La aplicación de tratamientos se efectuó sobre plantas de 15 días de edad y 7 días después se les inoculó con los hongos *U. phaseoli* e *I. griseola*.

Para ambas enfermedades se contó el número de pústulas y lesiones foliares. Los resultados obtenidos a los 21 días de la inoculación, establecieron la diferenciación en grupos, según su capacidad de control (Cuadros 5 y 6).

Cuadro 5. Resultados de la prueba de Duncan (5%), para el número promedio de pústulas/planta, para el experimento con *U. phaseoli*.

Tratamiento	Prueba Duncan (5%)
t1 (<i>S. marcescens</i> R1)	28.25 ab *
t5 (testigo absoluto)	26.75 ab
t4 (<i>B. cereus</i> A-30)	10.50 abc
t6 (<i>P. cepacia</i>)	7.25 abc
t3 (fosfato)	7.25 abc
t7 (Javelin)	3.00 bc
t2 (oxicarboxin)	0.25 bc

* = Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes.

Cuadro 6. Resultados de la prueba de Duncan (5%), para el número promedio de lesiones/planta, para el experimento con *I. griseola*.

Tratamiento	Prueba Duncan (5%)
t5 (testigo absoluto)	24.25 a *
t7 (Javelin)	17.25 ab
t4 (<i>B. cereus</i> A-30)	15.75 ab
t6 (<i>P. cepacia</i>)	13.00 ab
t1 (<i>S. marcescens</i> R1)	12.00 ab
t3 (fosfato)	2.50 b
t2 (benomil)	0.00 b

* = Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes.

Los tratamientos t7, t4, t6 y t1, se comportaron estadísticamente de manera similar, y los cuales reflejan un mayor control del patógeno, que los del otro grupo.

El control de los patógenos, probablemente difiera mucho de las pruebas *in vitro*, porque una de las mayores limitantes del control biológico con bacterias, es el mantenimiento de las poblaciones de estas en el follaje de las plantas. Según Martín y Juniper, (1970), en esto influyen principalmente fenómenos físicos y químicos. En cuanto a los físicos, la humedad relativa en la superficie de la planta se menciona como el factor más importante.

Leben et al., (1965), mencionan que en trabajos realizados en árboles de manzano, las poblaciones bacteriales, después de aplicadas, disminuían en un 99%, a las 24h, como efecto de procesos de desecación. En invernadero no se forma rocío

nocturno sobre la superficie de las hojas, esto probablemente cause la muerte de gran parte de células bacterianas por desecación.

Otro factor, que puede haber influido en los resultados, es el tiempo en que las plantas se mantuvieron en cámara de rocío y algunos de los tratamientos, pudieron ser fácilmente lavados del follaje. Esto ocasionó un patrón errático, en el aparecimiento de lesiones, sumado a un mal funcionamiento del control de temperatura, en cámara de rocío.

4.7 Experimento de campo.

Para el experimento de campo, la inducción de las enfermedades se efectuó mediante la inoculación artificial de los patógenos *Isariopsis griseola* y *Uromyces phaseoli*, a los 21 días de la germinación.

Las plantas mostraron los síntomas típicos de la roya, a los 7 días y los de la mancha angular, a los 14 días después de la inculación. Para ambas enfermedades se reporta que el período de incubación es aproximadamente de 9 días (Campos, 1987).

Según Colhoun, (1973), el aparecimiento de los síntomas típicos para cada enfermedad es condicionado por el medio ambiente, el cual puede afectar el desarrollo de éstas en varias formas y las condiciones existentes antes de la

inoculación pueden influir significativamente sobre la susceptibilidad del hospedero. Factores tales como temperatura, luz, nutrición y humedad, pueden tener efectos predisponentes muy significativos (Shoeneweiss, 1975).

Ambas enfermedades se manifestaron cuantitativamente por medio de lesiones que pueden ser pústulas de roya y manchas foliares, dependiendo de los síntomas de la enfermedad respectiva, los cuales son fácilmente monitoreados (Kranz, 1994).

La primera aplicación de tratamientos se efectuó 7 días antes de la inoculación de los patógenos, con el objetivo de proteger al cultivo de las consecuentes infecciones artificiales y naturales.

La segunda aplicación de tratamientos, excepto el fosfato se realizó a los 36 días después de la germinación. Obsevándose posteriormente que ambas enfermedades incrementaban rápidamente, probablemente debido al lavado de los tratamientos comerciales y a la poca persistencia de los tratamientos biológicos sobre el follaje de las plantas.

Para todos los tratamientos involucrados en este trabajo, se evaluaron las curvas de progreso de las enfermedades estudiadas y se compararon las ABCPE, contra el área bajo la curva correspondiente al tratamiento con control químico

(oxicarboxin y benomil), de uso convencional en el cultivo del frijol.

Los resultados mostrados se obtuvieron de parcelas experimentales en donde se asumió que la presión de inóculo posterior a la inoculación artificial fue similar a todas las parcelas. El experimento se condujo bajo condiciones climáticas muy desfavorables al cultivo, en donde éstas, si favorecen mucho a los patógenos estudiados al grado de llegar a ser una limitante en la zona, para la producción del frijol (Echandi, 1966).

La comparación de curvas de progreso de la roya (Fig. 3) y sus correspondientes ABCPE (Cuadro 7), para cada tratamiento, no mostraron diferencias significativas al compararlas con el tratamiento a base de oxicarboxin usado como testigo (Anexo 7). Este dato concuerda con los resultados obtenidos de las pruebas *in vitro*.

Con respecto a las curvas de progreso para la mancha angular (Fig. 4) y sus correspondientes ABCPE (Cuadro 8), existieron diferencias significativas ($p < 0.05$) en la comparación entre tratamientos (Anexo 8), resultando más eficaz el tratamiento con benomil, seguido del tratamiento con *Bacillus thuringiensis* (Javelin), difiriendo con los resultados de las pruebas *in vitro*, probablemente por lavado de las bacterias, sobre las hojas del frijol y factores climáticos adversos.

Estadísticamente los resultados para las enfermedades estudiadas revelan que bajo las mismas condiciones, en el caso de la roya todos los tratamientos se comportaron de la misma manera que el tratamiento químico. No obstante, desde el punto de vista ambiental, los tratamientos con agentes biológicos, fueron más óptimos, tomando en cuenta que se comportaron de manera similar, con únicamente dos aplicaciones, hasta la etapa crítica o de floración. Con respecto a la mancha angular el fungicida benomil dió los mejores resultados, junto con el producto comercial Javelin (*Bacillus thuringiensis*).

El tratamiento a base de fosfato (10g/L), no dió los resultados deseados, probablemente porque la concentración empleada no es la suficiente para desencadenar el efecto de inducción de resistencia. Pero es notable que, para el caso de ambas enfermedades, una sola aplicación, en un solo folíolo, a los 15 días de la germinación, logró dar rendimientos similares a los demás tratamientos. El posible efecto, sugiere que para el caso, la planta utilizó el fosfato como fertilizante foliar (Reuveni et al., 1995).

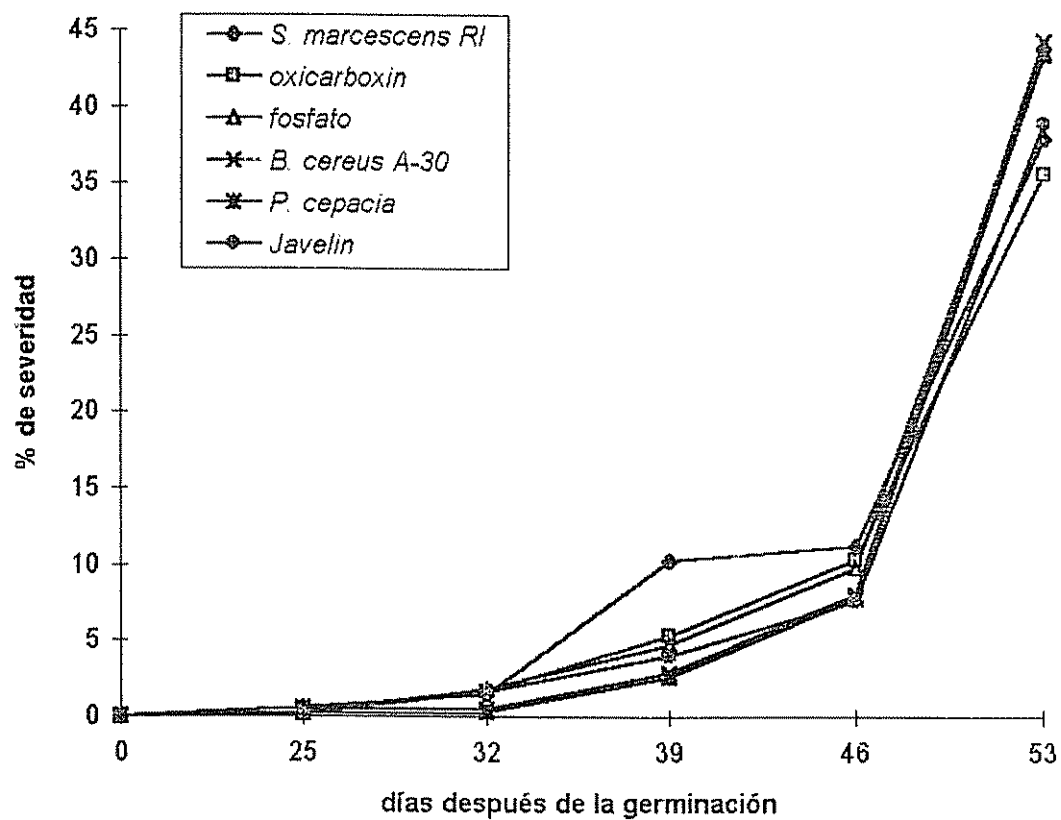


Figura 3. Curvas de progreso de la roya del frijol (*U. phaseoli*), con 6 tratamientos utilizados como control, en condiciones de campo.

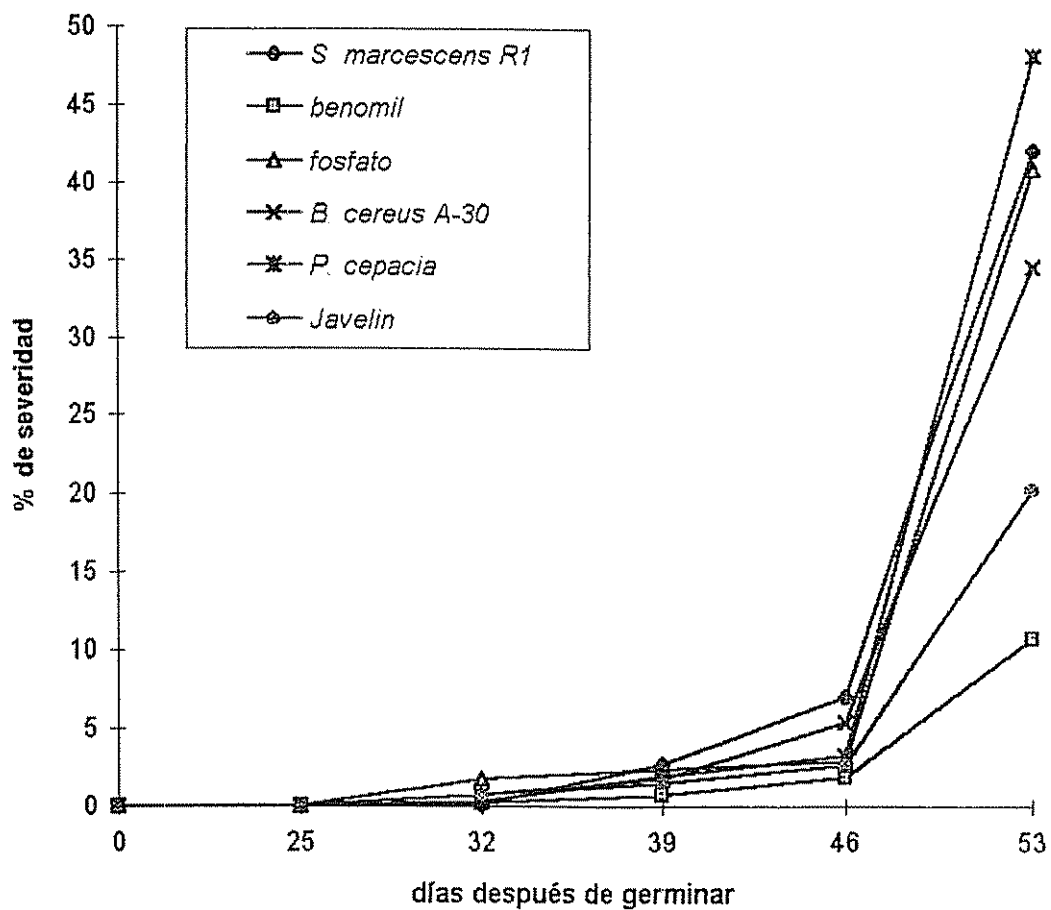


Figura 4. Curvas de progreso de la mancha angular del frijol (*I. griseola*), con 6 tratamientos, utilizados como control, en condiciones de campo.

Bacillus thuringiensis (Javelin), en el control de la roya, manifestó un efecto similar a los demás tratamientos, probablemente debido a que el efecto inductor de resistencia puede presentar un máximo y decaer en pocos días, con poco efecto sobre la enfermedad (Cristancho y Leguizamón, 1995).

Para el control de la mancha angular, el *Bt*(Javelin), resultó ser eficiente. Esto indica probablemente que el efecto adverso es mayor sobre deuteromicetes, que sobre basidiomicetes, a la concentración evaluada.

Con referencia a la aplicación de los fungicidas, esta fue subóptima para el oxicarboxin (2 aplicaciones), ya que se recomiendan aplicaciones semanales, debido a su naturaleza protectora, según la severidad de la enfermedad. El benomil dió mejor resultado contra la mancha angular, por su actividad sistémica más duradera. Cabe mencionar que si se hubieran hecho más aplicaciones de todos los tratamientos, las enfermedades, probablemente presentarían menores ABCPE, incrementando los rendimientos.

Los datos aportados por el experimento de campo, pueden ser muy variables o discutidos, lógicamente cada sistema de cultivo y zona geográfica con sus particularidades climáticas aportará, resultados diferentes.

El poco tiempo disponible para el seguimiento de las enfermedades, a través de diferentes ciclos del cultivo en el

año, fué una limitante para la obtención de mejores resultados.

Cuadro 7. Areas bajo la curva de progreso de la enfermedad, correspondientes al experimento de campo, con la roya del frijol (*U. phaseoli*).

Tratamiento	Repeticiones				ABCPE prom
	I	II	III	IV	
t1 (<i>S.marcescens</i> R1)	3.14	2.19	3.94	2.54	2.95 a*
t2 (oxicarboxin)	2.46	0.73	1.62	5.08	2.47 a
t3 (K_2HPO_4)	2.96	2.85	2.57	2.32	2.67 a
t4 (<i>B.cereus</i> A-30)	2.84	1.09	2.21	3.29	2.36 a
t5 (<i>P.cepacia</i>)	1.93	1.69	2.46	3.05	2.28 a
t6 (<i>Bt</i> , Javelin)	1.26	2.16	3.64	2.10	2.29 a

* = Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes.

Cuadro 8. Areas bajo la curva de progreso de la enfermedad, correspondientes al experimento de campo, con la mancha angular del frijol (*I. griseola*).

Tratamiento	Repeticiones				ABCPE prom.
	I	II	III	IV	
t1 (<i>S.marcescens</i> R1)	2.08	1.72	1.96	3.19	2.24 a*
t2 (benomil)	0.57	0.70	0.50	0.49	0.56 c
t3 (K_2HPO_4)	2.87	1.49	1.79	1.51	1.91 ab
t4 (<i>B.cereus</i> A-30)	0.62	2.42	1.01	2.96	1.75 ab
t5 (<i>P.cepacia</i>)	1.15	2.39	2.68	2.10	2.10 a
t6 (<i>Bt</i> , Javelin)	0.64	0.95	1.09	1.49	1.04 bc

* = Medias con la misma letra no son estadísticamente diferentes.

Con respecto a los resultados de rendimiento por parcela útil, en el caso de roya no mostraron diferencias entre tratamientos.

Cuando se comparó la severidad contra el rendimiento (Figura 5), se evidenció que aunque no hay diferencia estadística (Duncan 5%), las cepas bacterianas lo incrementaron ligeramente (Cuadro 9).

Cuadro 9. Rendimiento promedio, en g por parcela de frijol, afectado por roya, utilizando 6 tratamientos como control.

Tratamiento	Rendimiento promedio (g)
<i>S. marcescens</i> (R1)	399.17 a
oxicarboxin	372.62 a
fosfato	358.90 a
<i>B. cereus</i> (A-30)	324.22 a
<i>P. cepacia</i>	422.52 a
<i>Bt</i> (Javelín)	401.87 a

Los resultados de rendimiento, del experimento con mancha angular, revelaron resultados significativos (Duncan 5%), con respecto a los tratamientos (Cuadro 10), así mismo al comparar la severidad contra el rendimiento (Figura 6).

Cuadro 10. Rendimiento promedio, en g por parcela de frijol afectado por la mancha angular, utilizando 6 tratamientos como control.

Tratamiento	Rendimiento promedio (g)
<i>S. marcescens</i> (R1)	476.45 bc
benomil	601.95 a
fosfato	525.57 b
<i>B. cereus</i> (A-30)	527.20 b
<i>P. cepacia</i>	426.65 c
<i>Bt</i> (Javelin)	506.42 b

Los resultados mostraron que el benomil ejerció un buen control sobre la enfermedad, aumentando el rendimiento, probablemente debido a que mantuvo una menor ABCPE.

Se trató de ajustar un modelo de regresión, para las variables rendimiento y % de severidad, el cual resultó no ser significativo para el caso de roya. Con respecto a la mancha angular, el modelo presentó una $p > F = 0.0499$ y un $R^2 = 0.65$. La ecuación de regresión fue la siguiente:

Rendimiento = $618.49 - 3.28(\text{severidad})$, el que explica la relación de variables en un 65%, aceptable.

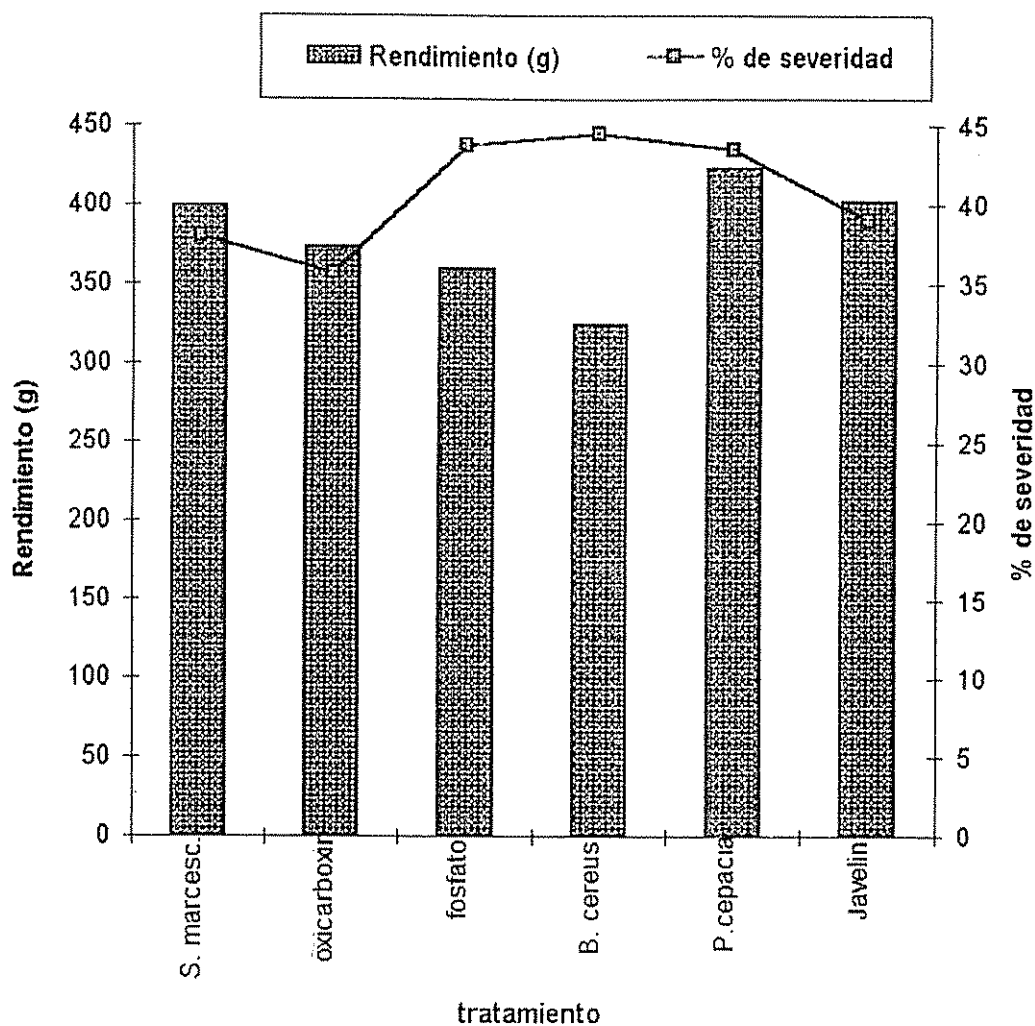


Figura 5. Comparación entre el porcentaje de severidad, vs. rendimiento, de parcelas de frijol afectadas por roya, con 6 tratamientos, utilizados como control.

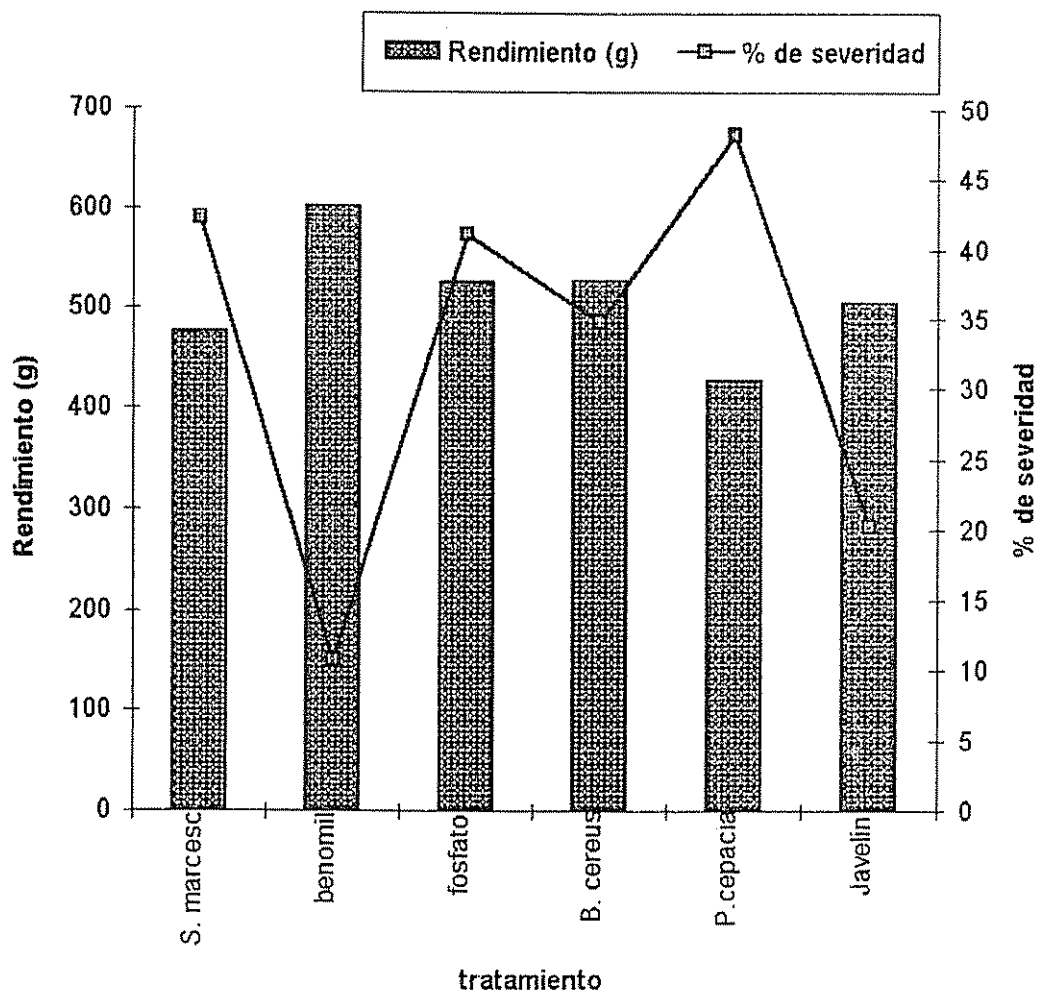


Figura 6. Comparación entre el porcentaje de severidad, vs. rendimiento, de parcelas de frijol afectadas por la mancha angular, con 6 tratamientos utilizados como control.

5. CONCLUSIONES

1. En las pruebas *in vitro*, con el objetivo de controlar la germinación de uredosporas de *U. phaseoli*, las bacterias evaluadas inhibieron el desarrollo de los tubos germinativos, en forma similar al tratamiento químico, en mas de un 72%, demostrando así su actividad antagónica.
2. En las pruebas *in vitro*, el control de la germinación de uredosporas de *U. phaseoli* y conidios de *I. griseola*, fue ligeramente superior con *Pseudomonas cepacia*, que con los fungicidas oxicarboxin y benomil respectivamente.
3. Las cepas de microorganismos utilizadas en pruebas *in vitro*, en invernadero y campo (*Bacillus cereus* A-30, *Serratia marcescens* R1 y *Pseudomonas cepacia*), son compatibles con los fungicidas benomil, mancozeb y oxicarboxin.
4. Los sustratos melaza y leche, asperjados con el objetivo de mantener las poblaciones de bacterias aplicadas sobre plantas de frijol en invernadero, no fueron estadísticamente diferentes al tratamiento con agua.

5. En el experimento de campo con *U. phaseoli*, los tratamientos con cepas bacterianas controlaron la enfermedad de manera similar a los tratamientos químicos.

6. En el experimento de campo con *I. griseola*, el mejor tratamiento fue el fungicida benomil, seguido de la formulación comercial de *Bacillus thuringiensis* (Javelin).

6. RECOMENDACIONES

1. Continuar con las pruebas de sustratos que permitan a los microorganismos antagónicos a patógenos, una mayor persistencia en el follaje.
2. Investigar sobre posibles formulaciones de bacterias, que muestren un buen potencial en el control biológico de patógenos, tal como *Pseudomonas cepacia*.
3. Evaluar diferentes dosis y formas de aplicación, de agentes inductores de resistencia a enfermedades (químicos y biológicos).
4. Determinar en pruebas de invernadero y campo, el efecto de antagonismo y de inducción de resistencia, principalmente con *S. marcescens* R1.
5. Repetir los experimentos de campo, en diferentes ciclos de cultivo por año, para validar los resultados obtenidos.
6. Evaluar la compatibilidad de los microorganismos, con fungicidas de uso común, en pruebas de campo, como práctica a incluir en los programas de manejo integrado de enfermedades.

7. LITERATURA CITADA

- ALFARO, R. 1983. El cultivo del frijol. Editorial CAFESA. San José, Costa Rica. p. 9-10.
- BAKER, C.J.; STAVELY, J.R. 1985. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. Plant Disease. 69:770-772.
- BRODIE, I.D.S.; BLAKEMAN, J.P. 1975. Competition for carbon compounds by a leaf surface bacterium and conidia of *Botrytis cinerea*. Physiol. Plant Pathol. 6:125-135.
- BURRAGE, S.W. 1971. The micro-climate at the leaf surface. In Ecology of Leaf Surface Micro-organisms. T.F. Preece and C.H. Dickinson, eds. Academic Press. London. p.91-101.
- CAMACHO, L.H. 1973. Los problemas de producción y potencialidad del frijol *Phaseolus vulgaris* en el tropico bajo. In Seminario sobre El potencial del frijol y de otras leguminosas de grano comestible en América Latina (26 Feb- 1 Marzo de 1973). Cali, Colombia, p. 95-98.
- CAMPOS, J.; FUCIKOVSKY, L. 1980. Estudio de algunas características de *Isariopsis griseola* Sacc., agente causal de la mancha angular del frijol. Agrociencia. 39:41-48.
- CAMPOS AVILA, J. 1987. Enfermedades del frijol. (1a. Reimp. 1991). Editorial Trillas. México. p. 21-30.
- CASTAÑO ZAPATA, J. 1989. Estandarización de la estimación de daños causados por hongos, bacterias y nematodos en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Fitopatología Colombiana 4:9-19.
13(1):

- CASTAÑO, J.; ALLEN, D. 1985. Resistencia inducida en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) contra roya (*Uromyces phaseoli* (Reben.) Wint.), con un aislamiento avirulento de *U. phaseoli* o de *Hemileia vastatrix* Berk, & Br. Ceiba, Honduras. Vol. (26):215-235.
- CENTURION, M.; KIMATI, H. 1994. Selección e identificación de microorganismos antagónicos a la roya del frijol (*Uromyces phaseoli*). Summa Phytopathologica. (Brasil). 20(3-4):174-178.
- CENTURION, M.; KIMATI, H. 1994. Controle biológico da ferrugem do feijoeiro com bactérias antagônicas. Summa Phytopathologica. (Brasil). 20(3-4):179-183.
- CIAT. 1980. Catálogo descriptivo del germoplasma de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Unidad de Recursos Genéticos. Cali, Colombia. p.215.
- CIAT. 1980. problemas de producción del frijol. Enfermedades, insectos, limitaciones edáficas y climáticas de *Phaseolus vulgaris*. Eds. Howard F. Schwartz y Guillermo E. Gálvez. Trad. Stellia S. de Salcedo. Cali, Colombia. p.3-12, 19-36, 57-64.
- CIAT. 1978. Problemas de campo en los cultivos de frijol en América Latina. Eds. H.F. Schwartz, G.E. Gálvez, A. van Schoonhoven, R.H. Howeler, P.H. Graham y C. Flor. Cali, Colombia. P.22, 38, 42.
- COLHOUN, J. 1973. Effects of environmental factors on plant diseases. Annual Review of Phytopathology 11: 343-364.
- CORKE, A.T.K.; RISHBETH, J. 1981. Use of microorganisms to control plant diseases. In Microbial Control of Pest and Plant Diseases 1970-1980. H.D. Burges, ed. Academic Press. New York. P.717-736.
- CRISTANCHO, M.A.A.; LEGUIZAMON, J.E.C. 1995. Efecto protector de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, en plantas de café contra el desarrollo de *Hemileia vastatrix* Berk. y Br. Cenicafé (Colombia) 46(3):140-151.

- DHINGRA, O.D.; SINCLAIR, J.B. 1985. Basic plant pathology methods. CRC Press. 2a. ed. Boca Raton, Florida. P. 119-178.
- DIAZ, C.; De ARMAS, E.; BARRIOS, A. 1965. La mancha angular de la caraota producida por *Isariopsis griseola* Sacc., en la cuenca del lago de Valencia. *Agronomía Tropical*. (Venezuela). 14(4):261-275.
- ECHANDI, E. 1966. Principales enfermedades del frijol observadas en diferentes zonas ecológicas de Costa Rica. *Turrialba* 16(4):359-363.
- FAO. 1985. Manual para patólogos vegetales. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. 2a. ed. Commonwealth Agricultural Bureaux. Great Britain. 438p.
- FOKKEMA, N.J. 1981. Fungal leaf saprophytes beneficial or detrimental. *In* *Microbial Ecology of the Phylloplane*. J.P. Blakeman, de. Academic Press. London. p.433-453.
- FOKKEMA, N.J. 1991. Biological control en aerial plant surfaces. *In* *The Biological control of plant Diseases*. Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region. Taiwan, China. p.41-47.
- FRAVEL, D.R. 1988. Role of antibiosis in the biocontrol of plant diseases. *Annual Review of Phytopathology* 26:75-91.
- GONZALEZ, R. 1995. Efecto de microorganismos quitinolíticos en el desarrollo de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Tesis Mag.Sc. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 97p.
- GONZALEZ, R.; BUSTAMANTE, E.; SHANNON, P.; OKUMOTO, S.; LEANDRO, G. 1996. Selección de microorganismos quitinolíticos en el control de sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 40:6-11.

- HAGEDORN, D.J.; WADE, E.K. 1974. Bean rust and angular leaf spot in Wisconsin. *Plant Disease Reporter* 58(4):330-332.
- HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. 1995. Induced resistance to disease in plants. Kluwer Academic Publisher. The Netherlands. 183p.
- INFANTE, M.A.; SCOBIE, G.M.; GUTIERREZ, U.P. 1974. producción y consumo de frijol seco y su contribución a la oferta de proteína a nivel mundial. Programa de Economía Agrícola, CIAT. Cali, Colombia. *In* XX Reunión Annual del PCCMCA. San Pedro Sula, Honduras.
- KESSMANN, H.; STAUB, T.; HOFMANN, C.; MAETZKE, T.; HERZOG, J. 1994. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32:439-459.
- KRANZ, J. 1994. La epidemiología en el contexto del control integrado de plagas. *In* Vigilancia y pronósticos en la protección vegetal. Eds. J. Kranz, J. Theunissen y S.B. Raterink. ZEL. Feldafing, Alemania. P. 14-23.
- KUC, J. 1982. Induced immunity to plant disease. *Bio Science* 32(11):854-860.
- KUC, J.; STROBEL, N.E. 1992. Induced resistance using pathogens and nonpathogens. *In* Biological Control of Plant Diseases. De. E.S. Tjamos. Plenum Press. New York. U.S.A. p.295-303.
- LARIOS, F.J.; RIVERA FAGUNDO, E. 1979. Una serie de claves ilustradas para la evaluación de daño por enfermedades en frijol. Universidad de El Salvador, Facultad de Ciencias Agronómicas, Depto. de Parasitología Vegetal. San Salvador, El Salvador. 23p.
- LEBEN, C.; DAFT, G.C.; WILSON, J.D.; WINTER, H.F. 1965. Field tests for disease control by an epiphytic bacterium. *Phytopathology* 55:1375-1376.

- LLANOS, C. 1957. Patogenicidad del *Isariopsis griseola* Sacc., en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.). Acta Agronómica Vol. VII(2):165-190.
- MARTIN, J.T.; JUNIPER, B.E. 1970. The cuticles of plants. Edward Arnold. London. 347p.
- MORENO, R.A. 1977. Efecto de diferentes sistemas de cultivo sobre severidad de la mancha angular del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), causada por *Isariopsis griseola* Sacc. Agron. Costa Rica. 1:39-42.
- MUCHARROMAH, E.; KUC, J. 1991. Oxalate and phosphates induce systemic resistance against diseases caused by fungi, bacteria and viruses in cucumber. Crop Protection 10:265-270.
- OLAVE, C.A. 1958. Resistencia de algunas variedades y líneas de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), al *Isariopsis griseola* Sacc. Acta Agronómica Vol.VIII(4):197-219.
- PASTOR CORRALES, M.A.; CASTELLANOS, G. s.f. Guía para el manejo del hongo *Phaeoisariopsis griseola* en el laboratorio. Programa de Fríjol, Sección de Fitopatología, CIAT. Cali, Colombia. 11p.
- RAHE, J.E.; KUC, J.; CHUANG, C.M.; WILLIAMS, E.B. 1969. Induced resistance in *Phaseolus vulgaris* to bean anthracnose. Phytopathology 59:1641-1645.
- REUVENI, M.; AGAPOV, V.; REUVENI, R. 1993. Induction of systemic resistance to powdery mildew and growth increase in cucumber by phosphates. Biological Agriculture and Agriculture 9(4):305-315.
- REUVENI, R.; AGAPOV, V.; REUVENI, M. 1994. Foliar spray of phosphates induces growth increase and systemic resistance to *Puccinia sorghi* in maize. Plant Pathology 43:245-250.

- REUVENI, M.; AGAPOV, V.; REUVENI, R. 1995. Suppression of cucumber powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea*) by foliar sprays of phosphate and potassium salts. *Plant Pathology* 44:31-39.
- REY, J.V.; LOZANO T.J.C. 1961. Estudios fisiológicos de la roya del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), causada por el *Uromyces phaseoli* var. *Typica* Arth. *Acta Agronómica* XI(3-4): 147-185.
- RIVAS PLATERO, G.G. 1996. Descripción matemática de epidemias. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 40:35-39.
- RIVERA, J.A. 1992. Interferencia de *Bacillus Thuringiensis* y quitina en el sistema café- *Hemileia vastatrix* Berk y Br. Tesis Mag. Sc. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 60p.
- RUIZ SILVERA, C.A. 1995. Efecto de sustratos sobre bacterias antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis* en banano. Tesis Mag. Sc. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. 115p.
- SANDERS, J.H.; ALVAREZ, P.C. 1978. Evaluación de la producción de frijol en América Latina durante la última década. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia.
- SHOENEWEISS, D.F. 1975. Predisposition stress and plant disease. *Annual Review of Phytopathology* 13: 193-211.
- SPURR, H.W. 1978. Field control of two foliar diseases by a bacterial antagonist. *Phytopathology News* 12:74. (Abstr.).
- TAMAYO, P.J. 1995. Manejo y control de las enfermedades del frijol voluble (*Phaseolus vulgaris* L.). Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria. Boletín técnico. Regional No.4. Centro de Investigación "La Selva". Rionegro, Antioquía. Colombia. 39p.

- TAPIA, H.;CAMACHO, A. 1988. Manejo integrado de la producción de frijol basado en labranza cero. Centro nacional de Protección Vegetal/ GTZ. Managua, Nicaragua. 181p.
- TUKEY, H.B. 1971. Leaching of substances from plants. *In* Ecology of Leaf Surface Microorganisms. T.F. Preece and C.H. Dickinson, eds. Academic Press. London. p.67-80.
- TUZUN, S.; KUC, J. 1991. Plant immunization: an alternative to pesticides for control of plant diseases in the greenhouse and field. *In* The Biological Control of Plant Disease, Food and Fertilizer Technology Center for the Asia and Pacific Region. Taiwan, China. p.30-40.
- VOYSEST, O. 1983. Variedades de frijol en América Latina y su origen. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. P.1.
- WICKS, T.J.; MAGAREY, P.A.; WACHTEL, M.F.; FRENHAM, A.B. 1991. Effect of postinfection application of phosphorus (Phosphonic) acid on the incidence and sporulation of *Plasmopara viticola* on grapevine. Plant Disease 75(1):40-43.

8 . ANEXOS

Anexo 1. Preparación de medio V8.

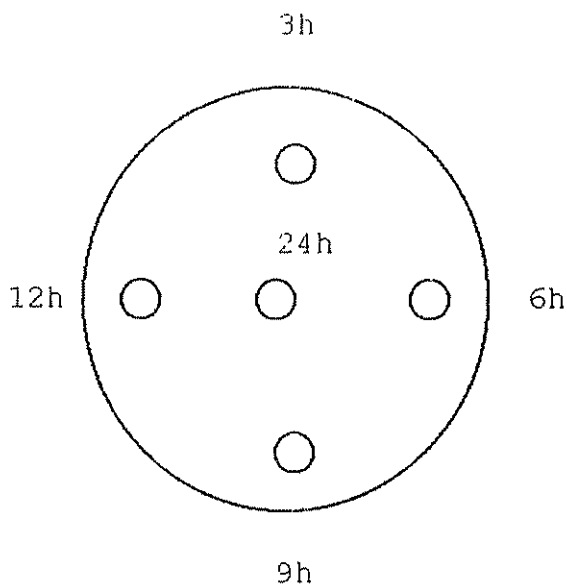
Agua destilada	1,200 ml
Agar	30 g
Carbonato de calcio (CaCO ₃)	4.5 g
1 lata de jugo V8	340 ml
Volumen total	1,540 ml

Cantidad de medio estimada para aproximadamente 60 platos Petri.

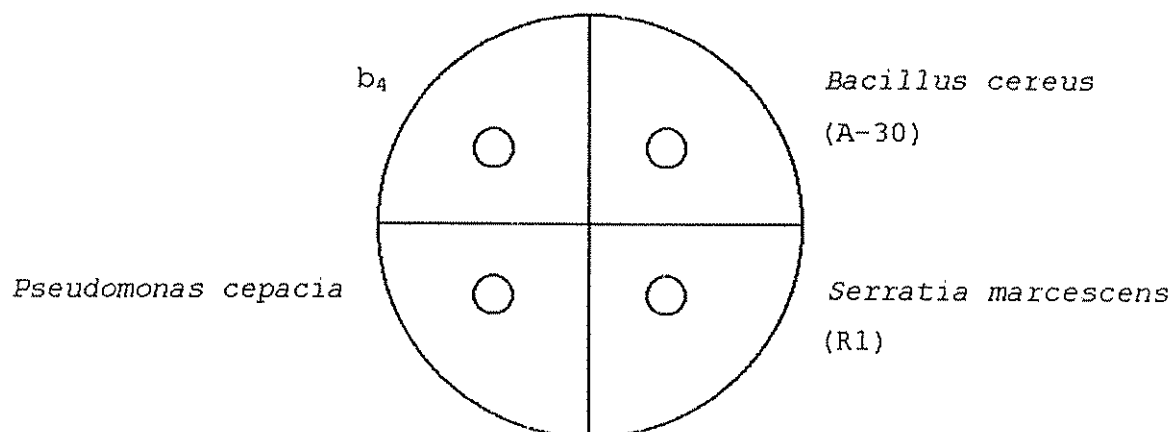
Preparación

Al agua destilada, se le agrega el agar y se calienta para que este se disuelva, se le agrega el jugo V8 y por último se deposita el CaCO₃, se agita bien ya que precipita fácilmente, se envasa en erlenmeyers y se esteriliza en autoclave a 15lb de presión y 121C, por 15min (Pastor y Castellanos, s.f.).

Anexo 2. Esquema para la prueba de supresión bacteriana, a la germinación de uredosporas de *U. phaseoli* y conidios de *I. griseola*.



Anexo 3. Prueba de compatibilidad de bacterias con fungicidas.



Anexo 4. Preparación de los sustratos leche y melaza.

Para preparar el sustrato leche se mezclan 20g de leche íntegra en polvo (26g de proteínas/100g), con 100ml, de leche descremada (8.3g de proteínas/250ml) y con diluciones se ajusta a 40mg de proteínas/L de solución, aproximadamente.

La melaza (50% de carbohidratos), se prepara con 0.125g/L de solución, ajustando a 60mg de aminoácidos o proteínas/L de solución.

La leche se usa a una concentración aproximada de 40mg de aminoácidos o proteínas/L y la melaza a 60mg de carbohidratos/L de solución (Ruiz, 1995).

Anexo 5. Plano de campo correspondiente a experimento con *Uromyces phaseoli*.



t5	t2	t4	t6	t3	t1
----	----	----	----	----	----

t1	t2	t3	t4	t6	t5
----	----	----	----	----	----

t6	t1	t2	t4	t5	t3
----	----	----	----	----	----

t4	t5	t2	t3	t1	t6
----	----	----	----	----	----

Anexo 6. Plano de campo correspondiente a experimento con *Isariopsis griseola*.



t2	t5	t3	t6	t4	t1
----	----	----	----	----	----

t5	t3	t1	t4	t2	t6
----	----	----	----	----	----

t3	t4	t1	t2	t6	t5
----	----	----	----	----	----

t2	t5	t4	t6	t3	t1
----	----	----	----	----	----

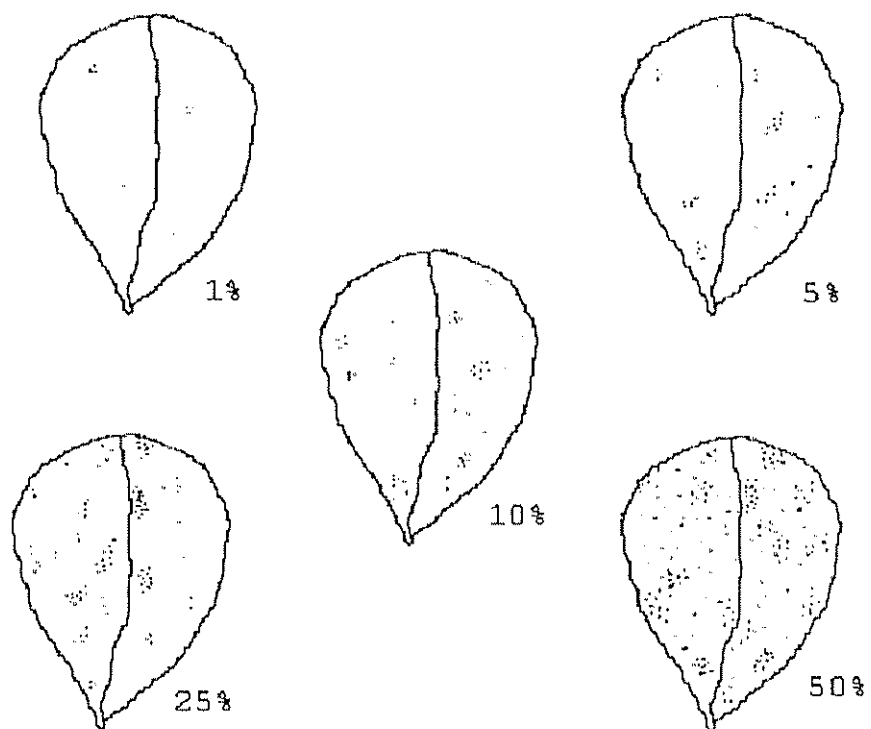
Anexo 7. Análisis de varianza correspondiente a las ABCPE de 6 tratamientos, en el control de la roya del frijol.

F. de V.	gl	SC	CM	F _c
Bloques	3	5 344	1 781	1 91 ns
Tratamientos	5	1 390	0 278	2 90 ns
Error	15	13 991		
total	23	20 726		

Anexo 8. Análisis de varianza correspondiente a las ABCPE de 6 tratamientos, en el control de la mancha angular del frijol.

F. de V.	gl	SC	CM	F _c
Bloques	3	1 283	0 427	0 95 ns
Tratamientos	5	8 565	1 713	3 82*
Error	15	6 726		
Total	23	16 574		

Anexo 9. Escala diagramática para porcentaje de área foliar afectada por roya (*U. phaseoli*).



Anexo 10. Escala diagramática para porcentaje de área foliar afectada por mancha angular (*I. griseola*).

