

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

**EVALUACIÓN DE HONGOS ENDOFÍTICOS Y EXTRACTOS
BOTÁNICOS PARA EL CONTROL DE LA SIGATOKA
NEGRA (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) EN BANANO**

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

Magister Scientiae en Agricultura Ecológica

Por

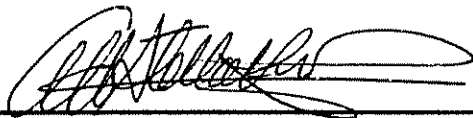
Gina Paola Osorio Salamanca

Turrialba, Costa Rica, 2006

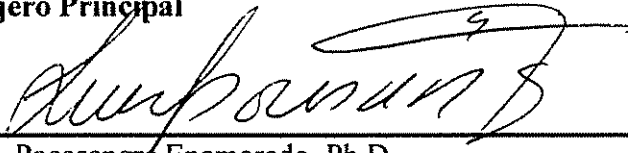
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y la Escuela de Posgrado del CATIE, y aprobada por el Comité Consejero del estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

Magister Scientiae en Agricultura Ecológica

FIRMANTES:



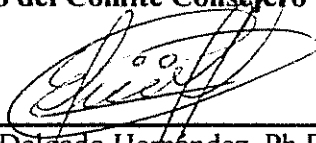
Alba Stella Riveros Angarita, Ph.D.
Consejero Principal



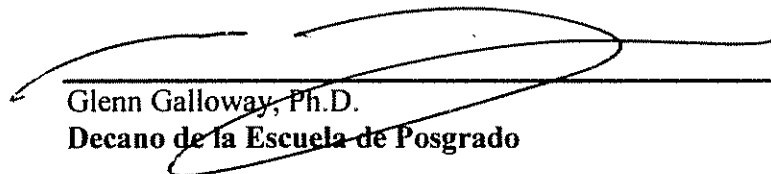
Luis E. Pocasangre Enamorado, Ph.D.
Miembro del Comité Consejero



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



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



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



Gina Paola Osorio Salamanca.
Candidato

DEDICATORIA

A Dios que me dio el don de la sabiduría, el entendimiento para culminar mis estudios de maestría y la fortaleza para enfrentar cada día.

A mis padres por su respaldo, dedicación y comprensión, en especial a mi madre por su lucha y entrega. A mis hermanos por todo su apoyo, esfuerzo y confianza. A mis amigos quienes siempre estuvieron a mi lado para compartir mis sueños y hacerlos realidad.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Alba Stella Riveros, por su sincera confianza, dedicación y guía permanente en el desarrollo de la presente investigación.

A los doctores Franklin E. Rosales, Luis E. Pocasangre y Eduardo Delgado, por su apoyo, sus valiosos conocimientos, enseñanzas y sugerencias como jurados.

Al M.Sc. Gustavo López, M.Sc. Fabio Blanco y Ph.D. Fernando Casanoves, quienes me colaboraron en la estadística durante todo el proceso de este trabajo.

A FONTAGRO/BID/INIBAP/CATIE por el apoyo económico a esta investigación, dentro del marco del proyecto Desarrollo y Uso de Bioproductos para el control de Nematodos y Sigatoka negra en banano y plátano, para América Latina y el caribe.

A M.Sc. Elizabeth Murillo Perea y Ph.D. Carlos Antonio Rivera, por sus enseñanzas y el gran impulso que me brindaron incondicionalmente para llevar a cabo mis objetivos personales y académicos.

A Frank López y Carlos en el laboratorio de nutrición del CATIE, debo agradecer por su gran amistad, los muchos momentos compartidos y el apoyo en la parte química.

A todo el personal de la Biblioteca Orton, particularmente a Javier, Rigo y Juan , por su atención, cooperación y apoyo.

A mis amigos del CATIE, en especial Blanca, Julia, Carmen, Edwin, Miguel, Sergio que siempre estuvieron a mi lado en momentos de felicidad y en aquellas circunstancias en que se necesita alguien especial que te brinde apoyo y comprensión, así que sin ustedes nada hubiese sido igual.

Deseo expresar de todo corazón mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que me brindaron su colaboración, sus conocimientos, su amistad y la ayuda incondicional durante la elaboración de esta investigación.

BIOGRAFÍA

El autor nació en Ibagué, Colombia, el 13 de febrero de 1981. Se graduó en la Universidad del Tolima en 2003, Facultad de Ciencias de la Educación, en la Licenciatura Biología y Química. Posee una Especialización en Química de Productos Naturales de la misma universidad, en donde trabajo como asistente de Investigación en el Laboratorio de Química Orgánica. En el 2005 inicio sus estudios de M.Sc. en Agricultura Ecológica en el CATIE. En este periodo de maestría, ha tenido la oportunidad de brindar entrenamiento a investigadores provenientes de México y Panamá, en el campo de uso de bioproductos en Musáceas. Se considera una investigadora con enfoque decidido hacia las tecnologías limpias y el desarrollo de nuevas moléculas para reducir la dependencia del uso de agroquímicos en el control de enfermedades y plagas en cultivos agroforestales de importancia económica.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
BIOGRAFÍA.....	VI
CONTENIDO.....	VII
RESUMEN.....	X
SUMMARY.....	XII
ÍNDICE DE CUADROS.....	XIV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XV
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivos del estudio.....	2
1.1.1 Objetivo General.....	2
1.1.2 Objetivos específicos.....	2
1.2 Hipótesis del estudio.....	3
2 Marco conceptual.....	4
2.1 Aspectos generales del cultivo.....	4
2.1.1 Origen y Taxonomía del banano.....	4
2.2 Sigatoka negra.....	4
2.2.1 Métodos para evaluar la enfermedad.....	6
2.2.2 Control de la Enfermedad.....	7
2.3 Productos Naturales.....	9
2.3.1 Actividad antimicrobial e inducción de resistencia en plantas con el uso de extractos botánicos.....	10
2.4 Hongos Endofíticos.....	13
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1 Descripción del área experimental.....	17
3.2 Materiales.....	17
3.2.1 Material de siembra.....	17
3.2.2 Hongos Endofíticos (HE) biocontroladores.....	17
3.2.3 Extractos botánicos.....	18
3.3 Métodos.....	18
3.3.1 Preparación de extractos botánicos.....	18
3.3.2 Preparación de la suspensión de esporas.....	18
3.3.3 Preparación de las semillas e inoculación de las plantas con hongos endofíticos.....	19
3.3.4 Preparación del terreno y labores agrícolas.....	19
3.3.5 Evaluación de la Sigatoka negra.....	20
3.3.6 Variables fenológicas y de producción para los experimentos.....	21

3.3.7	Identificación de metabolitos secundarios mayoritarios de los extractos botánicos mediante el análisis fitoquímico.....	21
3.4	Descripción de los tratamientos.....	22
3.5	Diseño Estadístico.....	24
3.5.1	Análisis Estadístico.....	25
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	26
4.1	Evaluación en campo de la protección o inducción de resistencia de los hongos endofíticos sobre la incidencia y severidad de la Sigatoka negra.....	26
4.2	Evaluación de la protección o inducción de resistencia, mediante la aplicación foliar de dos extractos botánicos “promisorios” sobre la incidencia y la severidad de la Sigatoka negra en condiciones de campo.	30
4.3	Evaluación del efecto de interacción de los bioproductos (hongos endofíticos y extractos botánicos) sobre la incidencia y severidad de la Sigatoka negra en el campo.	36
4.4	Evaluación de algunas de las variables fenológicas para el análisis de Sigatoka negra.	45
4.5	Análisis fitoquímico de los extractos botánicos mediante el empleo de deferentes solventes extractores, para la identificación de metabolitos secundarios mayoritarios.....	48
5	Conclusiones.....	55
6	RECOMENDACIONES.....	56
7	BIBLIOGRAFÍA.....	57
	Anexo 1: Ilustra diferentes tipos de escalas; A. Desarrollo de la hoja candela según Brun (1963). B. Escala de síntomas en porcentajes, de acuerdo a Stover modificada por Gauhl (1989).....	63
	Anexo 2: Estadios de desarrollo de la Sigatoka negra de acuerdo a la escala de síntomas descritos por Fouré 1985. (a) Estado de desarrollo 1 y 2; (b) Estado de desarrollo 3; (c) Estado de desarrollo 4 y 5; (d) Estado de desarrollo 6.	64
	Anexo 3: Principales rutas biosintéticas que dan lugar a la formación de metabolitos secundarios (Adaptado desde Gil 2002).	65
	Anexo 4: Protocolo para la preparación y aplicación de bioproductos de origen vegetal para el manejo de la Sigatoka negra a escala semicomercial	66
	Anexo 5: Protocolo para la determinación de sólidos totales en una muestra y dosis de aplicación en campo.....	67
	Anexo 6: Preparación de la suspensión de esporas	68
	Anexo 7: Preparación de las semillas e inoculación de las plantas con hongos endofíticos	68
	Anexo 8: Análisis de varianza para la variable Ritmo de Emisión Foliar (REF).....	69
	Anexo 9: Análisis de varianza para la variable Estado de Evolución de la enfermedad (EE), expresado en Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE).....	69

Anexo 10: Análisis de varianza para la variable Índice de Infección (IND), expresado en Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE).....	69
Anexo 11: Análisis de varianza para la variable Total de Hojas (TH).....	70
Anexo 12: Análisis de varianza para la variable Hoja Más joven Enferma (HMJE).....	70
Anexo 13: Análisis de varianza para la variable Total de Hojas a Floración (THF).....	70
Anexo 14: Análisis de varianza para la variable Hoja Más joven Enferma a Floración (HMJEF).....	71
Anexo 15: Análisis de varianza para la variable Índice de Infección a Floración (INDF) ...	71
Anexo 16: Análisis de varianza para la variable Días de siembra a Floración (DSF).....	71
Anexo 17: Análisis de varianza para la variable Altura de la Planta a Floración (APF)	72
Anexo 18: Análisis de varianza para la variable Circunferencia del Pseudotallo a Floración (CSF).....	72

OSORIO SALAMANCA, GINA PAOLA. 2006. EVALUACIÓN DE HONGOS ENDOFÍTICOS Y EXTRACTOS BOTÁNICOS PARA EL CONTROL DE SIGATOKA NEGRA (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) EN BANANO.

Palabras clave: hongos endofíticos, *Trichoderma atroviride*, bioproductos, extractos botánicos, metabolitos secundarios, protección de plantas, *Sigatoka negra*, *Musa*, banano, inducción de resistencia, *Mycosphaerella fijiensis*.

RESUMEN

La Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) ocasiona enormes pérdidas en la producción de banano. El uso de fungicidas ha sido el control más eficiente de esta enfermedad foliar. El desarrollo de estrategias innovadoras dirigidas a disminuir la dependencia del control químico convencional, es un desafío permanente, en una agricultura sostenible y respetuosa del ambiente. El objetivo de esta investigación fue evaluar hongos endofíticos mutualistas y extractos botánicos para el control de la Sigatoka negra en campo. Se utilizaron cormos y vitroplantas de banano (cv. Gran Enano), inoculados con cepas de *Trichoderma atroviride* (E1 y E2) separadamente. Estos materiales fueron plantados en bolsas y aclimatados por tres meses antes de ser sembrados en campo, bajo un diseño de bloques completamente al azar en parcelas divididas. Las aplicaciones foliares de los extractos botánicos, *Momordica charantia* (B1) y *Senna reticulata* (B2) se iniciaron a los 6 meses después de la siembra en campo. Se evaluó la incidencia y severidad de la Sigatoka negra empleando las escalas de Fouré (1985) y Gauhl (1989), siguiendo metodología de Marín y Romero (1998). Durante todo el periodo vegetativo se registraron las siguientes variables: Estado de Evolución (EE), Ritmo de Emisión Foliar (REF), Total de Hojas (TH), Hoja Más Joven Enferma (HMJE) e Índice de Infección (IND). A floración, se registro una sola lectura para las variables THF, HMJEF e INDF, además de las variables fenológicas: Días de Siembra a Floración (DSF), Altura de la Planta a Floración (APF) y Circunferencia del Pseudotallo a Floración (CSF). Paralelamente se efectuaron análisis fitoquímicos de B1 y B2, para determinar metabolitos secundarios mayoritarios. Se realizó ANAVA y una prueba de

Duncan empleando el sistema SAS. Se calculó el Área Bajo la Curva de Progreso de la Enfermedad (ABCPE) expresada en las variables EE e IND. Los resultados a nivel radical revelan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) para las variables EE e IND, sobresaliendo E2 después de Q, con valores bajos frente al resto de tratamientos. No obstante, no se evidenciaron efectos positivos sobre el resto de variables analizadas. A nivel foliar, se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) favoreciendo al B2 con una menor ABCPE para EE y un menor porcentaje de infección con IND. Sin embargo, el químico (clorotalonil) fue el tratamiento más efectivo para el control. Comparando los tipos de materiales de siembra (semillas), las vitroplantas mostraron el mejor comportamiento con respecto a severidad, TH, DSF y APF. Se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) para algunas interacciones, sobresaliendo las variables TH, HMJE en la relación trifactorial: semillas con tratamiento radical y el químico a nivel foliar; en este caso la interacción semilla con nematicida y funguicida son los que mejor se comportan para la protección de la enfermedad. Los análisis fitoquímicos indicaron una variedad de metabolitos secundarios (polifenoles, cumarinas, quinonas, saponinas, triterpenos, flavonoides, entre otros), algunos de los cuales han sido reportados en la literatura por presentar actividad antifúngica o inductora de resistencia. Esta investigación permitió seleccionar al B2 como “promisorio” para ser propuesto como candidato en un programa de manejo integrado de la Sigatoka negra en banano por su acción protectante. Sin embargo, se desconoce cual es la molécula que ejerce el efecto en el control de la enfermedad, por lo que, de existir la oportunidad de continuar con esta investigación, se recomienda aislar el compuesto activo. En cuanto a los hongos endofíticos, es necesario realizar más estudios para optimizar su eficiencia, con posterior aplicación de refuerzo, ampliando e induciendo la liberación de moléculas señal intermediarias en una posible resistencia sistémica.

OSORIO SALAMANCA, GINA PAOLA. 2006. EVALUATION OF ENDOPHYTIC FUNGI AND BOTANICAL EXTRACTS FOR BLACK SIGATOKA (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) CONTROL IN BANANA.

Keywords: *endophytic fungi, Trichoderma atroviride, bioproducts, botanical extracts, secondary metabolites, plants protection, black Sigatoka, Musa, banana, resistance induction, M. fijiensis.*

SUMMARY

Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) causes important losses to banana production. Use of fungicides has been the most efficient control to this foliar disease. The development of innovative strategies to diminish conventional chemical control dependency, is a permanent challenge for a sustainable and environmentally respectful agriculture. The objective of this research was to evaluate mutualist endophytic fungi and botanical extracts to control black Sigatoka in the field. Banana (cv. Grand Naine) vitro plants and corms inoculated separately with *Trichoderma atroviride* strains (E1 E2) were utilized. These materials were planted in bags and acclimatized for three months before their establishment in the field, under a completely random blocks design in split plots. Foliar applications of botanical extracts, *Momordica charantia* (B1) and *Senna reticulata* (B2) started 6 months after planting in the field. Black Sigatoka severity and incidence were evaluated using Fouré (1985) and Gauhl (1989) scales and following Marin and Romero (1998) methodology. During the vegetative period, the following variables were recorded: Evolution State (ES), Foliar Emission Rhythm (RER), Total Leaves (TL), Youngest Diseased Leaf (YDL) and Infection Index (IND). At flowering, only one reading was done for TLF, YDLF and INDF, along with the following phenological variables: Period from Planting to Flowering (PPF), Plant Height at Flowering (PHF) and Pseudostem Circumference to Flowering (PCF). Parallel to this, phytochemical analysis of B1 and B2 were conducted to determine main secondary metabolites. An ANOVA and a Duncan test were run using the SAS system. The Area Under the Progress Curve of the Disease (ABCPE, Acronyme corresponding to Spanish meaning)

expressed in the ES and IND was calculated. Results at root level reveal statistically significant differences ($p < 0.05$) for ES and IND variables, outstanding E2 after Q, with low values in comparison to remaining treatments. Nevertheless, there was no evidence of positive effects on the other analyzed variables. At foliar level, there were statistically significant differences ($p < 0.05$) favoring B2 with a less ABCPE for ES and less IND infection percentage. However, the chemical treatment (chlorothalonil) was the most effective control. Comparing the planting material type (“seeds”), vitro plants showed the best behavior regarding severity, TL, YDL and APF. Significant differences ($p < 0.05$) were observed for some interactions, standing out TL and YDL variables in the tri-factorial relationship: seeds with roots treatment and the chemical application at foliar level. In this case, seed with nematicide and fungicide interaction showed the best behavior for disease protection. Phytochemical analysis indicated a variety of secondary metabolites (polyphenols, coumarins, quinones, saponins, triterpenes, flavonoids, among other), some of which have been reported in the literature for their antifungal or resistance induction activity. This research allowed to select B2 as “highly promising” to be proposed as candidate for a banana black Sigatoka integrated management due to its protectant action. However, it is not known which molecule exerts the disease control effect. Because of the above, if exist the opportunity to continue with this investigation, it is recommended to isolate the active compound. Regarding endophytic fungi, it is necessary to conduct more studies to optimize their efficiency with subsequent reinforcement application, extending and inducing molecules liberation, which are intermediate signs of a possible systemic resistance.

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1: DISTRIBUCIÓN DE TRATAMIENTO RADICAL POR TIPOS DE SEMILLA. E1: HONGO ENDOFÍTICO 1; E2: HONGO ENDOFÍTICO 2; Q: QUÍMICO (NEMATICIDA); T: TESTIGO.	22
CUADRO 2: DISTRIBUCIÓN DE TRATAMIENTO FOLIAR POR TIPOS DE SEMILLA. B1: BOTÁNICO 1; B2: BOTÁNICO 2; Q: QUÍMICO (FUNGUICIDA); T: TESTIGO.	22
CUADRO 3: DISTRIBUCIÓN DE TRATAMIENTOS POR TIPOS DE SEMILLA, FUENTE DE VARIACIÓN Y GRADOS DE LIBERTAD DEL DISEÑO ESTADÍSTICO EMPLEADO EN ESTA INVESTIGACIÓN. ERROR EXPERIMENTAL A (2 x 7). ERROR EXPERIMENTAL B (3x2x8) Y ERROR EXPERIMENTAL C (8x3x4x3).	24
CUADRO 4: DATOS EPIDEMIOLÓGICOS OBTENIDOS DE EXTRACTOS DE PLANTAS PARA EL MANEJO DE LA SIGATOKA NEGRA EN PLANTAS DE BANANO.	35
CUADRO 5: RESULTADOS DE LA CARACTERIZACIÓN DEL EXTRACTO FLUIDO DE SENNA RETICULATA Y MOMORDICA CHARANTIA.	50
CUADRO 6: RESULTADOS DEL TAMIZAJE FITOQUÍMICO DE LOS EXTRACTOS DE SENNA RETICULATA Y MOMORDICA CHARANTIA EN: (A) ETANOL-AGUA (7:3); (B) ETANOL-AGUA (1:1) Y (C) EN MEDIO ACUOSO. ABUNDANTE CANTIDAD (+++), BUENA CANTIDAD (++), BAJA CANTIDAD (+), ND: NO DETECTADO Y LOS ESPACIOS BLANCOS SIGNIFICA QUE ESE ENSAYO NO SE REALIZO AL EXTRACTO.	51

ÍNDICE DE FIGURAS

- FIGURA 1: ILUSTRACION DEL MANEJO DEL EXPERIMENTO PARA EL CONTROL DE SIGATOKA NEGRA/BLOQUE/REPETICIÓN. 23
- FIGURA 2: EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS A NIVEL RADICAL: (A) ESTADO DE EVOLUCIÓN (EE), EXPRESADO EN EL ÁREA BAJO LA CURVA DEL PROGRESO DE LA ENFERMEDAD (ABCPE), Y (B) EL ÍNDICE DE INFECCIÓN (IND), EXPRESADO EN PORCENTAJE (%). E1: HONGO ENDOFÍTICO 1; E2: HONGO ENDOFÍTICO 2; Q: QUÍMICO (CON NEMATICIDA); T: SIN APLICACIÓN NI DE HONGO NI DE QUÍMICO. 27
- FIGURA 3: REPRESENTACIÓN DEL PROGRESO DE LA ENFERMEDAD PARA LAS VARIABLES: (A) ESTADO DE EVOLUCIÓN (EE), (B) HOJA MÁS JOVEN ENFERME (HMJE), (C) EFECTO DE LOS TIPOS DE SEMILLA EMPLEADOS: CORMO (C) Y VITROPLANTA (V) SOBRE LA VARIABLE HMJE. 28
- FIGURA 4: EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS A NIVEL RADICAL SOBRE LAS VARIABLES: (A) HOJA MÁS JOVEN ENFERMA A FLORACIÓN (HMJEF) Y (B) ÍNDICE DE INFECCIÓN A FLORACIÓN (INDF), PARA LA EVALUACIÓN DE LA SIGATOKA NEGRA. 29
- FIGURA 5: ILUSTRACION LAS VARIABLES: (A) NÚMERO TOTAL DE HOJAS (TH) Y (B) HOJA MÁS JOVEN ENFERMA (HJME) RESPECTO A CADA UNO DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS A NIVEL FOLIAR: EXTRACTOS BOTÁNICOS B1 (MOMORDICA CHARANTIA); B2 (SENNA RETICULATA); Q (CLOROTALONIL) Y T (SIN APLICACIÓN). 30
- FIGURA 6: (A) DESCRIBE LA VARIABLE ESTADO DE EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD (EE), EXPRESADO EN EL ÁREA BAJO LA CURVA DEL PROGRESO DE LA ENFERMEDAD (ABCPE) E (B) ÍNDICE DE INFECCIÓN (IND) EXPRESADO EN PORCENTAJE, PARA EL CONTROL DE LA SIGATOKA NEGRA EN CAMPO. 31
- FIGURA 7: ILUSTRACION A TRAVÉS DEL TIEMPO EL COMPORTAMIENTO DE LOS TRATAMIENTOS FOLIARES: EXTRACTO BOTÁNICO B1, EXTRACTO BOTÁNICO B2; Q (CLOROTALONIL); T (NO APLICACIÓN) SOBRE LAS VARIABLES: (A) TH; (B) HMJE; (C) EE Y (D) IND. TH-B1: TOTAL DE HOJAS BOTÁNICO 1; TH-B2: TOTAL DE HOJAS BOTÁNICO 2; TH-Q: TOTAL DE HOJAS QUÍMICO; TH-T: TOTAL DE HOJAS TESTIGO. HJME-B1: HOJA MÁS JOVEN ENFERMA-BOTÁNICO 1; HJME-B2: HOJA MÁS JOVEN ENFERMA-BOTÁNICO 2; HJME-Q: HOJA MÁS JOVEN ENFERMA-QUÍMICO; HJME-T: HOJA MÁS JOVEN ENFERMA-TESTIGO. 33
- FIGURA 8: EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS FOLIARES SOBRE: (A) NÚMERO TOTAL DE HOJAS A FLORACIÓN (THF); (B) HOJA MÁS JOVEN ENFERMA A FLORACIÓN (HMJEF) Y (C) ÍNDICE DE INFECCIÓN A FLORACIÓN (INDF) PARA EL CONTROL DE LA SIGATOKA NEGRA EN CAMPO. 34
- FIGURA 9: REPRESENTA EL EFECTO DE LAS INTERACCIÓN ENTRE LOS TRATAMIENTOS: (A) TRATAMIENTO RADICAL* TRATAMIENTO FOLIAR; (B) INTERACCIÓN TRIFACTORIAL CORMO*TRATAMIENTO RADICAL* TRATAMIENTO FOLIAR Y (C) VITROPLANTA*TRATAMIENTO RADICAL* TRATAMIENTO FOLIAR SOBRE LA VARIABLE TOTAL HOJAS (TH). 37
- FIGURA 10: ILUSTRACION LAS INTERACCIÓN ENTRE LOS TRATAMIENTOS: (A) TIPO DE SEMILLAS *TRATAMIENTO RADICAL; (B) INTERACCIÓN TRIFACTORIAL VITROPLANTAS*TRATAMIENTO RADICAL* TRATAMIENTO FOLIAR Y (C) CORMOS*TRATAMIENTO RADICAL* TRATAMIENTO FOLIAR EN CUANTO A LA VARIABLE TH DURANTE EL CRECIMIENTO VEGETATIVO DE LAS PLANTAS DE BANANO. 39
- FIGURA 11: REPRESENTA LAS INTERACCIÓN DE LOS TRATAMIENTOS: (A) TIPO DE SEMILLAS*HONGOS ENDOFÍTICOS; (B) TIPO DE SEMILLAS* EXTRACTOS BOTÁNICOS Y (C) TRATAMIENTO RADICAL* TRATAMIENTO FOLIAR PARA LA VARIABLE THF. 41
- FIGURA 12: REPRESENTA LAS INTERACCIONES DE LOS TRATAMIENTOS: (A) TIPO DE SEMILLAS*TRATAMIENTO RADICAL; (B) SEMILLAS* TRATAMIENTO FOLIAR Y (C) TRATAMIENTO RADICAL*TRATAMIENTO FOLIAR EN LA VARIABLE HMJEF PARA EL CONTROL DE LA SIGATOKA NEGRA DURANTE LA ETAPA DE FLORACIÓN. 43
- FIGURA 13: REPRESENTA LA TRIPLE INTERACCIÓN ENTRE LOS TRATAMIENTOS, (A) VITROPLANTAS*TRATAMIENTO RADICAL* TRATAMIENTO FOLIAR; (B) INTERACCIÓN CORMO* TRATAMIENTO RADICAL* TRATAMIENTO FOLIAR EN CUANTO A LA VARIABLE HMJEF. 44
- FIGURA 14: EFECTO DE LA INTERACCIÓN TIPO DE SEMILLAS* TRATAMIENTO RADICAL SOBRE LA VARIABLE INDF PARA EL CONTROL DE LA SIGATOKA NEGRA. 45

FIGURA 15: EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS TIPO SEMILLA SOBRE LAS VARIABLES: (A) DÍAS DE SIEMBRA A FLORACIÓN (DSF); (B) ALTURA DE LAS PLANTAS A LA FLORACIÓN (APF) Y EL EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS APLICADOS A NIVEL FOLIAR SOBRE LAS VARIABLES: (C) DSF Y (D) APF. 46

*FIGURA 16: REPRESENTACIÓN DE LA VARIABLE CIRCUNFERENCIA DEL PSEUDOTALLO A FLORACIÓN (CSF), PARA LOS TRATAMIENTOS: (A) TIPO SEMILLA; (B) INTERACCIÓN TRIFACTORIAL (VITROPLANTA*TRATAMIENTO RADICAL*TRATAMIENTO FOLIAR) Y (C) INTERACCIÓN TRIFACTORIAL (CORMO*TRATAMIENTO RADICAL*TRATAMIENTO FOLIAR) PARA EL CONTROL DE SIGATOKA NEGRA.* 47

1 INTRODUCCIÓN

El banano es cultivado en regiones tropicales por medianos y grandes agricultores, con una producción mundial concentrada en África (11%), América Latina y el Caribe (ALC) (34%) y en los países del Asia (54%). Sin embargo ALC sobresale de las otras regiones por ser responsable del 90% de banano de exportación que demanda alta tecnología y grandes cantidades de insumos agrícolas, incluyendo obligatoriamente el uso de pesticidas. Se ha posicionado como el cuarto alimento más importante del mundo después del arroz, trigo y leche, con alto rendimiento calórico y fuente valiosa de ingresos para la economía familiar, mejorando el nivel de vida e ingresos de los cultivadores (FAO 2005).

La problemática fitosanitaria en la producción de banano, se expresa en enfermedades y plagas causadas por bacterias, virus, hongos, nemátodos fitopatógenos, entre otros. La enfermedad foliar Sigatoka negra ocasionada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*, genera el mayor impacto económico, debido a que reduce la capacidad fotosintética impidiendo que la planta alcance la floración con un buen desarrollo vegetativo y un número de hojas funcionales que permita el llenado de los frutos en forma efectiva, dando como resultado racimos con peso muy por debajo de los estándares de comercialización (Guzmán 2006).

Las grandes extensiones de monocultivo en banano de exportación, son del subgrupo Cavendish especialmente del cultivar ‘Gran enano’, altamente susceptible a la Sigatoka negra, donde el método de control por excelencia para esta enfermedad ha sido la aplicación de productos químicos, cada vez en aumento, dada la pérdida de sensibilidad del patógeno hacia los fungicidas comerciales más comunes. En países de ALC, las aplicaciones se han incrementado desde 38 a 50 por ciclo productivo; la estimación de costo en Costa Rica, es del orden de US\$1.500/hectárea/año (Marín *et al* 2003). En la actualidad, el problema es aún manejable para los grandes productores dedicados a la exportación, pero, no para los medianos cultivadores, dado el alto costo que esto representa. Para estos últimos, las prácticas culturales, el cultivo intercalado de banano con otros clones no susceptibles, la implementación de altas densidades de siembra, la deshoja sanitaria periódica y el uso de métodos alternativos, se convierten en estrategias obligadas para el manejo integrado del cultivo.

En general, se puede afirmar que con el aumento del uso de fungicidas, la resistencia del hongo a estos agroquímicos y la necesidad de los agricultores de competir en el mercado

nacional e internacional con productos sin residuos tóxicos y evitando los efectos negativos sobre el ambiente, se crea la necesidad de investigar nuevas posibilidades que coadyuven a resolver, en parte, este problema.

Este proyecto tiene como propósito principal, ayudar a mejorar la producción de banano en América Latina mediante el uso de bioproductos “promisorios”: hongos endofíticos a nivel radicular y la aplicación foliar de extractos botánicos. Estos bioproductos han sido previamente estudiados por diferentes equipos de investigación en el CATIE; los primeros en investigación para nematodos y los últimos como estrategia innovadora de protección contra la Sigatoka negra en metodologías dirigidas a beneficiar a los productores y al medio ambiente.

1.1 Objetivos del estudio

1.1.1 Objetivo General

Contribuir a mejorar la producción de banano, mediante la evaluación del efecto potencial de hongos endofíticos y extractos botánicos para el control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet).

1.1.2 Objetivos específicos

Estudiar el efecto de protección o inducción de resistencia de dos tipos de material de siembra (cormo y vitropantas) de banano inoculadas con dos hongos endofíticos “promisorios” sobre la incidencia y severidad de la Sigatoka negra en el campo.

Evaluar el efecto de protección o inducción de resistencia de la aplicación foliar de dos extractos botánicos “promisorios” en dos tipos de semilla (cormo y vitroplantas) de banano, previamente protegidas con hongos endofíticos, sobre la incidencia y la severidad de la Sigatoka negra en condiciones de campo.

Determinar la existencia o no del efecto de interacción de los bioproductos (hongos endofíticos y extractos botánicos) sobre la incidencia y severidad de la Sigatoka negra en el campo.

Realizar análisis fitoquímico de los extractos botánicos mediante el empleo de diferentes solventes extractores, para la identificación de metabolitos secundarios mayoritarios.

1.2 Hipótesis del estudio

La inoculación de dos tipos de semillas de banano con hongos endofíticos confiere una protección o inducción de resistencia a la planta como respuesta en la reducción de la incidencia y severidad para el control de Sigatoka negra en campo.

Los extractos botánicos tienen efecto significativo en la protección y por tanto, reduce la incidencia y la severidad de la Sigatoka negra en campo.

La interacción de los bioproductos (hongos endofíticos y extractos botánicos), tienen un efecto significativo en la protección o inducción de resistencia en la planta reduciendo la incidencia y severidad de la Sigatoka negra en campo.

2 MARCO CONCEPTUAL

2.1 Aspectos generales del cultivo

2.1.1 Origen y Taxonomía del banano

El Sureste Asiático se considera el lugar de origen del banano, su cultivo se desarrollo simultáneamente en Malaya y en las Islas Indonesias. La mayoría de los bananos comestibles pertenecen a dos especies silvestres: *Musa acuminata* y *Musa balbisiana*, las cuales en su forma silvestre son diploides y fértiles, mientras que los genotipos cultivados son partenocarpios y estériles (Stover and Simonds, 1987).

A nivel mundial la producción es de 72,465,770 TM/año siendo la América Latina, la mayor exportadora , sobresaliendo en orden de contribución: Ecuador, Costa Rica y Colombia. En el Caribe, los aportes más significativos los hace la Republica Dominicana. En Asia el mayor exportador es Filipinas; mientras que, Camerún y Costa de Marfil lo son en África. La superficie cultivada de banano en el mundo, es de 4,439,165 Há, con aportes para la América Latina y Caribe de 1,220,010 Há. En términos de exportación, el 83% es enviado a los mercados de América del Norte, Comunidad Europea, Japón, países de Europa Oriental y la Ex URS (FAO 2005) .

El cultivo de banano es afectado por patógenos tales como: virus, bacterias, hongos y de plagas entre los que sobresalen nematodos e insectos. Las enfermedades foliares de origen fungoso, con una marcada importancia económica, son originadas por hongos del genero *Mycosphaerella*. La enfermedad conocida como Septoria causada por *Mycosphaerella eumusae*; la Sigatoka amarilla ocasionada por *Mycosphaerella musicola* y la Sigatoka negra producida por *Mycosphaerella fijiensis*, forma parte de este grupo (Carlier *et al.* 2000).

2.2 Sigatoka negra

La Sigatoka negra es la enfermedad más destructiva de las Musáceas, es causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, la cual se caracteriza por producir niveles altos de esporulación, con fuertes patrones de infección y diseminación del patógeno, que dificultan el control de esta enfermedad, catalogada como la más agresiva y limitante.

Esta enfermedad fue identificada por primera vez en 1963, en las islas Fiji (Rhodes 1964). En América, fue observada por primera vez en 1972 en Honduras (Stover and Dickson 1976). Actualmente, se encuentra difundida en todo el mundo, en las áreas productoras de banano y plátano. Los últimos sitios reportados han sido: Brasil (Maciel et al. 1998), Haití en el 2000; Australia en 2001, Trinidad y Tobago desde el 2003 (Fortune et al., 2004), la Isla de Puerto Rico en 2004 (Irish et al., 2006) y más recientemente se ha confirmado en Grenada (informado en Acorbat 2006).

En términos epidemiológicos se trata de una enfermedad policíclica, con dos fases de reproducción vegetativa: sexual y asexual. La primera es la más compleja y la más agresiva, ya que genera ascosporas como fuente de inóculo, las cuales son transportadas por el viento, el agua y/o los insectos, en una expansiva diseminación de la enfermedad. Una vez la espora encuentra el hospedero y las condiciones ambientales son adecuadas, esta germina y penetra en la planta por los estomas. Cuando las condiciones no son las adecuadas, la estructura del hongo entra en un periodo de latencia hasta obtener condiciones favorables. El ciclo se inicia en la etapa de colonización de la planta, posteriormente, la infección de la misma y por último, el desarrollo de la enfermedad (Marín y Romero 1998). En la fase asexual, se da origen a la producción de conidios, los cuales son más abundantes durante los periodos de mayor pluviosidad, el número de conidios transportados por el viento es 10 veces menor que el número de ascosporas (Meredith and Lawrance 1969).

La enfermedad presenta una dinámica estacional, determinada por las variaciones de la temperatura y la pluviometría a lo largo del año, la severidad de la enfermedad está caracterizada por zonas con precipitaciones de mas de 1400 mm/año y humedades relativas por encima del 80% . La germinación y el crecimiento de las esporas es óptimo cuando existe una película de agua sobre la hoja, también la producción de peritecios y la descarga de ascosporas se incrementa en condiciones lluviosas (Stover and Simonds 1987). Respecto a la lluvia, esta tiene su mayor efecto en el proceso de liberación del inóculo, y provee las condiciones de humedad favorables para el desarrollo de la infección. La temperatura óptima para el desarrollo de la enfermedad esta alrededor de 26 °C. El viento y el agua son mecanismos determinantes para la dispersión de la enfermedad. Estas variables agrometereológicas son muy importantes ya que proveen las condiciones ideales para la germinación de ascosporas, conidios y en general, el desarrollo extensivo de la enfermedad (Merchan 1998; Marín y Romero 1998).

2.2.1 Métodos para evaluar la enfermedad

Para tener una idea clara y precisa del estado fitosanitario de una plantación es necesario la evaluación del estado de infección de la enfermedad. Esta se realiza mediante dos sistemas que son ampliamente usados: (i) sistema de preaviso biológico, el cual mide el estado de desarrollo de la enfermedad con la escala de Fouré (1985), consiste en la detección temprana de los síntomas de la enfermedad, donde inicialmente se determina la emisión foliar considerando los estados de desarrollo de la hoja candela descritos por Brun (1963, anexo 1A) y (ii) estimación de la incidencia y la severidad a través de la metodología de Stover modificada por Gauhl (1989-anexo 1B). El nivel de infección sobre las hojas II, III y IV se registra con la escala propuesta por Fouré (1985- anexo 2), con los siguientes estadios:

Estadio 1: puntos negros con halo de color blancuzco, este síntoma es visible en el envés de la hoja.

Estadio 2: surge como una raya o estría, generalmente de color café y es visible en el envés de la hoja.

Estadio 3: se diferencia del anterior en sus dimensiones. La estría se hace más larga y ancha, aumentando su longitud, visible por el envés y la haz de la hoja.

Estadio 4: visible en la haz de la hoja como una mancha negra, bien definida.

Estadio 5: ocurre cuando la mancha elíptica negra extendida en la haz de la hoja es rodeada de un halo amarillo.

Estadio 6: se desarrolla cuando el centro de la mancha se seca, adquiere un color gris claro, rodeado a su vez por un halo de color amarillo brillante.

A partir de esta información se obtienen las variables Suma Bruta (SB) y Estado de Evolución (EE), las cuales representan los descriptores que indican el momento exacto de aplicar. El segundo, es usado como complemento del anterior, consiste en la estimación visual del área afectada de todas y cada una de las hojas en la planta estudiada, durante el periodo vegetativo, a floración y a cosecha. Esta metodología permite obtener los valores de las variables: Total de Hojas (TH), el Índice de Infección (IND) y la Hoja Más Joven Enferma (HMJE), esta última, indica el progreso de la enfermedad, de tal manera que cuanto más joven es la hoja con síntomas, mayor es la incidencia y la severidad. Las plantas a evaluar requieren contar con por lo menos de 5 a 6 hojas verdaderas (Marín y Romero 1998).

Las evaluaciones deben realizarse sobre las mismas plantas marcadas al inicio de la fase de lectura, en intervalos fijos de siete días para la escala de Fouré y cada 15 días para la metodología de Stover modificada por Gauhl (Marín y Romero 1998).

Caracterizar la curva de progreso de la enfermedad durante el ciclo del cultivo, es una herramienta muy importante para programar su método de control o tipo de aplicaciones requeridas, permitiendo racionalizar el empleo de productos químicos y reducir la contaminación ambiental. Es importante indicar que cualquier programa de aplicación, se debe realizar en función de la evolución de la enfermedad (método de preaviso biológico); mientras que la incidencia y severidad determina el estado fitosanitario en la plantación. Se establece que las condiciones climáticas y estado de desarrollo de la planta juega un papel importante sobre las anteriores variables epidemiológicas (Marín y Romero 1998).

2.2.2 Control de la Enfermedad

El método tradicional para el control de la Sigatoka negra, ha sido las **prácticas culturales**, dirigida a reducir la fuente de inóculo del patógeno y forma parte de un programa de manejo integrado de la enfermedad. En este sentido, el establecimiento de un buen sistema de drenaje, la remoción de las hojas viejas en el suelo junto con la poda sanitaria, se han utilizado durante años como estrategias para reducir la densidad del inóculo, sin dejar de lado, un adecuado programa de fertilización. Se ha propuesto el establecimiento de altas densidades de siembra, con el fin de generar un micro y mesoclima al interior de la plantación, creando condiciones desfavorables para el patógeno (Rosales *et al.* 2002). No obstante, esta hipótesis de trabajo, a la fecha, no ha sido aún completamente documentada científicamente.

El método de **control químico**, es el más ampliamente utilizado, se establece dentro de un programa normal de rotación entre fungicidas, sistémicos y protectantes, a lo largo del ciclo del cultivo. De acuerdo a Marín y Romero (1998), los fungicidas para el control de esta enfermedad se pueden agrupar en tres categorías, con base en su modo de acción: fungicidas de contacto o protectantes, de acción sistémica local y fungicidas sistémicos. En cuanto a los fungicidas protectantes (Mazoceb y Clorotalonil), estos son utilizados de forma alternada con fungicidas sistémicos (benzimidazoles, azoxistrobina), estos últimos, son aplicados con aceites o emulsiones como adherente (Romero 2006).

El **mejoramiento genético** es una de las mejores alternativas para el control de la Sigatoka negra. Los híbridos desarrollados por el programa de mejoramiento genético

convencional de la Fundación Hondureña de Investigación agrícola (FHIA), han sido distribuidos en más de 50 países alrededor del mundo y en evaluación desde 1991, mediante el programa internacional de Músaceas patrocinado por INIBAP. Todos los híbridos liberados hasta la fecha, poseen adecuadas características comerciales y resistencia o tolerancia a la enfermedad. Asimismo, poseen un rango adecuado de adaptación agroclimática y con las prácticas agronómicas adecuadas pueden ser aprovechados en su máximo potencial. Estos híbridos han tenido gran éxito en Cuba donde se cultivan cerca de 10,000 Há, principalmente de FHIA-18 y recientemente FHIA-21. En los últimos 10 años, se iniciaron otros programas internacionales de mejoramiento genético convencional en Brasil, Camerún y Guadalupe, orientados hacia el desarrollo de variedades resistentes a la Sigatoka negra (Rosales y Pocasangre 2002).

En la búsqueda de nuevas alternativas para el control de la Sigatoka negra, se tienen algunas aproximaciones en el **control biológico**, tendiente a reducir el inóculo de la enfermedad, utilizando microorganismos, que en buena medida actuarían como antagonistas o en competencia contra *M. fijiensis* (Patiño *et al.* 2006; Guzmán 2006; Talavera *et al.* 1998; Gutiérrez 1996; González *et al.* 1996). A pesar de los avances, el empleo de estos microorganismos y el como hacerlos eficientes para uso masivo, esta aún poco desarrollado, máxime que una de las limitantes en su aplicación es la efectividad disminuida causada por el efecto negativo de factores ambientales, los cuales pueden alterar la supervivencia, actividad y vida útil de estos en la superficie de la hoja.

En la última década, se ha sugerido el uso de hongos endofíticos, epífitos, micorrizicos, y/o rizobacterias con gran capacidad para la producción de sustancias que promueven el crecimiento, como las auxinas y citoquininas, entre otras (Orozco-Santos y Orozco-Romero 2006). Asimismo, en otros patosistemas que causan enfermedades foliares, se han identificado bacterias transformadoras de minerales, compuestos orgánicos en forma disponibles a la planta como solubilizadores de fósforo y fijadores de nitrógeno libre. Estos atributos se traducen en vigor a la planta y como consecuencia le otorgan resistencia a patógenos (Benítez *et al.* 2004; Harman *et al.* 2004; Howell 2003; Yedidia *et al.* 2001; Arora *et al.* 1992).

A nivel de patógenos de suelo, una primera aproximación exitosa, es el uso de hongos endofíticos mutualistas para el control biológico de nematodos (Sikora y Pocasangre 2006; Hallman and Sikora 1996). Estas asociaciones benéficas, también, alteran la fisiología de la planta llevándolas a aumentar su crecimiento, a incrementar la resistencia al estrés causado por

factores abióticos y bióticos, y a estimular los mecanismos de defensa (Pocasangre *et al.* 2006; Sikora 2003, Jaizme-Vega 2003, Tzun and Klopper 1995). De otro lado, algunos investigadores coinciden, en que la interacción benéfica microorganismo-planta actuando a nivel radicular, podría a distancia, desencadenar reacciones de defensa que protegen a la planta contra patógenos foliares (Harman *et al.* 2004; Benítez *et al.* 2004; Elad and Kapat 1999; Yedidia *et al.* 1999). Esta temática será tratada en forma más amplia en el acápite 2.4.

Otra alternativa muy innovadora se relaciona con **los mecanismo de defensa activados**, donde se encuentra la Resistencia Sistémica Adquirida (del Inglés, SAR), cuya señal estimuladora es capaz de inducir la síntesis y acumulación de ácido salicílico y/o del etileno, que actuarían como mensajeros secundarios para la síntesis de proteínas relacionadas con la patogenicidad (quitinasas, β -1,3 glucanasas) y/o enzimas claves involucradas en el metabolismo de los fenilpropanoides como la PAL, peroxidasas y lipoxigenasas (Van Loon and van Strien 1999). En *Musa-M. fijiensis* se ha trabajado arduamente en los últimos años con el BOOST[®] o Actigard; análogo del Ácido Salicílico y se han logrado resultados muy alentadores con este activador sintético de plantas (Tally *et al.* 2000). La ruta biosintética de los fenilpropanoides es muy importante para los mecanismos de defensa de la planta, ya que los productos intermediarios generan compuestos finales claves para el bloqueo del patógeno a nivel celular. Así como, la obtención de fitoalexinas, las cuales podrían estar involucradas en la actividad antimicrobial (Howell 2003; Yedidia *et al.* 2001; Tally *et al.* 2000).

La importancia de los metabolitos secundarios, se ve claramente en los trabajos con extractos de plantas, en donde se han evidenciado como potentes productos antifúngicos, antibacterianos, estimuladores del desarrollo fisiológico de la planta o activando los mecanismo de defensa contra plagas y enfermedades (Kagale *et al.* 2004; Polanco 2004; Arciniegas *et al.* 2002).

2.3 Productos Naturales

El uso de Productos Naturales (PN) es tan antiguo como la humanidad. Los PN son de naturaleza muy variada, desde sustancias biológicamente activas de origen marino, microbial tracto de insectos, exudados de raíz y los más explorados, aquellos provenientes de plantas. La química orgánica estudia la estructura, transformación y efectos biológicos de los metabolitos secundarios presentes en diferentes organismos. Debido a sus propiedades y principios activos se están aplicando en medicina moderna, cosmetología, farmacéutica, biotecnología y últimamente con contribución muy prometedora en la agricultura ecológica.

En la naturaleza existen de 250 000 a 500 000 especies vegetales, de las cuales se estima que al menos el 10% han sido estudiados en sus aspectos químicos y propiedades biológicas. Como se menciono anteriormente, esta temática no es nueva, se había dejado en el olvido por un largo periodo de tiempo y recientemente, el interés ha sido renovado valorando la diversidad de estructuras químicas en la búsqueda de nuevos compuestos bioactivos (Piñol 2001).

Las plantas por su gran diversidad presentan amplia variedad de sustancias activas (metabolitos secundarios), donde se conocen más de 30.000 estructuras de los 400.000 que se cree que pueden existir. Alrededor de 3.000 compuestos naturales de origen vegetal, han sido reportados mostrando actividad: bactericida, fungicida, insecticida, repelente, nematocida, etc (Obledo *et al.* 2004; Kagale *et al.* 2004; Gil 2002; Singh and Singh 2000; Soledade *et al.* 1998).

2.3.1 Actividad antimicrobial e inducción de resistencia en plantas con el uso de extractos botánicos

Los PN de origen vegetal han sido, en las últimas dos décadas, mayormente estudiados en su parte química, con énfasis en los metabolitos secundarios, los cuales están implicados en el control biológico contra patógenos o plagas, y en ciertos casos, activando procesos de defensa en la planta, brindando una protección preventiva (Kagale *et al.* 2004). Los metabolitos secundarios, son sustancias de bajo peso molecular, no son comunes en todas las plantas y por el contrario, pueden ser una expresión de la individualidad química de un organismo. Los productos del proceso fundamental de la fotosíntesis proporcionan los intermediarios biosintéticos necesarios para dar lugar a la formación de los metabolitos secundarios, haciéndose evidente la interconexión entre productos del metabolismo primario con el secundario (Gil 2002- Anexo 3).

La presente revisión, enfatiza la interacción patógeno-planta y en particular enfermedades foliares. Los compuestos fenólicos sencillos (hidroxibenzoicos o hidroxicinámicos), son metabolitos secundarios comunes en las plantas con propiedades fungicidas. Las cumarinas clasificadas como antifúngicas y antibacteriana. Los conjugados de fenilpropanoides con aminas, se incorporan a la pared celular vegetal para aumentar su rigidez e impedir la entrada de los patógenos. En cuanto a las fitoalexinas, estas son sintetizadas por

las plantas, después de la infección y en actividad inhibitoria de microorganismos patógenos, se han identificado un grupo importante, por ejemplo, la pisatina, la cual es un flavonoide sintetizado por el guisante, *Pisum sativum*, como reacción a la infección por hongos, siendo esta la primera fitoalexina aislada y caracterizada (Gil 2002).

Por otro lado, aquellas que hacen parte de la respuesta hipersensible, como es el caso de algunos compuestos pertenecientes a los grupos de los alcaloides, los terpenoides y los fenilpropanoides, participan activamente matando directamente al microorganismo patógeno o restringiendo su invasión al resto de la planta. Al mismo tiempo, otros metabolitos secundarios contribuyen a destruir las especies reactivas de oxígeno que son tóxicas para la misma célula vegetal, las cuales se sintetizan durante las etapas tempranas de la respuesta de defensa. Es así, como algunos metabolitos secundarios constituyen una parte importante de la respuesta de la defensa de las plantas sometidas al ataque por patógenos (Sepúlveda *et al.* 2003).

Con el fin de conocer la actividad antifúngica de *Inula viscosa* (familia compositae), utilizaron diferentes técnicas de extracción, agua caliente y también, a temperatura ambiente, particionaron con solventes orgánicos y obtuvieron aceite esencial por destilación. Las observaciones mostraron que los extractos de *I. viscosa* preparados en solventes orgánicos, poseen una actividad de amplio espectro contra enfermedades foliares: mildú veloso del pepino causado por *Pseudoperonospora cubensis*; tizón tardío de la papa y el tomate causado por *Phytophthora infestans*; mildú polvoriento del trigo causado por *B. graminis* y tizón del girasol causado por *Puccinia helianthi*. Además, con el fin de elucidar la actividad biológica, los extractos fueron analizados encontrando la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides, terpenoides, saponinas, ácidos sesquiterpénicos, lactonas sesquiterpénicas y otros compuestos (Wang *et al.* 2004; Apablaza *et al.* 2002).

Existen varios reportes en la literatura en donde registran plantas con actividad antifúngica, como es el caso de *Allium sativum*, la cual contiene como compuesto activo aliína un aminoácido sulfurado; el aceite esencial de hojas de orégano mexicano (*Lippia graveolens*), presenta fenoles timol y carvacol que son los principales componentes que le confieren poder antibacteriano y antifúngico. El aceite esencial obtenido desde hojas de zacate de limón (*Cymbopogon citratus*), que es rico en citral, myrceno, dipenteno, methylheptenona, ciertos alcoholes, y ácidos volátiles, presenta actividad antifúngica, contra *Mycosphaerella fijiensis* en bioensayos realizados *in vitro* (Obledo *et al.* 2004).

Estudios empleando extractos botánicos contra *M. fijiensis*, como es el caso de evaluaciones *in vitro*, realizados por Arciniegas (2002) y Arciniegas *et al.* (2002), en donde seleccionaron 20 plantas que revelaron un porcentaje superior al 30% de actividad inhibitoria contra este patógeno, de las cuales sobresalieron *Syzigium aromaticum* con mayor poder antifúngico, seguido por *Commelina difusa*, *Momordica charantia*, *Pavonia sp.*, *Plenax sp.*, *Piper hispidum*, *P. Peltatum* y *Sida rhombifolia*. Polanco (2004), validó en campo diez productos vegetales, mediante el método de ventana de inoculación, que fueron previamente seleccionados como “promisorios” desde Arciniegas (2002) y que mostraron actividad inhibitoria contra *M. fijiensis*, luego de aplicaciones de los extractos crudos, fracciones polares y diclometánolicas en dos concentraciones (100 y 200 ppm). Los bioproductos probados y que resultaron potencialmente antifúngicos son los extractos crudos de: *Momordica charantia*, *Plenax sp.* y *Syzigium aromaticum*; las fracciones polares de los extractos de *Sida rhombifolia*, *Piper hispidum*, entre otras especies. Recientemente se han reportado estudios realizados en Venezuela con extractos etanolicos de *Heliotropium indicum*, *Lippia origanoides* y *Phyllanthus niruri*, para el control de la Sigatoka negra (Hernández *et al.* 2006), asimismo, en Colombia evaluaron el efecto biofungicida de *Momordica charantia*, *Awinglea glutinosa*, *Salvia officinalis*, *Carica papaya*, *azadirachta indica* y *Jatropha sp.* Utilizando como adherente natural el aceite de *Ricinus comunis*, los autores encontraron que hubo respuesta de sensibilidad del hongo a los tratamientos, sin embargo el químico presento los mejores resultados en todas las variables (Marín *et al.* 2006).

En el caso del patosistema pepino-*Podosphaera xanthii*, causante del mildiú polvoriento, al ser tratado con un inductor exógeno, proveniente de las hojas de milsana (*Reynoutria sachalinensis*), se observo rápidamente la síntesis de una fitoalexina, C-glycosidil conocida como cucumarina, la cual se acumula en el sitio de penetración del hongo, jugando un papel importante en el bloqueo, colonización y supervivencia del patógeno. Se reporto que la lignificación de la pared celular y el aumento en actividad de las enzimas quitinasas, peroxidadas y B-1,3 glucanasas (Fofana *et al.* 2005).

2.4 Hongos Endofíticos

Se caracterizan por colonizar los tejidos u órganos internos de una planta sin causar ningún tipo de síntomas; asimismo, aquellos que le confiere una protección a la planta hospedera contra el ataque de agentes abióticos se les denomina hongos endofíticos mutualistas (Latch *et al.* 1985; Carroll 1990). Los hongos endofíticos son mutualistas si: (i) no causan síntomas de enfermedad en la planta hospedera; (ii) son transmitidos a través de las semillas, cuando esto no ocurre, éstos deberán transmitirse lateralmente, de planta adulta a otra; (iii) esta disperso a través de los tejidos del hospedero; (iv) colonizan y se extienden en un hospedero definido y (v) producen metabolitos secundarios como modo de acción de antibiosis o de naturaleza tóxica (Meneses 2003).

Existen estrategias fundamentalmente distintas para que los hongos endofíticos presenten una simbiosis con las plantas: (a) desarrollando una infección que induce algún tipo de resistencia sistémica mediante una biomasa sustancial interna; (b) produciendo potentes toxinas que presentan un efecto letal hacia patógenos de la plantas y (c) mediante un mutualismo inducido, que envuelve una simbiosis menos precisa o más difusa entre el hospedero y el endofítico (Clay 1998).

Por otro lado, en lo referente a estudios realizados con hongos endofíticos para el manejo de plagas, se reporta aquellos que hacen énfasis en el control de nematodos como son los trabajos dirigidos por Pocasangre *et al.* (2000, 2001) donde señalan que existe algunos hongos benéficos para la planta, los cuales ingresan dentro del huésped y colonizan el tejido sin causar ningún tipo de síntoma, denominados hongos endofíticos, desde la planta se ve beneficiada alterando su fisiología, acelerando su crecimiento e incrementando la resistencia al estrés causado por factores abióticos. Se ha demostrado que la inoculación de vitroplantas, rebrotes o cormos, con ciertos aislados endofíticos conllevan a la reducción del ataque de nematodos (Pocasangre *et al.* 2006; Sikora y Pocasangre 2006; zum Felde *et al.* 2002; Pocasangre 2002; Schuster *et al.* 1995). Además, Pocasangre *et al.* (2000) realizó investigaciones sobre poblaciones de hongos endofíticos presentes en tejidos internos de raíces de banano y plátano encontrando que el 10% de los hongos endofíticos colectados presentan una alta actividad antagonista sobre el nematodo barrenador *Radopholus similis*, así como un estímulo en el desarrollo radial y foliar. A su vez, Cañizares (2003), encontró que en suelos supresivos el 94% de las poblaciones de *Radopholus similis* se reducía en el sistema radical de Musáceas, en donde los géneros *Trichoderma* y *Fusarium* fueron los sobresalientes.

Existen diversas especies de hongos endofíticos benéficos, entre ellos se encuentra el genero *Trichoderma*, utilizado en los últimos años como agente para el control de numerosas enfermedades en plantas (Howell 2003; 2002). Este género esta integrado por un gran número de cepas que actúan como agentes de control biológico y cuyas propiedades antagónicas se basan en la activación de mecanismos muy diversos, en donde pueden ejercer el biocontrol de hongos fitipatógenos indirectamente, compitiendo por el espacio y los nutrientes, modificando las condiciones ambientales, estimulando el crecimiento de las plantas y sus mecanismos de defensa o produciendo antibióticos; sin dejar a un lado el control directo mediante micoparasitismo. Estos mecanismos pueden actuar de forma coordinada y su importancia en los procesos de biocontrol depende de la cepa de *Trichoderma*, del hongo al que antagoniza, del tipo de cultivo y de las condiciones ambientales tales como la disponibilidad de nutrientes, el pH, la temperatura o la concentración de hierro. La activación de cada uno de los mecanismos implica la producción de metabolitos y compuestos específicos tales como factores de crecimiento de plantas, enzimas hidrolíticas, sideróforos, antibióticos y permeasas de carbono y nitrógeno. Estos metabolitos pueden sobreexpresarse o combinarse con cepas de biocontrol apropiadas, a fin de obtener nuevas formulaciones que puedan ser mas eficaces en el control de enfermedades de plantas y en la protección de frutos post-cosecha (Benítez *et al.* 2004) .

El micoparasitismo y/o antibiosis como mecanismo de acción de las especies de *Trichoderma*, por ejemplo, Howell and Stipanovic (1983), aislaron y describieron un nuevo antibiótico denominado glovirin, desde *Trichoderma virens*, que fue fuertemente inhibitorio para *Pythium ultimum* y especies de *Phytophthora*. En cuanto a la competencia en la rizosfera, se tiene la producción de enzimas tales como quitinasas, glucanasas por parte de agentes biocontrol, las cuales rompen los polisacaridos, las quitinas y los beta-glucanos que son los responsables de darle rigidez a la pared celular y, de este modo destruir degradando la pared y producir la muerte del hongos patogénico (Baek *et al.* 1999).

Elad and Kapat (1999), sugieren en sus estudios que el biocontrol de *T. harzianum* contra *B. cinerea* podría ser debido, en parte a la producción de proteasas que inactivan las enzimas hidrolíticas producidas por *B. cinerea* sobre las hojas del frijol. Las proteasas rompen las cadenas peptídicas o los constituyentes aminoácidos de las enzimas hidrolíticas y por lo tanto, destruye su capacidad de actuar sobre las células de la planta.

Por otro lado, la inducción de resistencia en la planta huésped, es una de las propuestas para explicar otra forma de acción de las especies de *Trichoderma*. Yedidia *et al.* (1999), demostró que raíces inoculadas con *T. harzianum* inicio una respuesta de defensa en la plántulas de pepino, tanto en las raíces como en las hojas, esta respuesta fue marcada debido al incremento de la actividad de peroxidasas (con frecuencia asociada a la producción de compuestos fungitóxicos), además, de un aumento en la actividad de quitinasas, y la formación de aposiciones sobre la superficie interna de la pared celular; un aumento en la actividad de las enzimas fue observado tanto en las raíces como en las hojas, a su vez este autor mostró que la inoculación de raíces con *T. harzianum* induce la activación de una serie de proteínas relacionadas con la patogenicidad, incluyendo un número de enzimas hidrolíticas. En estudios previos Howell (2002), demostraron que semillas de algodón tratados con preparaciones del biocontrolador *T. virens* induce la síntesis de altas concentraciones de terpenoides desoxihemigossypol (dHG), hemigossypol (HG) y gossypol (G). De otro lado Yedidia *et al.* (2001), muestra que plantas de pepino tratadas con *T. harzianum*, incrementa el área y la longitud de la raíz, el tallo y el área de la hoja comparado con los tratamientos no tratados, presentando un incremento significativo de Cu, P, Fe, Zn, Mn y Na en las raíces de las plantas de pepino. Los autores consideran que el mejoramiento de la nutrición de las plantas fue directamente relacionado con el aumento del crecimiento de estas, y esto se debe al efecto de la inoculación de *T. harzianum* a nivel radical.

Howell (2003), resalta que los mecanismos de acción en cuanto a la producción antibiosis y enzimas por parte de especies de *Trichoderma* esta fuertemente influenciado por el sustrato sobre el cual los hongos crecen y las condiciones ambientales como la temperatura, a su vez la presencia de otros miembros en la microflora del suelo también podría influir en la actividad del biocontrol por inhibición del crecimiento y desarrollo de este o en el metabolismo de enzimas y /o antibióticos, es posible que esto no afecte completamente al agente biocontrolador, pero, si puede limitar su eficacia. Dada estas consideraciones el autor recomienda que el mejor método para obtener un agente biocontrolador potencial, este debe ser aislado de áreas en donde la planta y el suelo se espere que funcione controlando la enfermedad y el crecimiento se haga bajo condiciones de temperatura, humedad y nutrientes disponibles que beneficien al biocontrolador. En cuanto a los tipos de mecanismo de control estos dependen tanto del agente, el patógeno como del huésped, a su vez que todos estos están influenciados por la temperatura, humedad, tipo de suelo, pH, genotipo de la planta,

microhabitat y obviamente, de los otros miembros de la microflora. Por consiguiente, definir biocontrol implica múltiples interacciones bajo diferentes mecanismos que trabajan sinérgicamente para lograr el eficiente control de la enfermedad o plaga en el cultivo en cuestión.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Descripción del área experimental

El estudio se realizó en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), adscrito al Cantón de Turrialba en la provincia de Cartago, Costa Rica, localizado a 9°55'21" de latitud Norte, 83°39'40" de latitud Oeste, a una altura de 602 m.s.n.m y perteneciente a la zona de vida bosque muy húmedo Tropical (bmh-T). Presenta una precipitación anual de 2195 mm, temperatura promedio de 28.6°C, humedad relativa de 88.9% y una radiación solar promedio mensual de 16 KJ.M⁻² día⁻¹.

El presente trabajo se llevo a cabo en las áreas correspondientes a los laboratorios de Fitopatología, Nematología y Diagnóstico. Asimismo, en la finca “La Montaña” donde se estableció un vivero y se dispusieron las parcelas que conformaron el experimento definitivo en campo.

3.2 Materiales

3.2.1 *Material de siembra*

Se utilizo el cultivar de banano “Gran Enano” (AAA), fueron empleados dos tipos de semillas, de buena calidad.

- **Vitroplantas:** plántulas provenientes de cultivo *in vitro* en fase IV de endurecimiento, adquiridas desde un laboratorio comercial que garantiza la calidad y sanidad del material.
- **Cormos:** provenientes de hijos de espada de plantas madre sanas y vigorosas. Con el fin de no afectar el punto de crecimiento o meristemo apical, a la semilla se le dejo de 3-5 cm de pseudotallo.

3.2.2 *Hongos Endofíticos (HE) biocontroladores*

Se utilizaron hongos endofíticos que pertenecen a dos cepas de *Trichoderma atroviride* que denominaremos en lo sucesivo Endofítico uno (E1) y Endofítico dos (E2), suministrados por el laboratorio de Nematología (Dr. Luis E. Pocasangre) del CATIE. Estas cepas de HE han sido clasificadas como “promisorios” por su capacidad bicontroladora contra nematodos, en

especial *Radopholus similis*. Los cultivos madres de estos hongos endofíticos, sirvieron de base para la realización de subcultivos (medio PDA) en la preparación de suspensión de conidios.

3.2.3 Extractos botánicos

Para la obtención de extractos botánicos, se hizo la colecta masiva en campo de las plantas *Momordica charantia* perteneciente a la familia *Cucurbitaceae* que codificamos como Botánico uno (B1) y *Senna reticulata* perteneciente a la familia *Fabaceae* nombrado como Botánico dos (B2). Estos bioproductos de origen botánico fueron clasificados como “promisorios” en trabajos precedentes de este mismo equipo de investigación en la sublínea de manejo alternativo de Sigatoka negra del grupo de Musáceas del CATIE (Arciniegas 2002; Arciniegas *et al.* 2002; Polanco 2004; Riveros *et al.* 2003). Los B1 y B2 fueron seleccionados por presentar características en su modo de acción que pueden asimilarse al carácter protectante de los fungicidas comerciales para el control de la Sigatoka negra.

3.3 Métodos

3.3.1 Preparación de extractos botánicos

Los extractos botánicos fueron obtenidos por el método de maceración de extracción hidroalcohólica, el cual consistió en colocar el material seco y molido en una mezcla de etanol-agua (70:30), realizándose tres extracciones en intervalos de 8 días con el fin de agotar completamente el material vegetal. Posteriormente, estas extracciones se llevaron a rotavaporización, obteniéndose el extracto crudo concentrado (anexo 4). Al bioproducto resultante se le determino los sólidos totales (anexo 5) y a partir de estos valores, se efectuaron las diluciones que fueron utilizadas para las aplicaciones foliares, en los diferentes tratamientos y en el momento indicado (Arciniegas 2002, Polanco 2004).

3.3.2 Preparación de la suspensión de esporas

Cultivos de hongos con diez días de crecimiento en medio de cultivo PDA, fueron utilizados para la preparación de la suspensión de esporas. A estos cultivos esporulados se les adiciono 25 ml de agua destilada y con ayuda de una asa, se desprendió el micelio del hongo.

Esta solución fue ajustada, mediante un hematocímetro de Neubauer a la concentración de 1×10^6 UFC/ml (anexo 6).

3.3.3 Preparación de las semillas e inoculación de las plantas con hongos endofíticos

Se utilizaron microcormos de banano de 200 a 300 gramos de peso, los cuales fueron mondados e inoculados por cinco minutos en la suspensión de esporas (1.5×10^6 UFC/ml) correspondiente a E1 o E2, en función del tratamiento. Posteriormente, se sembraron en bolsas plásticas conteniendo sustrato tierra y arena (1:2) y llevados a aclimatación en vivero cubierto con un sarán de 60% de polisombra, donde fueron mantenidos durante un periodo de 3 meses antes de la siembra definitiva en campo (anexo 7). Este período de aclimatación permitió el establecimiento y colonización de los hongos endofíticos en el sistema radical de la planta y aseguro el desarrollo óptimo de los materiales.

3.3.4 Preparación del terreno y labores agrícolas

Se selecciono un terreno plano con buen drenaje y se procedió, de acuerdo con el diseño de bloques y parcelas, a realizar el rayado, estaquillado, ahoyado y siembra de las unidades experimentales. En cuanto al sistema de siembra, la disposición de las plantas en el terreno se hizo en rectángulo con 2.0 m entre plantas de fila y 2.5 m entre calles, para un total de 64 plantas por parcela, con una densidad de 2.500 plantas/ha. Se aseguro que la ubicación de las parcelas permitiera recibir inóculo natural de *M. fijiensis* desde parcelas infectadas cercanas.

La fertilización se realizó en función del análisis físico-químico del suelo, utilizando el programa de fertilización foliar y edáfica recomendada por el grupo de Musaceas CATIE-INIBAP. Se realizaron prácticas culturales como: deshija, deshoja sanitaria (despunte, deslaminado o cirugía) en función de las condiciones ambientales. Las cuales fueron iniciadas a partir del cuarto mes de siembra en campo.

En cuanto al manejo de la Sigatoka negra, la primera aplicación de los extractos botánicos (B1 y B2) y el químico (fungicida protectante, clorotonatil) en la dosificación apropiada se hizo alrededor del sexto mes de siembra, después de una primera lectura de incidencia y severidad de la Sigatoka negra, que mostró niveles superiores a 100 unidades de

infección. Una vez iniciada las primeras aplicaciones, se continuaron con aplicaciones semanales o quincenales. En todos los casos estas aplicaciones se hicieron en horas muy tempranas de la mañana o en la tarde cuando la radiación solar era mínima y poco efecto del viento. Las aplicaciones del fungicida (clorotalonil) se hicieron en intervalos de 21 días con una bomba de motor de 5 HP, equipada con un nebulizador y espiga de aplicación, de tal forma que se aseguro un tamaño de gota adecuado.

3.3.5 Evaluación de la Sigatoka negra

Para efectos de evaluación de la protección o inducción de resistencia contra la Sigatoka negra, cada semana se evaluó (durante el periodo vegetativo) el estado de evolución de la enfermedad en las hojas II, III y IV atendiendo la escala de síntomas de Fouré (1985) en las cuatro plantas de cada uno de los tratamientos. La severidad de la enfermedad, se evaluó en las mismas cuatro plantas por tratamiento cada dos semanas, mediante la escala de Stover modificada por Gauhl (1989) durante el crecimiento vegetativo y una sola lectura fue realizada al momento de la floración.

Las siguientes variables fueron registradas al mismo tiempo de la evaluación de la severidad:

- Total de Hojas (TH): es el número de hojas de la planta en el momento de la evaluación, sin considerar hojas agobiadas, secas o senescentes.
- Hoja Más joven Enferma (HMJE): es la hoja más joven en presentar la mancha en estado 6 (según Fouré 1985), que corresponde a una mancha con halo amarillento y el centro seco de color grisáceo.

Los datos recolectados para la evaluación de las variables de infección de la Sigatoka negra se complementaron con el uso de la metodología sugerida por Marín y Romero (1998), los cuales integra información de datos sobre Emisión Foliar pasada y actual, para el cálculo de Ritmo de Emisión Foliar (REF), Corrección Candela (CC), Coeficiente de la Enfermedad (CE), Suma Bruta (SB) y Estado de Evolución (EE). Se obtuvo el Índice de Infección (IND) a partir de la información recolectada con la escala de Gauhl. Desde la estación agrometereológica del CATIE, se registraron las variables más estrechamente relacionadas con la epidemiología de la Sigatoka negra, tales como: temperatura, humedad relativa y precipitación el tiempo que duro el experimento.

3.3.6 Variables fenológicas y de producción para los experimentos

Estas variables fueron tomadas en las mismas cuatro plantas que fueron evaluadas desde el inicio del estudio: Días de Siembra a Floración (DSF), Altura de la Planta a Floración (APF) medida desde el suelo hasta la intersección del pedúnculo de la inflorescencia con la última hoja emitida y la Circunferencia del Pseudotallo a la Floración (CPF) tomado en la planta justo a la altura de un metro del suelo.

3.3.7 Identificación de metabolitos secundarios mayoritarios de los extractos botánicos mediante el análisis fitoquímico.

Con el fin de conocer la composición química de *Momordica charantia* y *Senna reticulata* se llevo a cabo los análisis fitoquímicos de estos extractos botánicos (B1 y B2). Para la obtención de las muestras se realizaron extracciones sucesivas con agua y mezclas de etanol-agua en proporciones diferentes (7:3 y 1:1), de tal forma que se pudieran manejar diferentes polaridades y de este modo lograr un mayor agotamiento del material vegetal seco. El material vegetal se obtuvo mediante la trituración en molino de cuchilla y martillo de la parte aérea seca de la planta, seguido por la extracción utilizando el método de maceración. Para realizar el tamizaje fitoquímico se emplearon técnicas simples, rápidas y selectivas para un determinado compuesto. Por tanto, se determino, ensayos específicos para cada metabolito secundario, de acuerdo a sus características químicas, como son: pruebas de coloración, sustancias que formen precipitados, uso de cromatografía, localización de ciertas bandas de absorción en el infrarrojo, entre otros. Para el tamizaje fitoquímico, fueron contratados los análisis en el Laboratorio de Fitoquímica del Departamento de Química de la Universidad del Tolima en Colombia.

3.4 Descripción de los tratamientos

Los tratamientos estaban constituidos por la combinación de tres factores: tipos de material de siembra (cormo y vitroplantas); tratamientos a nivel radical: hongo Endofítico uno, (E1), hongo Endofítico dos (E2), Químico (Q) y Testigo (T) (cuadro 1). El tratamiento químico consistió en la aplicación del nematicida de uso local al momento de la siembra, a la floración y en la dosis recomendada.

Cuadro 1: Distribución de tratamiento radical por tipos de semilla. E1: Hongo endofítico 1; E2: Hongo endofítico 2; Q: Químico (nematicida); T: testigo.

Tipos de material de siembra	Tratamientos Radical			
	E1	E2	Q	T
Cormos (C)	CE1	CE2	CQ	CT
Vitroplantas (V)	VE1	VE2	VQ	VT

Los tratamientos a nivel foliar fueron: *Momordica charanta* (extracto botánico uno: B1), *Senna reticulata* (extracto botánico dos: B2), químico (Funguicida protectante: Q) y testigo (no tratado) (cuadro 2).

Cuadro 2: Distribución de tratamiento Foliar por tipos de semilla. B1: Botánico 1; B2: Botánico 2; Q: Químico (Funguicida); T: testigo.

Semilla*Trat. Radical	Tatamiento foliar			
	B1	B2	Q	T
1. CE1	CE1B1	CE1B2	CE1Q	CE1T
2. CE2	CE2B1	CE2B2	CE2Q	CE2T
3. CQ	CQB1	CQB2	CQQ	CQT
4. CT	CTB1	CTB2	CTQ	CTT
5. VE1	VE1B1	VE1B2	VE1Q	VE1T
6. VE2	VE2BQ	VE2	VE2Q	VE2T
7. VQ	VQB1	VQB2	VQQ	VQT
8. VT	VTB1	VTB2	VTQ	VTT

El diseño experimental de las parcelas fue en bloques completos al azar, con tres repeticiones, cada unidad experimental estaba constituida por una parcela con 36 plantas. Sobre cada uno de las ocho unidades experimentales (cuadro 2) se conformo el bloque de tratamiento foliar. En cada unidad experimental se ubicaron subparcelas (Figura 1) con muestreo de cuatro plantas por subparcela, a las cuales se le aplicaron cada uno de los tratamientos respectivos para el control de Sigatoka negra (B1, B2, Q y T). Con el fin de reducir el riesgo de contaminación de plantas vecinas a aquellas que fueron objeto de aspersión foliar, se hizo una aplicación localizada sobre las cuatro plantas de cada una de las esquinas de la subparcela e igualmente, las plantas borde sirvieron a éste propósito. Se tomaron, de la misma manera, precauciones en cuanto a la hora de aplicación, para evitar condiciones ambientales adversas.

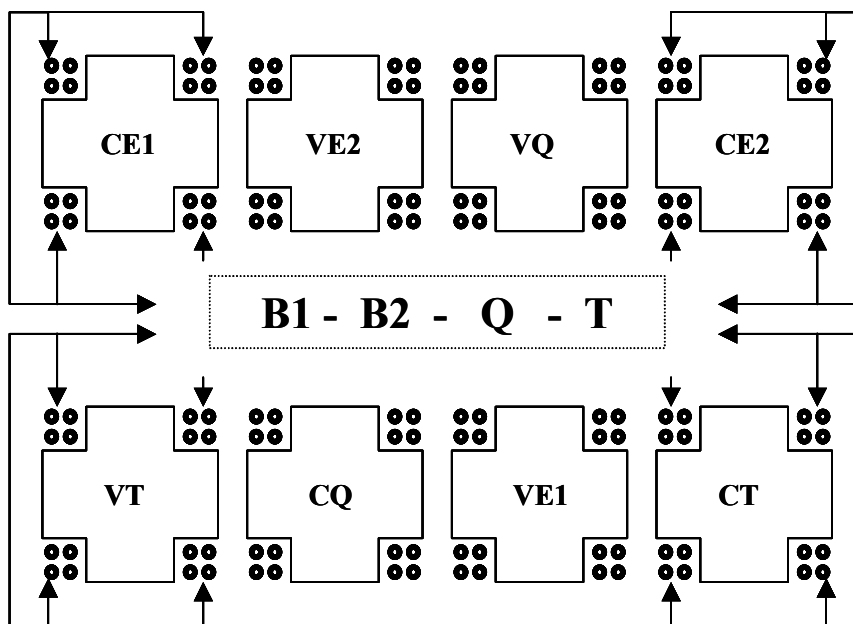


Figura 1: Ilustra el manejo del experimento para el control de Sigatoka negra/bloque/repeticón.

B1: botánico I; B2: botánico II; Q: químico y T: no tratado.

☐ : División de subparcelas (diseño parcela dividida)

● : planta seleccionada para ser tratada

Bajo estas condiciones, este diseño permitió suficientes grados de libertad tanto para el error de la parcela grande como el de la subparcela (cuadro 3).

Cuadro 3: Distribución de tratamientos por tipos de semilla, fuente de variación y grados de libertad del diseño estadístico empleado en esta investigación. Error experimental A (2 x 7). Error experimental B (3x2x8) y Error experimental C (8x3x4x3).

Fuente de Variación	Grados de libertad
Repeticiones	2
Tratamientos	7
Tipos de semilla	1
Tratamiento radical	3
Tipos de control (Interacción)	3
Error experimental A (Bloque*Semilla* Tratamiento radical)	14
Total parcelas	23
Tratamiento control Sigatoka negra	3
Tipo material de siembra x Trat. control Sigatoka negra	3
Trat. radical x Trat. control Sigatoka negra	9
Tipo material de siembra x Trat. control radical x Trat. control Sigatoka negra	9
Error experimental B (Bloque*Semilla*Trat.Radical*Trat,Foliar)	48
Error experimental C (Error de muestro)	288
Total General	383

3.5 Diseño Estadístico

El diseño que corresponde a este experimento es en bloques completos al azar. En cuanto al diseño de tratamientos es trifactorial, donde estarán los factores semillas y raíz en arreglo factorial, y el factor foliar como subparcela dentro del arreglo factorial.

B: Bloques

S: Semilla

R: Tratamientos a nivel radical

F: Tratamientos a nivel foliar

$$Y_{ijklm} = \mu + B_i + S_j + R_k + SR_{jk} + e_{ijk} + F_l + FS_{jl} + FR_{kl} + FSR_{jkl} + e_{ijkl} + \delta_{ijklm}$$

Y_{ijklm} : Respuesta de la Incidencia y la severidad de la sigatoka negra

μ: Incidencia y severidad de la Sigatoka negra

B_i : Efecto del i-ésimo bloque
 S_j : Efecto de la j-ésimo semilla
 R_k : Efecto del k-ésimo tratamiento a nivel radical
 SR_{jk} : Interacción Semilla * tratamiento a nivel radical
 e_{ijkl} : Error Experimental (del primer factorial)
 F_l : Efecto del l-ésimo tratamiento a nivel foliar
 FS_{jl} : Interacción tratamiento a nivel foliar* Semilla
 FR_{kl} : Interacción tratamiento a nivel foliar* tratamiento a nivel radical
 FSR_{jkl} : Interacción tratamiento a nivel foliar* Semilla*tratamiento a nivel radical
 e_{ijkl} : Error experimental de la subparcela del tratamiento foliar
 δ_{ijklm} : Error de submuestreo

3.5.1 Análisis Estadístico

Una vez colectada toda la información, se realizó el análisis mediante una ANAVA y una prueba de Duncan para establecer diferencias mínimas significativas entre los tratamientos con el sistema SAS de apoyo estadístico, Asimismo, se construyeron gráficos con los valores promedios de las variables: EE, REF; TH, HMJE e IND en función del tiempo, además, de las variables fenológicas. Igualmente, se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) expresada en la variable EE y el IND, usando la siguiente formula:

$$ABCPE = \text{SUM} (y_i + y_{i+1})/2 * dt_i$$

Donde:

Y_i = Proporción de enfermedad (incidencia o severidad) afecta en la iésima observación

T_i = Tiempo (días) después de la inoculación en la iésima observación

SUM = Sumatoria n observaciones

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación en campo de la protección o inducción de resistencia de los hongos endofíticos sobre la incidencia y severidad de la Sigatoka negra.

Las plantas que fueron inoculadas con hongos endofíticos se mantuvieron en vivero durante 3 meses, antes de ser sembradas en las parcelas experimentales de acuerdo al diseño. Las lecturas de Sigatoka negra se iniciaron al sexto mes después de la siembra en campo, obteniéndose un total de 15 lecturas para la Escala de Fouré (1985) y 9 en la Escala de Stover modificada por Gauhl (1989). A floración se hizo la lectura correspondiente de severidad.

El género *Trichoderma* ha sido sugerido por muchos autores como agente de control biológico con propiedad antagonista, basada en la activación de múltiples mecanismos de acción, destacándose la capacidad de producir sustancias que promueven el crecimiento e induzcan mecanismos de defensa en las plantas (Howell 2003; Harman *et al.* 2004; Benítez *et al.* 2004; Jaizme-Vega 2003; Orozco-Santos y Orozco-Romero 2006; Sikora y Pocasangre 2006). A pesar de esto, los resultados estadísticos obtenidos en esta investigación durante la fase de crecimiento vegetativo, revelan que los tratamientos de hongos endofíticos, no presentan diferencias significativas ($p > 0.05$) en las variables: número Total de Hojas (TH) y Ritmo de Emisión Foliar (REF), es decir que no se presentó un efecto positivo en cuanto a crecimiento de las plantas; sin embargo, en la variable Estado de Evolución (EE) y el Índice de Infección (IND) que miden el grado de enfermedad, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos. Es importante resaltar que a nivel de patógenos de suelo, un buen número de investigadores están de acuerdo en privilegiar los hongos endofíticos mutualistas de los géneros *Trichoderma* y *Fusarium* como excelentes controladores de nematodos (Pocasangre *et al.* 2006; Sikora 2003; Jaizme-Vega 2003). Partiendo del principio de mejor respuesta de protección al ataque de patógenos al contar con plantas que a nivel radical se encuentran o permanezcan sanas durante el ciclo del cultivo, bien sea por la utilización de hongos endofíticos o aplicación del nematicida, se esperaría que la condición de tener un sistema radical sano, permite a la planta ganar vigor y por consiguiente, disminuir el estrés causado por factores bióticos y abióticos. Lo anteriormente expresado, es consistente con los resultados de esta investigación, donde para la variable EE (figura 2a), el tratamiento E2 es el de menor valor de Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE), seguido por el tratamiento Q (aplicación de nematicida), sin presentar diferencias

significativas entre estos dos. No obstante, en la variable IND (figura 2 b), el tratamiento Q presento un menor porcentaje de infección, seguido por E2, en este caso, se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellos. A partir de esta información, se plantea que estos agentes de biocontrol están ejerciendo algún efecto dentro de la planta, liberando compuestos que induce resistencia sistémica en la planta contra patógenos, como en este caso la Sigatoka negra revelando menor severidad a la enfermedad.

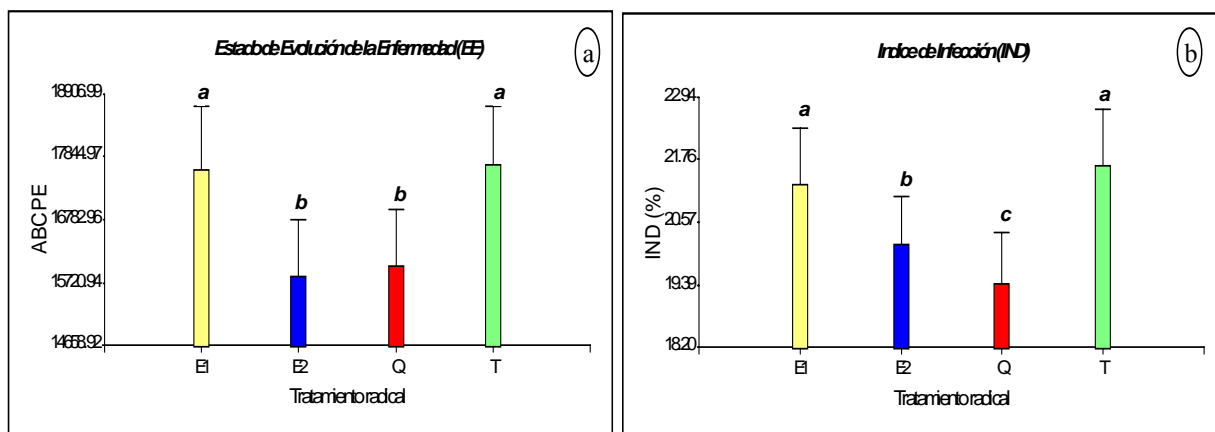


Figura 2: Efecto de los tratamientos aplicados a nivel radical: (a) Estado de Evolución (EE), expresado en el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE), y (b) el Índice de Infección (IND), expresado en porcentaje (%). E1: hongo Endofítico 1; E2: hongo Endofítico 2; Q: Químico (con nematicida); T: sin aplicación ni de hongo ni de químico.

Al realizar el análisis del progreso de la enfermedad a través del tiempo, para los tratamientos de bioproductos aplicados a nivel radical, se logro evidenciar un comportamiento homogéneo de las variable EE y HMJE. En cuanto a EE (figura 3a), se puede observar que sobresalen dos picos en la segunda y sexta lectura, posiblemente debido a las condiciones climáticas que se presentaron una semana antes, con precipitaciones altas, temperatura promedio de 24 °C, y una humedad relativa que permanece todo el año por encima del 80%; lo cual permitió condiciones favorables para estimular la germinación de esporas y el desarrollo de la enfermedad, dando como resultado algunas evaluaciones con niveles altos de EE. Para HMJE (figura 3b), se presento un mayor valor en la cuarta lectura, traducido esto a una menor severidad de la enfermedad, esto se mantiene hasta llegar a la novena lectura en donde descende un poco, ya que por esta fecha la presión del inóculo aumento como se puede corroborar en la ultima lectura de la figura 3a, las cuales fueron evaluadas en la misma

semana. En cuanto al efecto del tipo de semilla (figura 3c), se encontró que existe diferencias significativas ($p < 0.05$) para la variable HMJE, favoreciendo a las vitroplantas respecto al cormo.

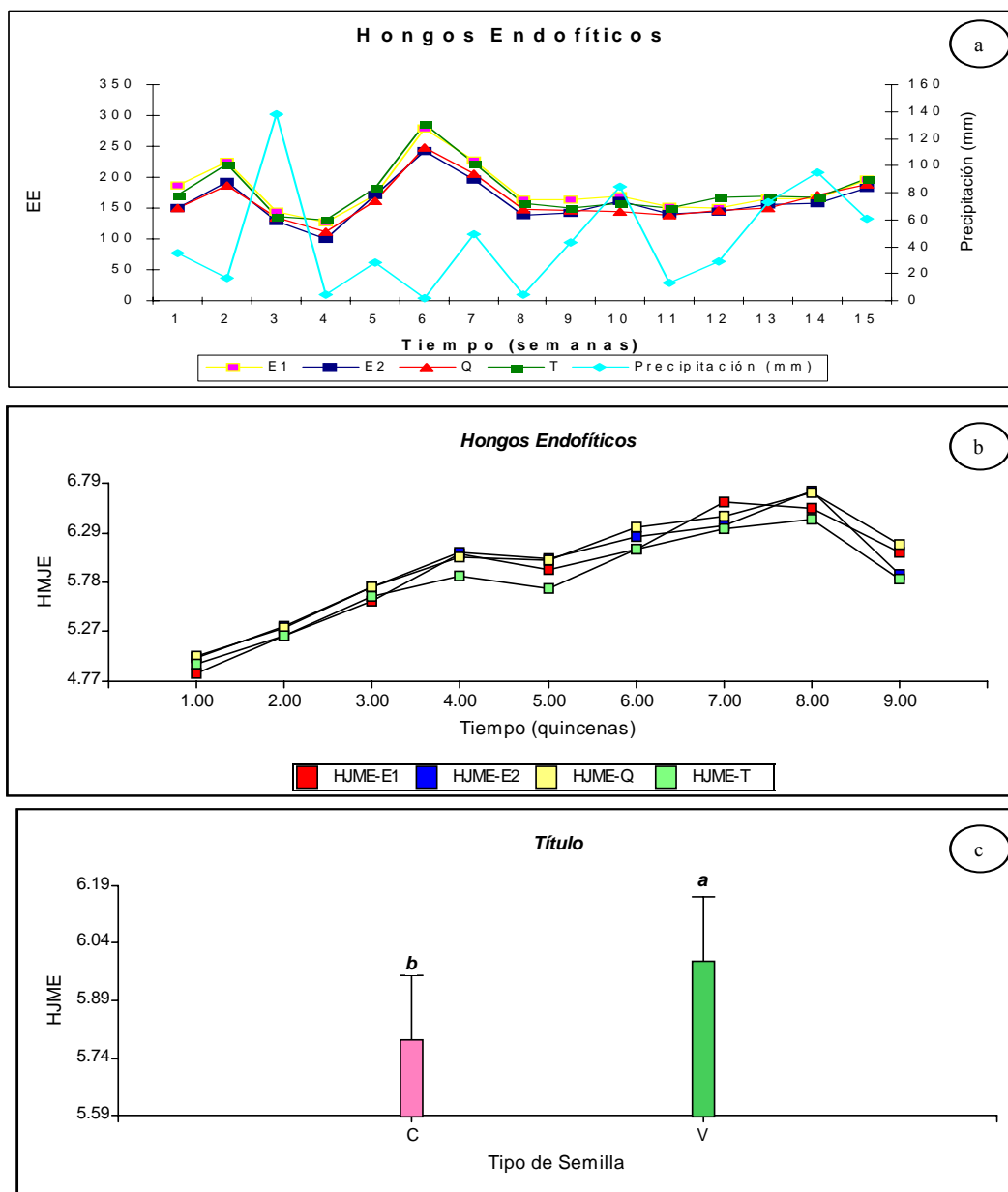


Figura 3: Representación del progreso de la enfermedad para las variables: (a) Estado de Evolución (EE), (b) Hoja Más Joven Enferme (HMJE), (c) Efecto de los tipos de semilla empleados: cormo (C) y vitroplanta (V) sobre la variable HMJE.

A floración, para la variable THF, no se presentó diferencias significativas ($p>0.05$) entre los tratamientos aplicados a nivel radical. Sin embargo, para las variables: HMJEF (figura 4a) y el INDF (figura 4b) se encontraron diferencias significativas ($p<0.05$). En la primera variable, el tratamiento Q (nematicida) se mantiene con el mejor comportamiento seguido por el tratamiento E2 al presentar un HMJE alrededor de la hoja 5.7. Asimismo, el menor porcentaje de IND lo registra el tratamiento E2 aproximadamente con un 18%. Esto refuerza una vez más, lo planteado como explicación a la figura 2a y b, en donde se reconoció que la planta cuando se encuentra sana a nivel radical, refleja una mayor protección al ataque de enfermedades y plagas. Este planteamiento coincide con los resultados obtenidos por Yedidia *et al.*(1999), en donde trabajaron con plántulas de pepino, inoculadas a nivel radical con *Trichoderma harzianum* como agente biocontrolador, el cual inducía respuestas de defensa en la planta tanto en raíz como en hoja, aumentando la actividad de las peroxidasas, asociadas con la producción de compuestos fungitóxicos. Bigirimana *et al.* (1997), trabajando con el mismo biocontrolador, aplicados al sistema radical de plantas de frijol, reportaron que inducía resistencia a nivel foliar y protegía contra enfermedades causadas por *Botritis cinerea* y *Colletotrichum lindemuthianum*. De esta forma, existen varios estudios en donde discuten el efecto que tienen estos hongos endofíticos en diversos patosistemas actuando como inductores de resistencia (Howell 2003; Benítez *et al.* 2004; Harman *et al.* 2004).

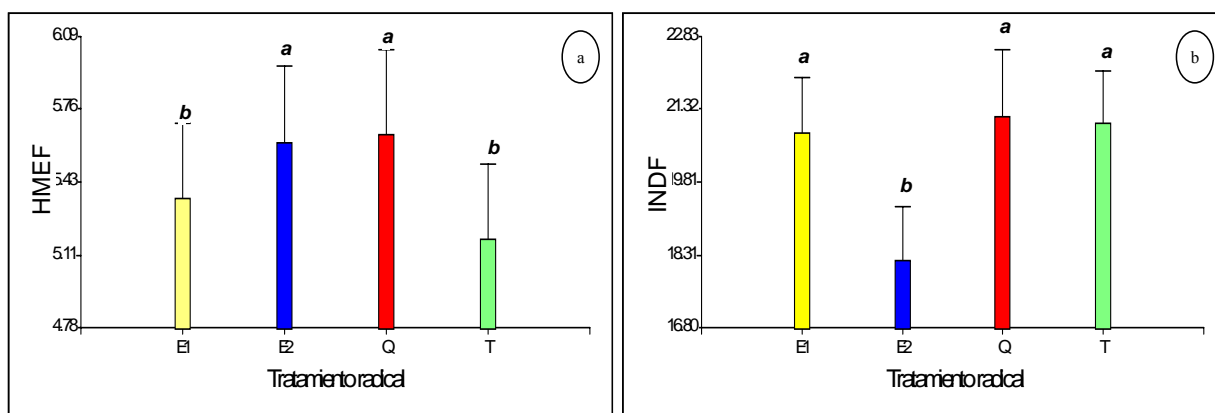


Figura 4: Efecto de los tratamientos aplicados a nivel radical sobre las variables: (a) Hoja Más Joven Enferma a Floración (HMJEF) y (b) Índice de Infección a Floración (INDF), para la evaluación de la Sigatoka negra.

4.2 Evaluación de la protección o inducción de resistencia, mediante la aplicación foliar de dos extractos botánicos “promisorios” sobre la incidencia y la severidad de la Sigatoka negra en condiciones de campo.

La aplicación de los extractos botánicos “promisorios” B1 (*Momordica charantia*) y B2 (*Senna reticulata*) a nivel foliar, se realizaron cuando las unidades de la enfermedad estaban por encima de las 100 unidades, esto fue aproximadamente al sexto mes después de la siembra, al realizarse la primera lectura de Emisión Foliar (EF) y dar inicio al plan de evaluaciones previstas en el tiempo acordado. Es importante señalar que se tuvo un testigo (T) sin aplicación y un tratamiento químico (Q) con aplicación de un fungicida protectante (clorotalonil) en intervalos de 21 días.

Al analizar los datos obtenidos en la fase de crecimiento vegetativo, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) para las variables TH, HMJE, EE y el IND. Para la primera (figura 5a) y segunda variable (figura 5b), los resultados indican que el mejor comportamiento se observó en el tratamiento Q. En lo que respecta a TH los tratamientos B1, B2 y T no presentaron diferencias significativas entre ellos, a diferencia de la variable HMJE, en donde el tratamiento B1 fue el que presentó el segundo valor más alto. La variable REF no presentó diferencias significativas ($p > 0.05$) en ninguno de los tratamientos.

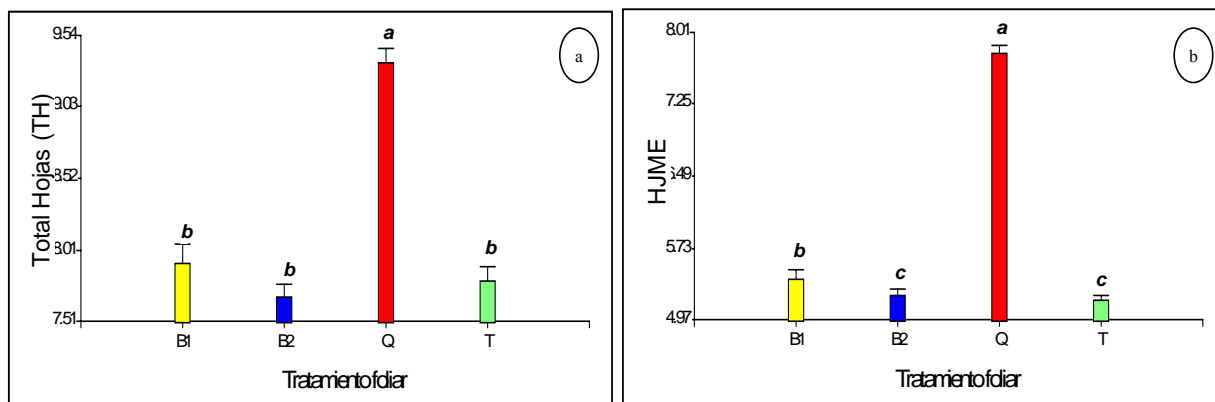


Figura 5: Ilustra las variables: (a) número Total de Hojas (TH) y (b) Hoja Más Joven Enferma (HJME) respecto a cada uno de los tratamientos aplicados a nivel foliar: extractos botánicos B1 (*Momordica charantia*); B2 (*Senna reticulata*); Q (clorotalonil) y T (sin aplicación).

En los últimos cinco años, se han registrado resultados con el uso de extractos botánicos para el control de enfermedades foliares (Sepúlveda *et al.* 2003; Kagale *et al.* 2004; Fosfana 2005). En el caso de *M. fijiensis* – Musa, es poca la literatura reportada, y los grupos

activos en esta temática han trabajado principalmente a nivel de laboratorio e invernadero (Obledo *et al.* 2004; Arciniegas 2002). En campo, las investigaciones desarrolladas con estos bioproductos revelan que existe un efecto positivo de protección contra la Sigatoka negra (Hernández *et al.* 2006; Marín *et al.* 2006; Polanco 2004; Riveros *et al.* 2003). En general, estos autores discuten que a pesar de obtener resultados favorables, los fungicidas muestran un mejor comportamiento frente al control de la enfermedad.

Lo anterior, coincide con los resultados obtenidos en esta investigación, en donde, se encontraron diferencias significativas ($p < 0.05$) para la variable EE, expresado en el Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE), (figura 6a) y para el IND (figura 6 b), el cual esta expresado en % de infección. El menor valor de ABCPE lo presento el tratamiento Q seguido por el tratamiento B2, sin presentar diferencias significativas con respecto a tratamiento B1. En el caso del IND, el B2 difiere del resto de tratamientos; no obstante, el tratamiento Q se mantienen con los niveles más bajos en cuanto a desarrollo de la enfermedad.

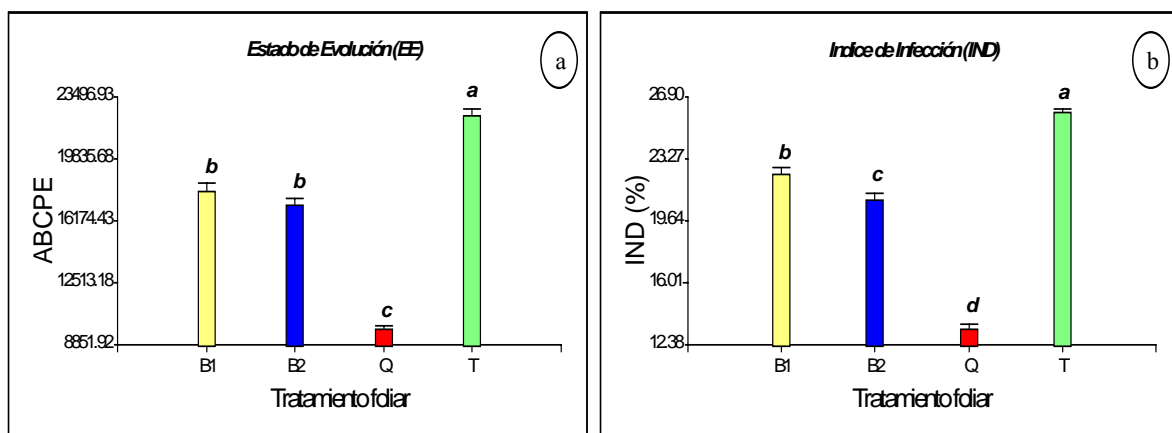


Figura 6: (a) Describe la variable Estado de Evolución de la enfermedad (EE), expresado en el Área bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE) e (b) Índice de Infección (IND) expresado en porcentaje, para el control de la Sigatoka negra en campo.

El comportamiento del desarrollo de la enfermedad a través del tiempo, durante el crecimiento vegetativo para las variables TH (figura 7a) y HMJE (figura 7b), fue homogéneo hasta la quinta lectura, y a partir de esta se observa que el tratamiento Q inicia una separación de forma ascendente, con un mayor número de hojas y la posición de la HMJE en un valor más alto, esto indica que existe una mayor vigorosidad y menor severidad de la Sigatoka

negra en la planta. Lo que respecta a las variables EE (figura 7c) y el IND (figura 7d), se puede observar que en la primera semana los tratamientos inician aproximadamente, desde un mismo nivel de enfermedad; para el caso de EE, empiezan a sobresalir dos picos en la segunda y sexta semana, debido a un aumento en la precipitación semanas atrás que reunieron las condiciones ambientales para activar el patógeno, teniendo como resultado un aumento de EE. También, se puede observar que existe un comportamiento homogéneo en los tratamientos, en donde Q siempre se conserva niveles más bajos tanto para EE como en el IND; sin embargo, al final de las lecturas se evidencia una aproximación de los tratamientos B1 y B2 hacia lo expresado por el tratamiento Q.

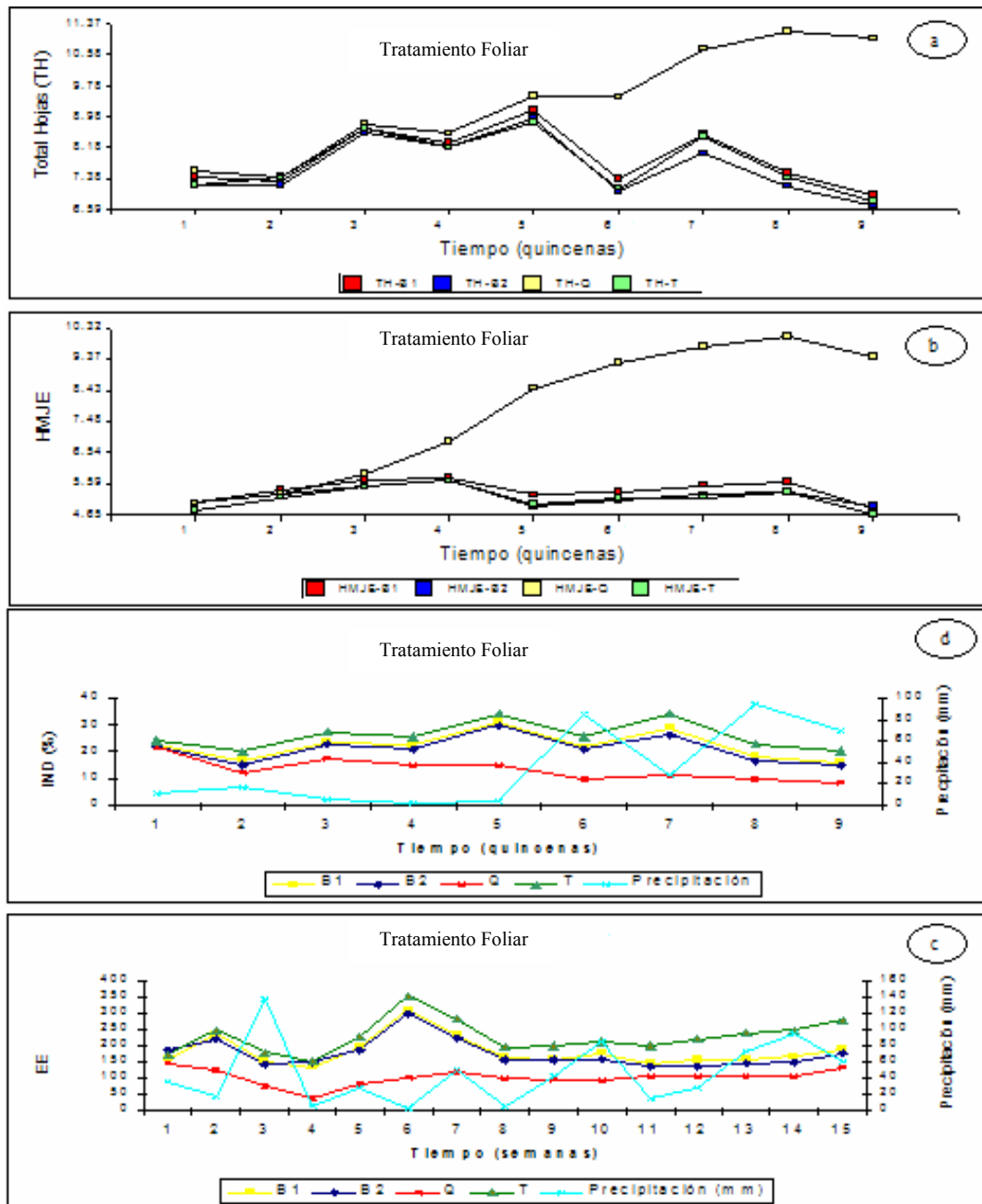


Figura 7: Ilustra a través del tiempo el comportamiento de los tratamientos foliares: extracto botánico B1, Extracto botánico B2; Q (clorotalonil); T (no aplicación) sobre las variables: (a) TH; (b) HMJE; (c) EE y (d) IND. TH-B1: Total de Hojas Botánico 1; TH-B2: Total de Hojas Botánico 2; TH-Q: Total de Hojas Químico; TH-T: Total de Hojas Testigo. HJME-B1: Hoja Más Joven Enferma-Botánico 1; HJME-B2: Hoja Más Joven Enferma-Botánico 2; HJME-Q: Hoja Más Joven Enferma-Químico; HJME-T: Hoja Más Joven Enferma-Testigo.

Los resultados a floración para las variables THF (figura 8a), HMJEF (figura 8b) y el INDF (figura 8c), se encontró que existía diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en cada una de ellas, con efecto favorable para el tratamiento Q. En INDF, se observa claramente que existe diferencias significativas entre todos los tratamientos, corroborando que el B2 se mantiene como uno de los mejores tratamientos para el control de la Sigatoka negra.

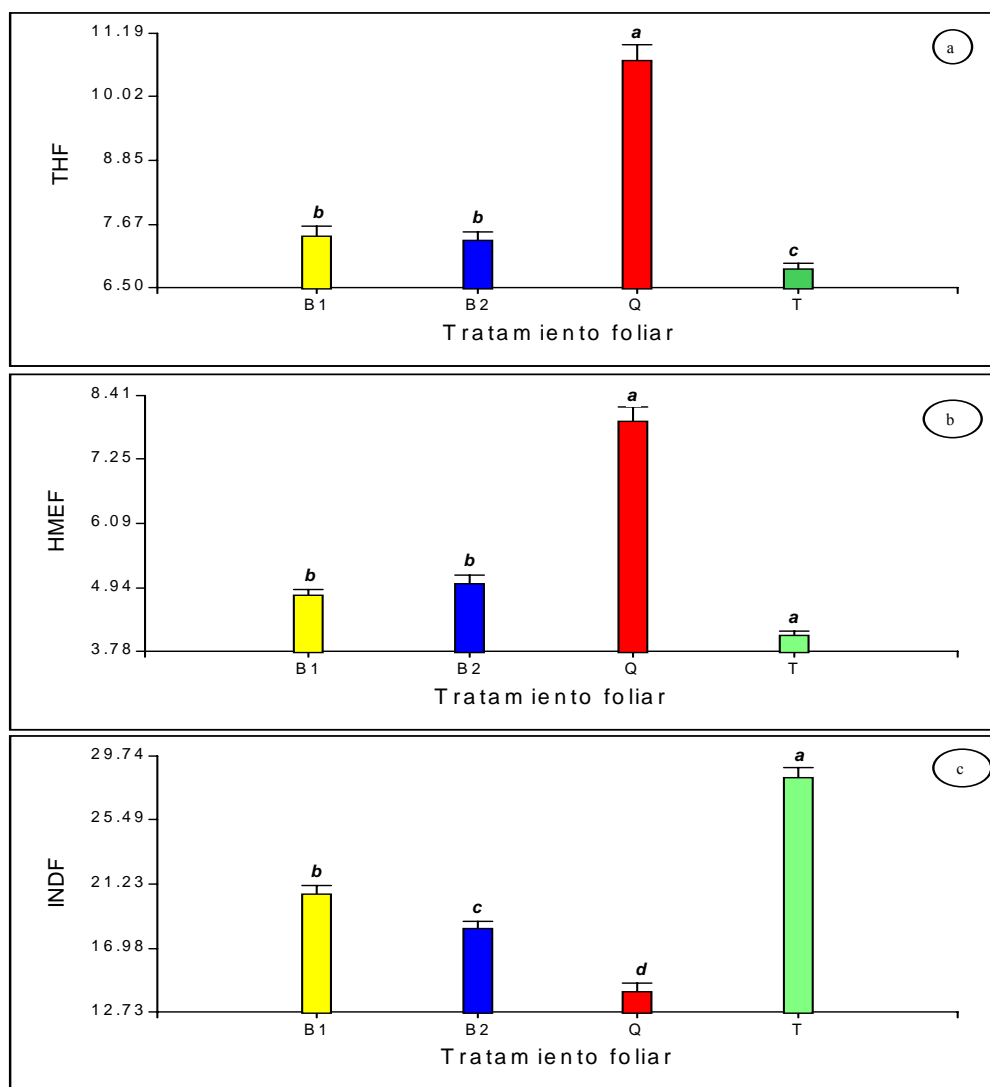


Figura 8: Efecto de los tratamientos foliares sobre: (a) número Total de Hojas a Floración (THF); (b) Hoja Más Joven Enferma a Floración (HMJEF) y (c) Índice de Infección a Floración (INDF) para el control de la Sigatoka negra en campo.

En resumen, el cuadro 4, coincide con lo discutido anteriormente para las variables EE y el IND, en donde los bioproductos B2 a nivel foliar y el E2 a nivel radical, se encuentra como los más promisorios para la protección de la Sigatoka negra. Sin embargo, en todos los casos se ve claramente que Q (fungicida) ejerce mayor control sobre la Sigatoka negra al presentar valores más bajos que el resto de tratamientos. En el caso de Q (nematicida) aplicado a nivel radical, se comporto como el mejor tratamiento, ratificando la teoría de que planta sana resiste mejor al ataque de patógenos. A nivel de tipo de semilla, las vitroplantas presentaron valores bajos en la variable EE, expresado en ABCPE con respecto a los cormos, esto se podría explicar a que los cormos en su preparación para someterlos a la inmersión con la suspensión de hongos endofíticos, sufren lesiones que aunque permiten la penetración o colonización directa de los biocontroladores, también, genera grandes cantidades de sustancias toxicas tipo fenoles y/o quinonas, las cuales podrían estar destruyendo los hongos endofíticos y por esta razón, su eficiencia fue menor para la protección contra la Sigatoka negra. El uso de vitroplantas facilita la tecnología de manejo de altas densidades en siembras anuales, con la alternativa de un manejo adicional para la Sigatoka negra al crear condiciones microclimaticas adversas al patógeno y dando un mayor campo de acción, para los hongos endofíticos y los extractos botánicos. De otro lado, si estamos hablando de la utilización de semillas inoculadas con hongos endofíticos a escala semicomercial, la utilización de vitroplantas es más eficiente, debido a que necesitan una menor cantidad de suspensión de esporas y menos espacio, lo que significa que el proceso de inoculación es más rápido y eficiente.

Cuadro 4: Datos epidemiológicos obtenidos de extractos de plantas para el manejo de la Sigatoka negra en plantas de banano.

Estado de Evolución de la Enfermedad (EE)		Indice de Infección (IND)	
Semillas	ABCPE	Semillas	ABCPE
Cormo	17551.8 a	Cormo	2276.9 b
Vitroplantas	160009.2 b	Vitroplantas	2395.87 a
Tratamientos aplicados a nivel foliar	ABCPE	Tratamientos aplicados a nivel foliar	ABCPE
Testigo	22385.2 a	Testigo	2961.02 a
Botánico 1	17942.5 b	Botánico 1	2546.08 b
Botánico 2	17069.6 b	Botánico 2	2375.41 c
Químico (fungicida)	9724.7 c	Químico (fungicida)	1463.03 d
Tratamientos aplicados en la raíz	ABCPE	Tratamientos aplicados en la raíz	ABCPE
Testigo	17705.5 a	Testigo	2457.85 a
H. Endofítico 1	17617 a	H. Endofítico 1	2409.9 a
H. Endofítico 2	15815 b	H. Endofítico 2	2283.71 b
Químico (nematicida)	15984.6 b	Químico (nematicida)	2194.08 c

4.3 Evaluación del efecto de interacción de los bioproductos (hongos endofíticos y extractos botánicos) sobre la incidencia y severidad de la Sigatoka negra en el campo.

El diseño estadístico de los tratamientos es trifactorial a nivel de: Tipo de semillas, Tratamiento radical y Tratamiento foliar, a partir de estos factores se hicieron los análisis con las posibles interacciones que pueden existir entre los tratamientos.

El análisis de las variables REF y EE obtenidas con la escala de Fouré, no detecto diferencias estadísticamente significativas ($p>0.05$) en ninguna de las interacciones entre los tratamientos. La escala de Gauhl para el IND no presento diferencias significativas; mientras que variables, TH y HMJE muestran diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$). Para la variable TH (Figura 9a), existe una interacción positiva entre los hongos endofíticos a nivel radical y el tratamiento Q a nivel foliar arrojando un mayor número de hojas destacándose la interacción Q*Q (nematicida/fungicida) con el valor más alto; de la misma forma el comportamiento de los tratamientos se mantiene en la interacción trifactorial, en este caso las interacciones TH-CTQ (figura 9b), TH-VE1Q y TH-VQQ (figura 9c), fueron las más favorecidas.

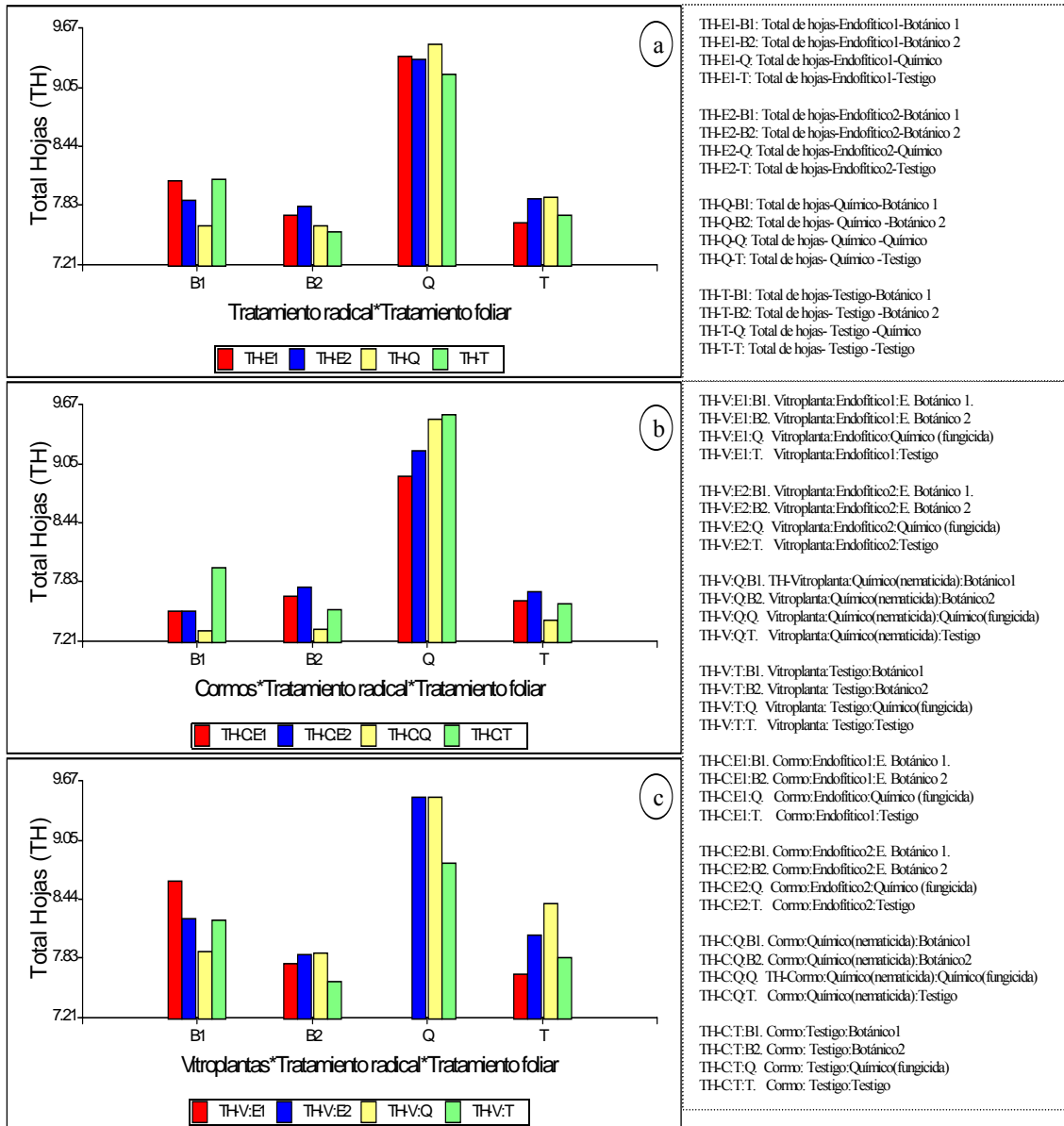


Figura 9: Representa el efecto de las interacción entre los tratamientos: (a) Tratamiento radical*tratamiento foliar; (b) interacción trifactorial Cormo*Tratamiento radical*tratamiento foliar y (c) Vitroplanta*Tratamiento radical*tratamiento foliar sobre la variable Total Hojas (TH).

Para la variable HMJE se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la interacción bifactorial [Tipo de Semillas*Tratamiento radical] y a nivel trifactorial [Tipo de Semilla*Tratamiento radical*Tratamiento foliar]. La figura 10a, ilustra que la interacción con las vitroplantas registra el mayor valor de HMJE. En cuanto a la figura 10b, los resultados indican que la interacción se mantiene, sin embargo, se enfatiza el efecto HMJE-V:Q:Q y HMJE-C:Q:Q (figura 10c) como el mejor protector contra la Sigatoka negra, con valores por encima de la séptima HMJE. Es importante resaltar que la interacción de las vitroplantas con los botánicos funciona mejor que la relación cormo con botánicos.

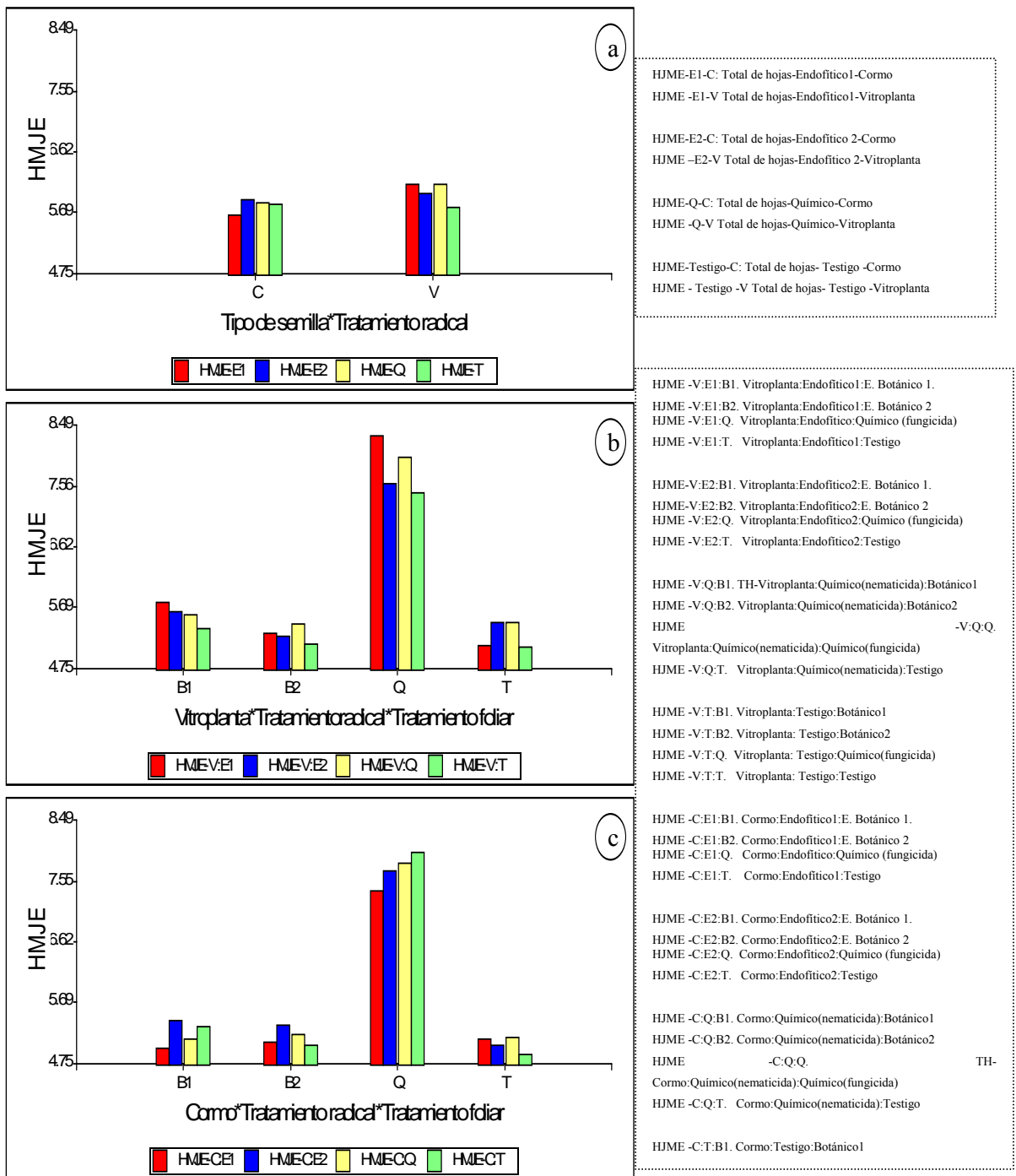


Figura 10: Ilustra las interacción entre los tratamientos: (a) Tipo de Semillas * Tratamiento radical; (b) interacción trifactorial Vitroplantas * Tratamiento radical * Tratamiento foliar y (c) Cormos * Tratamiento radical * Tratamiento foliar en cuanto a la variable TH durante el crecimiento vegetativo de las plantas de banano.

A floración las variables THF, HMJEF y el INDF evaluadas mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en interacciones, por ejemplo, en THF se destaca nuevamente la relación [Vitoplantas*tratamiento radical] (Figura 11a) y [Vitroplantas*Tratamiento foliar] (Figura 11b) con número mayor de hojas; sin embargo, en esta última se puede observar que los valores más altos se mantienen en aquellos en donde la interacción es [semilla*químico (fungicida)]. En La figura 11c, se observa claramente que los tratamientos aplicados en la raíz interactúan positivamente con el tratamiento Q aplicado a nivel foliar y de esta forma llegan a la etapa de floración con un número de hoja mucho mayor que el resto de las interacciones de los tratamientos.

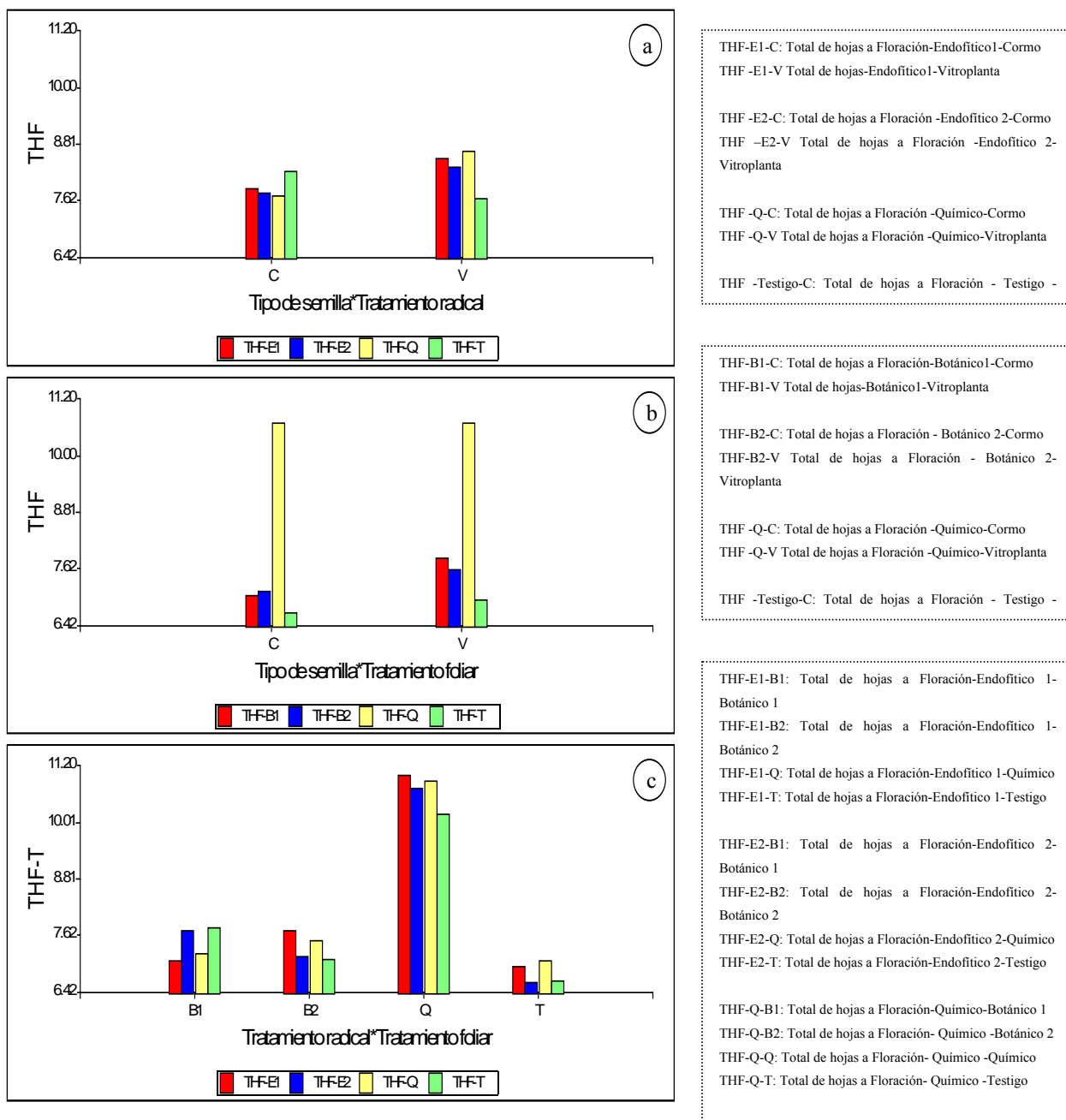


Figura 11: Representa las interacción de los tratamientos: (a) Tipo de semillas* hongos endofíticos; (b) Tipo de semillas* extractos botánicos y (c) Tratamiento radical* Tratamiento foliar para la variable THF.

La variable HMJEF, presento diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en todas las interacciones. Igualmente se mantiene favorecida la relación [Tipo de semillas* Tratamiento radical] (figura 12a) y nivel foliar [Cormo* Tratamiento químico] (figura

12b) al responder a una menor severidad de la enfermedad, La figura 12c corrobora una vez más, que la interacción bifactorial [tratamientos a nivel radical*químico a nivel foliar] son los más efectivos con respecto al resto de los tratamientos. Para la interacción trifactorial [Cormo*Tratamientos radical y el funguicida (Q)] (figura 34a) y [Vitoplantas*Tratamiento radical (E2 ó Q) *Q(funguicida)] (figura 13b) continúan comportándose como los favorecidos para la protección de la Sigatoka negra.

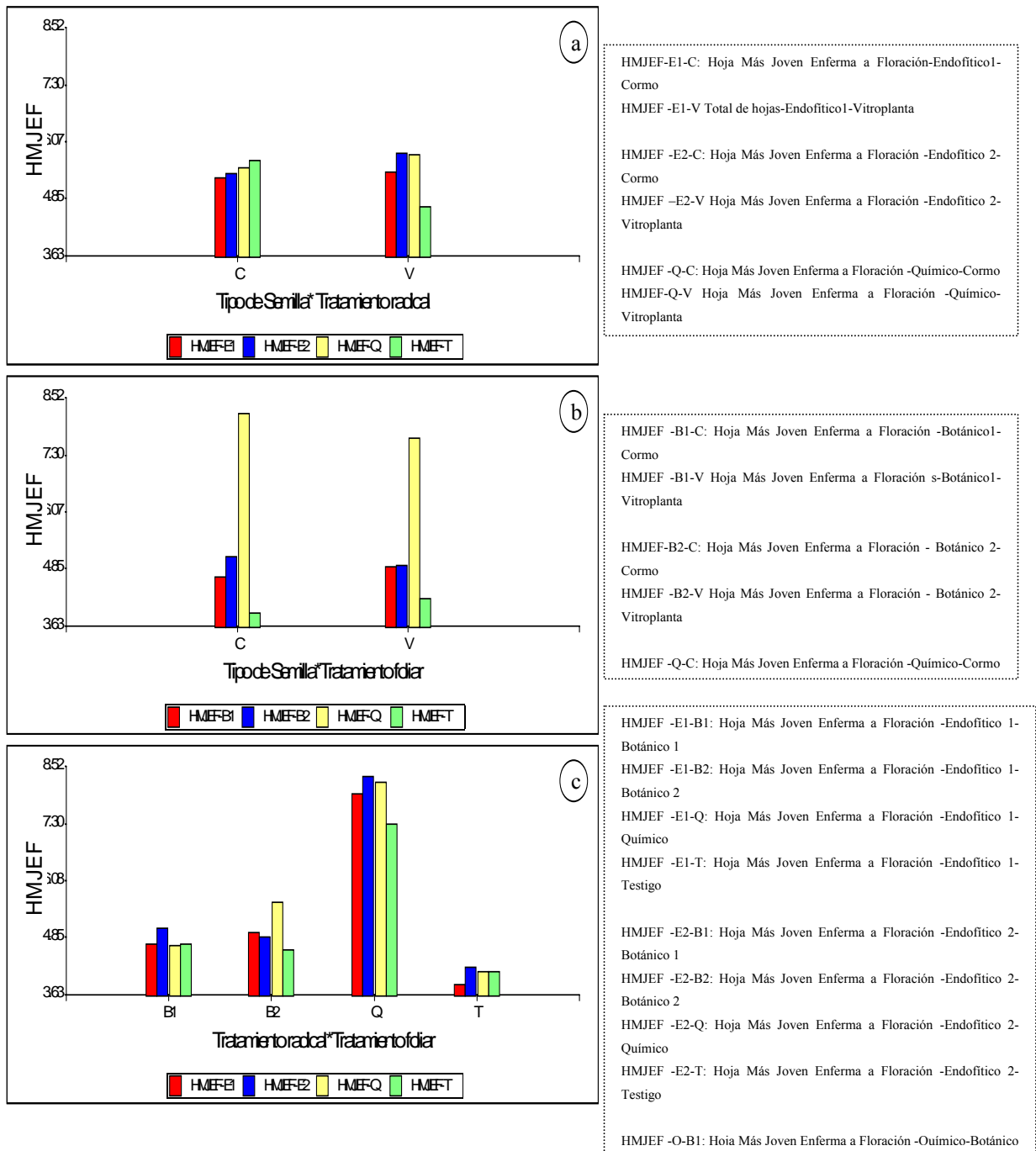


Figura 12: Representa las interacciones de los tratamientos: (a) Tipo de semillas*Tratamiento radical; (b) semillas* Tratamiento foliar y (c) Tratamiento radical*Tratamiento foliar en la variable HMJEF para el control de la Sigatoka negra durante la etapa de floración.

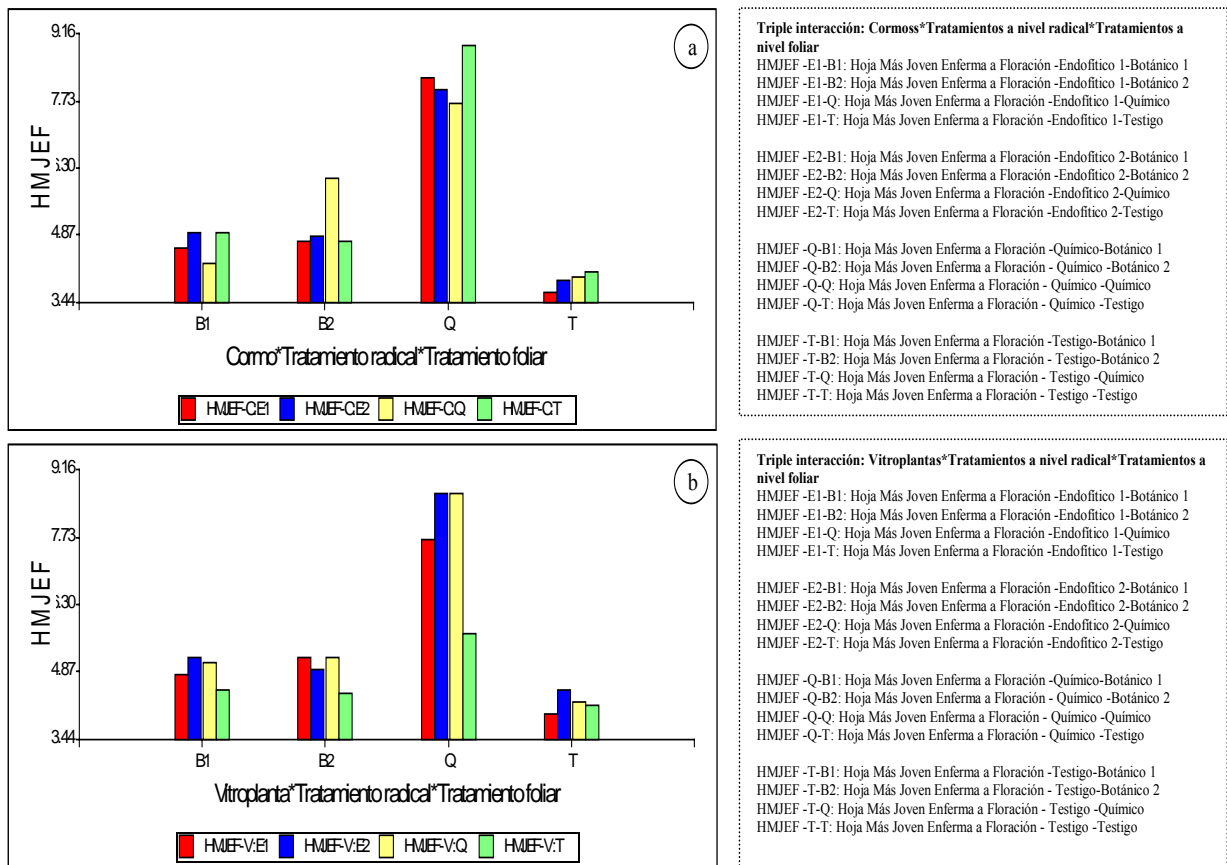


Figura 13: Representa la triple interacción entre los tratamientos, (a) Vitroplantas*Tratamiento radical* Tratamiento foliar; (b) interacción cormo* Tratamiento radical* Tratamiento foliar en cuanto a la variable HMJEF.

La figura 14 ilustra los resultados para la variable INDF, en donde se observa que la interacción V:E2 (vitroplanta*hongo Endofítico 2) fue la que presentó un menor valor, seguida de la interacción C:E2 (cormo* hongo Endofítico 2), esto significa que el E2 se mantiene como la cepa de hongo mayormente promisoría para fines de protección o inducción de resistencia para el control de la Sigatoka negra.

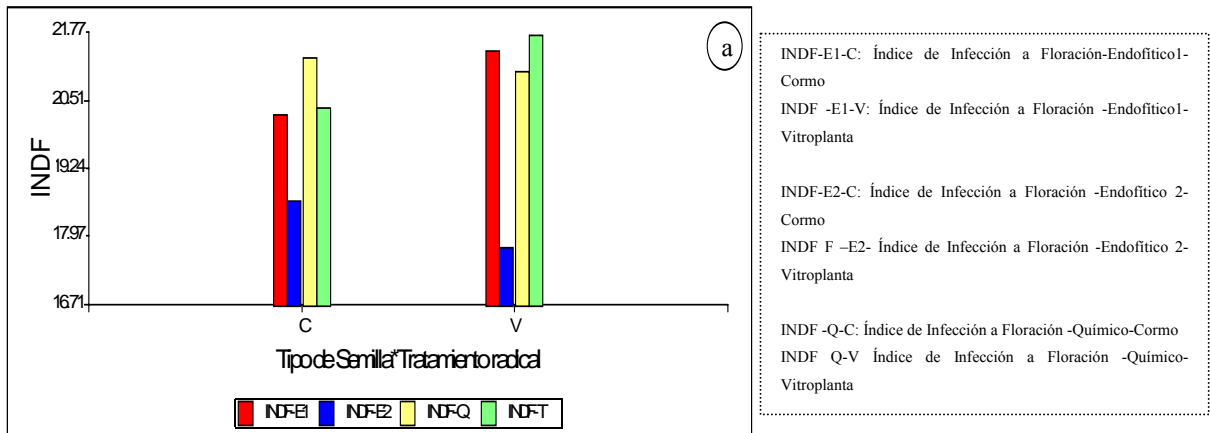


Figura 14: Efecto de la interacción Tipo de Semillas* Tratamiento radical sobre la variable INDF para el control de la Sigatoka negra.

4.4 Evaluación de algunas de las variables fenológicas para el análisis de Sigatoka negra.

La recolección de los datos se inicio cuando el 50 % de las plantas por tratamiento habían florecido, sin embargo debido a que el crecimiento de las plantas no fue homogéneo, estas lecturas requirieron más tiempo de lo que se tenía programado desde el inicio de la investigación. Por esta razón solo se logro llegar a esta etapa y no fue posible registrar la información de las variables establecidas para cosecha.

La información recolectada en campo fue: Días de Siembra a Floración (DSF), Altura de la Planta a Floración (APF) la cual consiste en medir desde el suelo hasta la intersección del pedúnculo de la inflorescencia con la última hoja emitida (cm) y Circunferencia del Pseudotallo a Floración (CSF), se mide a un metro de altura desde el suelo. Los resultados indican que en las variables DSF y APF, solo presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) en dos casos: el primero a nivel de tipo de semillas (figura 15a y b); en donde, las vitroplantas presentaron menor número de días de siembra a floración y mayor altura al ser comparadas con aquellos provenientes de cormos. El segundo caso, es entre tratamientos aplicados a nivel foliar (figura 15c y d), a pesar de que hubo diferencias significativas se encontró que en este proceso el tratamiento Q es el que presento menor número de días de siembra a floración y mayor altura de las plantas.

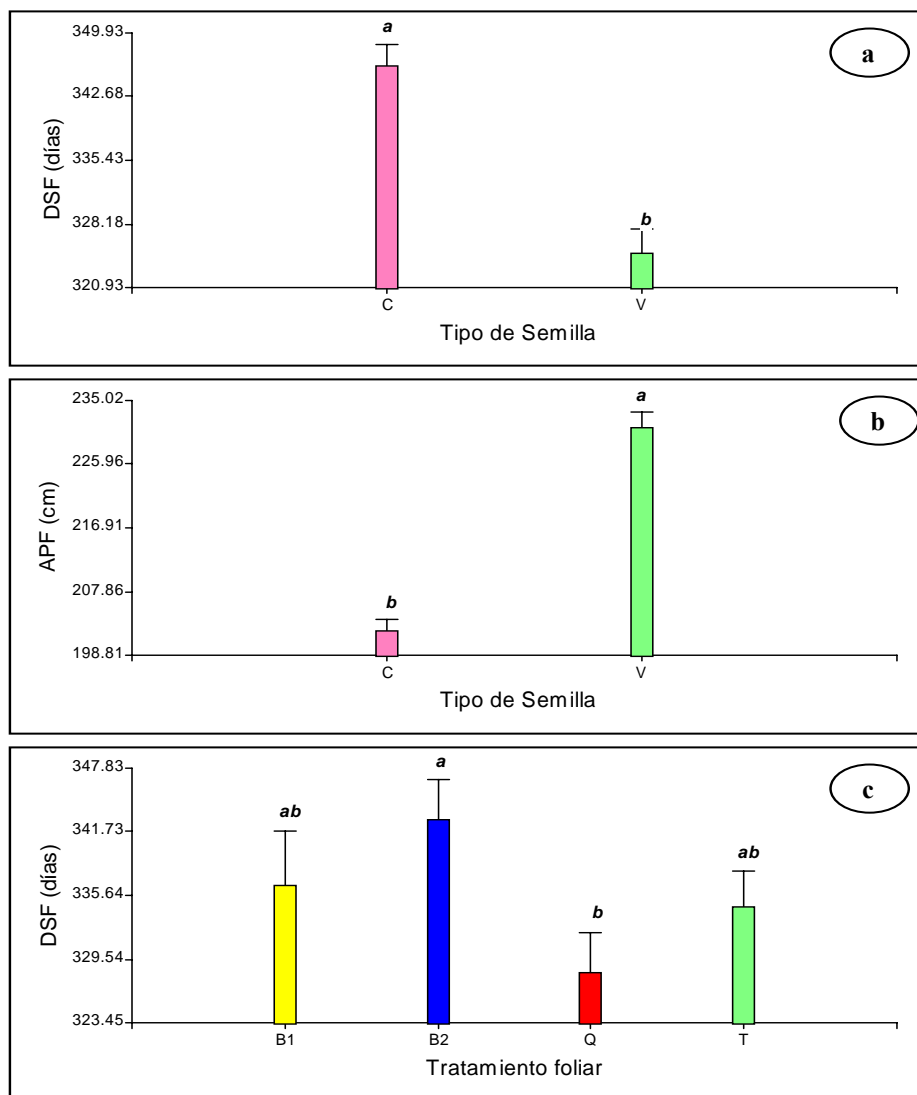


Figura 15: Efecto de los tratamientos tipo semilla sobre las variables: (a) Días de siembra a Floración (DSF); (b) Altura de las Plantas a la Floración (APF) y el efecto de los tratamientos aplicados a nivel foliar sobre las variables: (c) DSF y (d) APF.

Se analizó la variable circunferencia del Pseudotallo a Floración (CSF) encontrándose diferencias significativas ($p < 0.05$) en cuanto a tipo de semillas (figura 16a) y a nivel trifactorial (figura 16b y c). La primera indica que las vitroplantas presentaron mayor diámetro del pseudotallo comparado con los cormos. Asimismo, en la triple interacción la relación V:E1:B1 y V:E1:Q se observan con mayor valor entre los tratamientos.

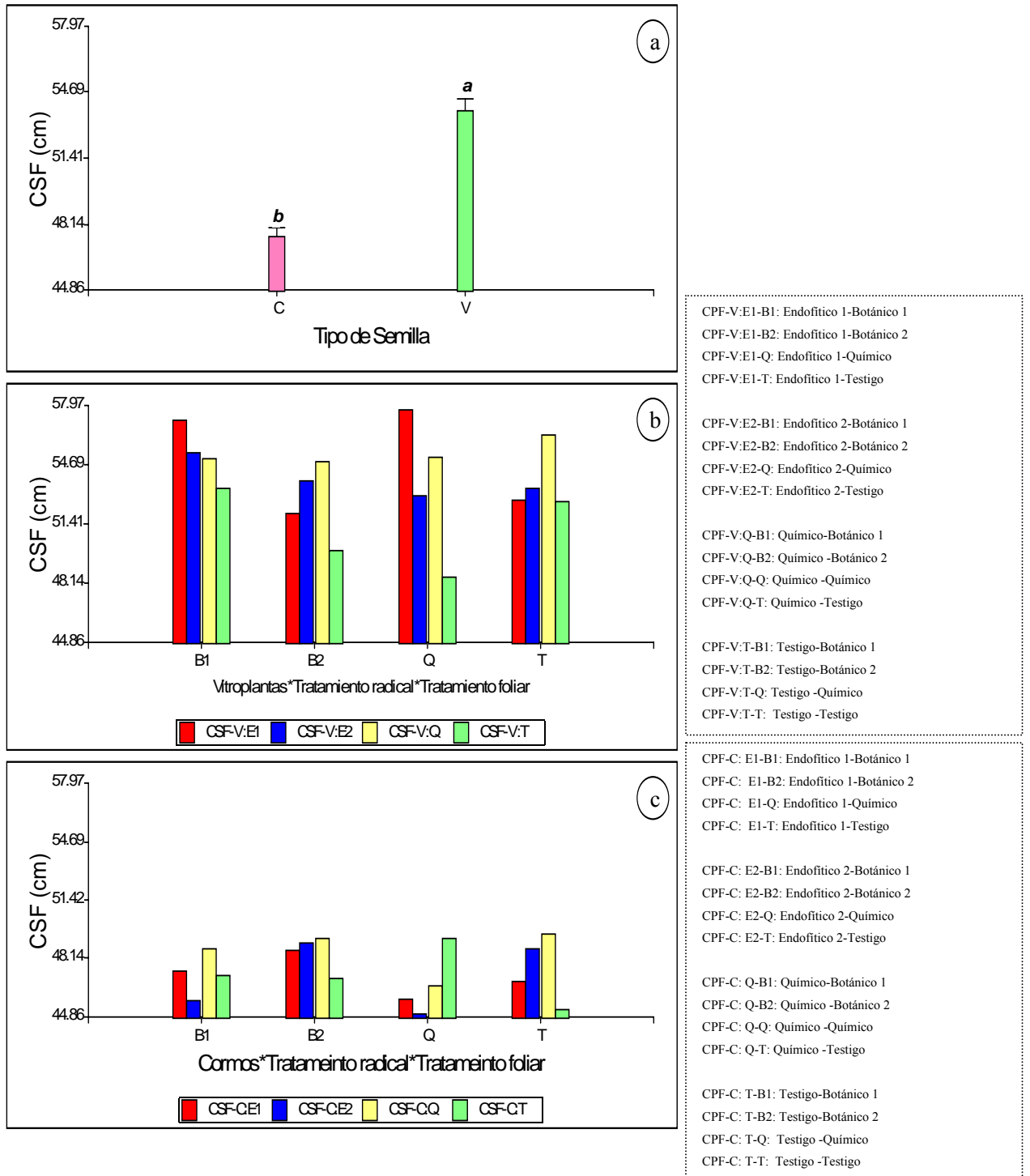


Figura 16: Representación de la variable Circunferencia del Pseudotallo a Floración (CSF), para los tratamientos: (a) Tipo semilla; (b) Interacción trifactorial (Vitroplanta*Tratamiento radical*Tratamiento foliar) y (c) Interacción trifactorial (Cormo*Tratamiento radical*Tratamiento foliar) para el control de Sigatoka negra.

4.5 Análisis fitoquímico de los extractos botánicos mediante el empleo de diferentes solventes extractores, para la identificación de metabolitos secundarios mayoritarios.

La primera parte de los resultados del análisis fitoquímico se presenta en el cuadro 5, la cual consistió en la caracterización del extracto fluido, desde descripción por color, olor, pH, densidad y sólidos totales. Estos últimos, son utilizados para determinar la concentración del extracto y así, estandarizar las dosis de aplicación. Se realizaron ensayos de solubilidad con diferentes solventes, encontrándose muy alta en agua y baja solubilidad en etanol, especialmente para el B2 (*Senna reticulata*), en cuanto a solventes orgánicos de baja polaridad se encontró que son insolubles en la mayoría de estos. Lo anterior justifica la razón por la cual se trabajaron los extractos en agua y mezclados con etanol.

La segunda parte del análisis corresponde al tamizaje fitoquímico (cuadro 6), en donde se detectó la alta diversidad de compuestos químicos presentes en estos extractos, tales como: quinonas, flavonoides, esteroides, triterpenos, taninos, saponinas, alcaloides, cumarinas y polifenoles, los cuales se encuentran a diferentes concentraciones dependiendo de la planta y el tipo de mezcla de solvente que se utilizó. Algunas de las sustancias identificadas en este tamizaje, han sido reportadas por su actividad biológica con potencial antifúngico, en el caso de: cumarinas, compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas y quinonas (Barrese *et al.* 2005; Obledo *et al.* 2004; Gil 2002; Fosfana *et al.* 2005; Nunes y Vaconcelos 2003). También, se registra que algunos de estos metabolitos secundarios hacen parte de sustancias activas de defensa de la planta, entre estos los alcaloides, terpenoides, y fenilpropanoides (Sepulveda *et al.* 2003; Kagale *et al.* 2004). Asimismo, se conoce que algunas fitoalexinas tipo flavonoides, terpenicas, sesquiterpenicas actúan en la protección de las plantas contra microorganismos (Gil 2002; Vivanco *et al.* 2005; Fosfana *et al.* 2005) y posiblemente podrían estar haciendo parte de sustancias activas presentes en estos extractos.

Los resultados de este estudio señalan a *Senna reticulata* como el tratamiento más promisorio para la protección contra la Sigatoka negra. En la literatura, *S. reticulata* es clasificado como fuente de compuestos de naturaleza antraquinona con diversas propiedades biológicas (Nunes and Vasconcelos 2003), esto coincide con los resultados en donde la presencia de quinonas se encuentra en cantidad abundante en especial tipo antraquinona y naftoquinona, las cuales han sido reportadas como antifúngicas contra *Cladosporium cucuminerum* y otras especies de hongos (Barrese *et al.* 2005). En cuanto a *Momordica*

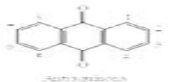
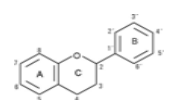
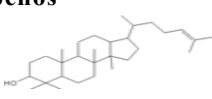
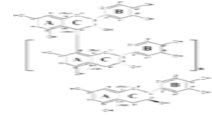
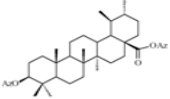
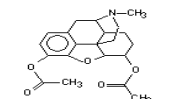
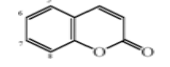
charantia, la literatura reporta el siguiente grupo de metabolitos secundarios: esteroides, triterpenos y saponinas, entre otros. Lo anterior, se soporta con la información obtenida desde el análisis fitoquímico del extracto botánico realizado en este estudio. Es importante resaltar que las saponinas, han sido estudiadas por sus variadas funciones en la planta e incluyendole actividad antifúngica (Apablaza *et al.* 2002). A pesar de esto, se desconoce cual es el metabolito clave presente en los bioproductos que da el resultado positivo de protección contra la Sigatoka negra. Desafortunadamente, en el caso concreto de los extractos botánicos utilizados en esta investigación, es importante resaltar que existe poca literatura que reporta su uso en programas de protección vegetal; por el contrario, muy frecuentemente, se les asocia como plantas medicinales para el control de enfermedades micóticas en humanos, sin embargo, en los últimos cinco años se viene trabajando en el patosistema *M. fijiensis*-Musa (Hernández *et al.* 2006; Marín *et al.* 2006; Polanco 2004; Riveros *et al.* 2003; Arciniegas *et al.* 2002).

De otro lado, es necesario tener en cuenta que, son varios los factores que influyen en la extracción de estas sustancias, los cuales pueden variar de acuerdo a la zona de recolección de la planta, la metodología, el solvente utilizado en la extracción y, las técnicas finales aplicadas para el tamizaje fitoquímico.

Cuadro 5: Resultados de la caracterización del extracto fluido de *Senna reticulata* y *Momordica charantia*.

Características		B1 (<i>Momordica charantia</i>)	B2 (<i>Senna reticulata</i>)
Color		Café miel (oscuro), no translucido, con partículas en suspensión, sin absorbancia a 264 y 366 nm en el UV/VIS.	Café oscuro, con visos rojizos, no translucido y con gran cantidad de partículas en suspensión, sin absorbancia a 264 y 366 nm en el UV/VIS
Olor		Olor similar al del café amargo.	Olor similar al del extracto del café, con un aroma dulce y amargo.
pH		6.34	5.78
Índice de refracción		1.350	1.355
Densidad		1.021	0.996
Sólidos totales		4.8172	4.4717
Solubilidad	Etanol	Insoluble	Poco soluble
	Éter de petróleo	Insoluble	Insoluble
	Metanol	Medianamente soluble	Medianamente soluble
	Acetona	Insoluble	Poco soluble
	Acetato de etilo	Insoluble	Poco soluble
	Cloroformo	Insoluble	Medianamente soluble
	n-hexano	Insoluble	Insoluble
	agua	muy soluble	muy soluble

Cuadro 6: Resultados del tamizaje fitoquímico de los extractos de *Senna reticulata* y *Momordica charantia* en: (a) etanol-agua (7:3); (b) etanol-agua (1:1) y (c) en medio acuoso. Abundante cantidad (+++), buena cantidad (++), baja cantidad (+), ND: no detectado y los espacios blancos significa que ese ensayo no se realizo al extracto.

Metabolitos Secundarios		Extracto Etanol-Agua (7:3)		Extracto Etanol-Agua (1:1)		Extracto Acuoso	
		B1	B2	B1	B2	B1	B2
Quinonas 		ND	+++	ND	+++	ND	+++
Flavonoides 		+	+	+++	+++	+++	+++
Esteroides o triterpenos 		+	+	+	++	+	++
Taninos 		++	++	++	++	++	ND
Saponinas 		+++	+	+++	ND	++	ND
Alcaloides 	Mayer:	++	+++				
	Valser:	++	+++				
	Dragendorff:	ND	ND	+	+	ND	ND
Cumarinas 		+++	+	ND	+	ND	+
Polifenoles: tipo fenoles libres, flavonoides, taninos, cumarinas.				+++	+++	+++	+++

En forma general, Los tratamientos químicos tanto el nematicida como el funguicida, se mantuvieron como los mejores tratamientos, sin embargo, los hongos endofíticos inoculados a nivel radical y en especial el E2, aunque no demostró una gran promoción de crecimiento dados los resultados arrojados, si revelo para las variables EE, HMJE e IND para el periodo vegetativo y a floración un efecto positivo de control para la Sigatoka negra.

El anterior resultado que discente la no efectividad de los hongos endofíticos en promoción de crecimiento pero si en control biológico, coincide con algunos autores quienes también reportan respuestas similares, explicando como ciertas cepas en aras de desarrollar una determinada tarea, donde invierte enorme energía termina por abandonar una parte y en este caso, fue la de eficientar el crecimiento (Harman *et al.* 2004; Benítez *et al.* 2004). Se podría plantear que E2, estará estimulando e induciendo la liberación de iones o moléculas activadoras de defensa que operarían en una secuencia de activación a distancia mediante intermediarios de resistencia sistémica adquirida. Ahora bien, es posible que el escenario de E2 fuese diferente y quizás llegaría a ser más potenciador si hubiese sido aislado de suelos de las zonas donde esta instalado el cultivo, es decir, trabajar con cepas locales. Por esta razón, es necesario realizar más estudios para optimizar su eficiencia, con posterior aplicación de refuerzo, con posibilidad segura de amplificar e inducir la liberación de moléculas señal intermediarias en una posible resistencia sistémica.

En lo que hace referencia a los botánicos y los tratamientos a nivel foliar, el comportamiento del B2 donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) favoreciéndolo con una menor ABCPE para EE y un menor porcentaje de infección con IND. Sin embargo, el químico (clorotalonil) fue el tratamiento más efectivo para el control. En cuanto a las interacciones se evidencio, que las semillas vitroplantas junto con el resto de tratamientos favorecen el número total de hojas y HMJE, especialmente interactuando con Q (funguicida) a nivel foliar.

De acuerdo con lo anterior, se puede afirmar que esta investigación permitió seleccionar al B2 como “promisorio” para ser propuesto como candidato en un programa de manejo integrado de la Sigatoka negra en banano, por su acción protectante. Sin embargo, se desconoce cual es la molécula que ejerce el efecto en el control de la enfermedad, por lo que, de existir la oportunidad de trabajar con esta investigación, se recomienda aislar el compuesto activo.

Comparando los tipos de semillas, las vitroplantas mostraron el mejor comportamiento con respecto a severidad, TH, DSF, CSF y APF. Se presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$) para algunas interacciones, sobresaliendo las variables TH, HMJE en la relación trifactorial: semillas con tratamiento radical y el químico a nivel foliar; en este caso la interacción semilla con nematicida y funguicida son los que mejor se comportan para la protección de la enfermedad.

Los análisis fitoquímicos indicaron una variedad de metabolitos secundarios (polifenoles, cumarinas, quinonas, saponinas, triterpenos, flavonoides, entre otros), algunos de los cuales han sido reportados en la literatura por presentar actividad antifúngica o inductora de resistencia.

5 CONCLUSIONES

En los tratamientos a nivel radical para las variables EE e IND sobresalió el Q (nematicida) seguido por el E2, lo cual significa que esta cepa de hongo endofítico aunque no demuestre una gran promoción de crecimiento, parece estar involucrada en la protección contra la Sigatoka negra.

El extracto botánico de *Senna reticulata* presentó las mejores características para ser considerado como “promisorio” y propuesto como excelente candidato, en un programa de manejo integrado de la Sigatoka negra en banano por su acción protectante.

Los controles químicos (nematicida) a nivel radical y foliar (clorotalonil) revelaron los mejores resultados y en las combinaciones considerándose los más eficientes. La salud radical obtenida por el uso de nematicida parece tener influencia en una mejor protección de la planta al ataque de la Sigatoka negra.

Las vitroplantas presentaron las mejores características con respecto a TH, HMJE, DSF y APF, traducido a una mayor vigorosidad de la planta y menor número de días de siembra a floración.

Las interacciones presentaron valores favorables para las variables TH y HMJE favoreciendo la relación [Tipo de semillas*tratamiento-radical*Q-(funguicida)], de los cuales se destaca [Tipo de semillas*E1óE2*Q(funguicida)] y [Tipo de semillas*Q-(nematicida)*Q-(funguicida)], a floración se mantiene este comportamiento, sobresaliendo la interacción bifactorial [V*E2, V*Q-(nematicida ó funguicida)], para el IND [V*E2] y [C*E2].

Los análisis fitoquímicos de los extractos botánicos B1 y B2, muestran respuestas positivas para una gran diversidad de compuestos en los que se destacaron polifenoles, cumarinas, flavonoides quinonas, esteroides, triterpenos, saponinas, en su mayoría reportados en la literatura con actividad antifúngica o como inductores de resistencia.

6 RECOMENDACIONES

Trabajar con hongos endofíticos aislados de suelos en las zonas donde está instalado el cultivo. Es necesario realizar más estudios para optimizar su eficiencia, aplicando refuerzos en el tiempo para asegurar la amplificación de respuesta hacia promoción de crecimiento y posible inducción de resistencia a enfermedades.

Conociendo el efecto protectante que ejerce el B2 se sugiere dar inicio a estudios en donde se manejen concentraciones más altas y se evalúe el producto en ambientes mucho más favorables para el patógeno, con el fin de someterlo a una mayor prueba.

La efectividad demostrada por el extracto botánico *Senna reticulata*, sugiere realizar seguimientos fitoquímicos de cada una de las partes de las plantas, con el fin, de conocer en donde se encuentra el compuesto activo en mayor concentración. En el evento de que esta investigación continúe, se recomienda aislar el compuesto activo responsable del efecto controlador de la Sigatoka negra.

Integrar el B2 a una alternativa tecnológica donde sea parte de un programa de manejo integrado del cultivo, reconociéndole su acción como protectante. Sería conveniente, quizás, acompañar este programa con el activador sintético Acibenzolar-S-Methyl (BOOST[®]), catalogado como inductor y que ha sido evaluado en plantaciones de banano para el control de la Sigatoka negra, en Costa Rica.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Apablaza, G.; Díaz, M.; Martín, S. y Moya, E. 2002. Control de oidio de las cucurbitáceas con saponinas presentes en extractos de Quillay (Quillaja saponaria). Pontificia Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile. *Revista Ciencias de Investigación agrícola*. 29 (2):83-9 p.
- Arciniegas, A. 2002. Evaluación del potencial antifúngico de 20 extractos de plantas asociadas a Musáceas sobre *Mycosphaerella fijiensis*. Trabajo de grado (título Biólogo). Ibagué-Colombia. Biblioteca Rafael Parra Cortés. Universidad del Tolima. Facultad de Ciencias. 155 p.
- Arciniegas A.; Riveros, A. y Loaiza, J. 2002. Efecto de extractos vegetales sobre el desarrollo *In vitro* de *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra en Musáceas. En: Memorias de XV Reunión Internacional ACORBAT-AUGURA Colombia. (27 oct-2 nov: 2002) Cartagena, Colombia. 242 p.
- Arora DK, Elander RP, Mukerji KG (eds). 1992. Handbook of applied mycology. Fungal Biotechnology, Vol 4. Marcel Dekker, New York.
- Baek, J; Howell, C. and Kenerely, C. 1999. The role of extracelular chitinase from *Trichoderma virens* Gv29-8 in the biocontrol of *Rhizoctonia solani*. *Curr. Genet*. 35:41-50.
- Barrese, Y. Hernández, M. y García, O. 2005. Caracterización y estudio fitoquímico de *Cassia alata* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. Vol. 10, No. 2. Ciudad de la Habana. 7 p.
- Benítez, T; Rincón, A; Limón, M. and Codón, A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Revista International Micribiology*. Vol. 7. Genetics of Department, University of Sevilla, Spain. 249-260 p.
- Bigirimana, J. et al. Induction of systemic resistance on bean (*Phaseolus vulgaris*) by *Trichoderma harzianum*. *Med. Fac. Lansbouw. Univ. Gent* 62. 1001-1007 p.
- Brun, J. 1963. La cercosporiose du bannier en Guinée. Etude de la phase ascosporeé du *Mycosphaerella musicola* Leach. These de Doctorat, Faculte des Sciences de l' Université de Paris Sud, Orsay centre. 166 p.
- Cañizares, C.A. 2003. Estudio sobre poblaciones de hongos endofíticos provenientes de suelos supresivos al nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorne en plantaciones de plátano en la zona de Talamanca, Costa Rica. Tesis Mag. Sc. CATIE. Turrialba, CR. 75p.
- Carlier, J.; Zapater, M.; Lapeyre, F.; Jones, D. and Mourichon, X. 2000. Septoria leaf spot of banana: an newly discovered disease caused by *Mycosphaerella eumusae* (anamorph *Septoria eumusae*). *Phytopathology* 90:884-890 p.
- Carroll, C.G. 1990. Fungal endophytes in vascular plants: Mycological research opportunities in Japan. *Trans. Micol. Soc. japan*. 31:103-116.

- Clay, K. 1998. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plant and fungi. *Ecology* 69: 10-16.
- Elad, Y.; Kapat, A. 1999. The role of *Trichoderma harzianum* protease in the biocontrol of *Botrytis cinerea*. *Eur. J. Plant Pathol.* 105:177-189.
- FAO. Food and Agriculture Organization of United Nations. 2005. Agriculture data base.
- Fofana, B; Benhamou, N; McNally, D; Labbé, C; Séguin, A; and Bélanger R. 2005. Suppression of induced resistance in cucumber through disruption of the flavonoid pathway. *Rev. Biochemistry and Cell Biology.* Vol. 95, No. 1. 114-123 p.
- Fortune, M.P., Gosine, S., Chow, S., Dilbar, A., Hill, A. St., Gibbs, H. and Rambaran, N. 2005. First report of Black Sigatoka disease (causal agent *Mycosphaerella fijiensis*) from Trinidad. *New Disease Report.* BSPP, 10: August 2004 - January 2005.
- Fouré, F. 1985. Black leaf streak disease of banana and plantains (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) study of the symptoms and stages of the disease in Gabon. IRFA. París.
- Gauhl, F. 1989. Epidemiology and ecology of Black Sigatoka on plantain and banana (*Musa* spp.) in Costa Rica, Centroamérica. Ph D. Thesis of Systematisch – Geobotanische- Institut der Georg - August-Universität Göttingen and Institut für Pflanzenpathologie und Pflanzenchutz der Georg - August-Universität Göttingen.
- Gil, P. 2002. *Productos naturales.* Universidad Pública de Navarra. España. 260 p.
- González, R; Bustamente, E; Shannon, P; Okumoto, S and Leandro, G. 1996. Evaluación de microorganismos quitinolíticos en el control de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. *Revista Manejo Integrado de Plagas, (CATIE), Costa Rica:* 40: 12-16.
- Gutiérrez, CFA. 1996. Estudio de factores en la inducción de resistencia a *Mycosphaerella fijiensis* y promoción de crecimiento en plantas de banano Tesis Mag. Sc. CATIE. Turrialba, CR, 91 p.
- Guzmán, M. 2006. Estado actual y perspectivas futuras del manejo de la Sigatoka negra en América Latina. En: *Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat.* Joinville, SC, Brasil. *Bananicultura: un negocio sostenible.* Soprano, E; Teacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds.) Editorial, Epagri, Estación experimental de Itajaí, SC, Brasil. p. 83-91
- Guzmán, M. 2002. Situación de la Sigatoka negra en Costa Rica y opciones para el manejo de la enfermedad. *Memorias ACORBAT.* Cartagena, Colombia. 27 de octubre-2 de noviembre. 18-19 p.
- Irish, B. M., Goenaga, R., and Ploetz, R.C., 2006. *Mycosphaerella fijiensis*, causal agent of Black Sigatoka of *Musa* spp. found in Puerto Rico and identified by polymerase chain reaction. *Plant Disease* 90, 684.
- Jaizme-Vega, M.C. 2003. Aplicaciones de las micorrizas arbusculares (MA) sobre plataneras micropropagadas. In: F.E. Rosales, S.C.Tripon, J.Cerna. Eds. *Producción de banano orgánico y/o, ambientalmente amigable* (1998), *Memorias.* CIID, EARTH, INIBAP. Guacimo, C.R. p. 106-123.

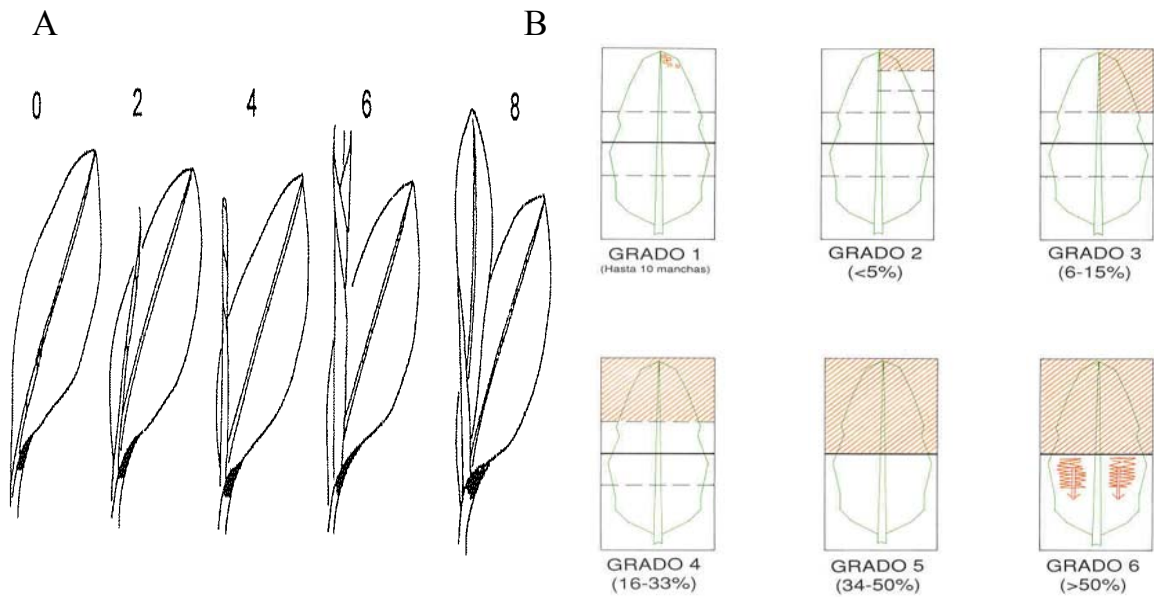
- Hallman, J; Sikora, RA. 1996. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology*, Vol. 102, 155-162.
- Hernández, J; Rodriguez, D; Sanabria, M; Blanco, G; Sanabria, N. 2006. Efecto del extracto etanólico de *Heliotropium indicum* L., *Lippia organoides* KH.B.K. y *Phyllanthus niruri* L. En hijos de “Platano Harton” (*Musa AAB*) en el control de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en Yaracuy, Venezuela. XVII Reuniao Internacional de Associacao para a Cooperacao nas Pesquisas sobre Banano no Caribe na America Tropical. ACORBAT. Joinville, Santa Catalina, Brasil. 565-568 p.
- Harman, G; Howell, C; Viterbo, A; Chet, I. and Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology*. Vol 2. 43-56 p.
- Howell, C. and Stipanovic, R. 1983. Glovirin as a new antibiotic from *Gliocladium virens*, and its role in the biological control of *Pythium ultimum*. *Can. J. Microbiol.* 29:321-324.
- Howell, C. 2002. Cotton seedling preemergence damping-off incited by *Rhizopus oryzae* and *Phyitium* spp. and its biological control with *Trchoderma* spp. *Phytopathology* 92:177-180.
- Howell, C. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease*. Vol 87, No. 1. 4-10 p.
- Kagale, S.; Marimuthu, T.; Thayumanavan, B.; Nandakuman, R. and Samiyappan, R. 2004. Physiological and Molecular Plan Pathology. 65. 91-100 p.
- Latch, G.C.; Hunt, W.F. and Musgrave, D.R. 1985. Ebdophytic fungi affect growth of perrenial ryegrass. *N. Zeal. Journal. Agricultural Research* 28:165-168.
- Maciel, C; Pires de Matos, A.; Oliveira, S. 1998. La Sigatoka negra en Brasil. Confirmada la amenaza. Montpellier, Francia. 7(1):130-131.
- Marín, B; Villadiego, M; Barrera, J. 2006. E valuación de extractos vegetales para el control de *Mycosphaerella fijiensis* en Plátano Harton (*Musa ABB*) en cordoba-Colombia. XVII Reuniao Internacional de Associacao para a Cooperacao nas Pesquisas sobre Banano no Caribe na America Tropical. ACORBAT. Joinville, Santa Catalina, Brasil. 560-571 p. G
- Marin, D; Romero, R; Guzmán, M; Sutton, T. 2003. Black Sigatoka and increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease*, Vol. 87. No.3.
- Marín, D. y Romero, R. 1998. El combate de la Sigatoka negra In: Divulgación científica al servicio del productor bananero nacional. *Revista CORBANA*. San José. Costa Rica. 104-129 p.
- Mayorga, M. 1994. Control de Sigatoka negra en zonas bananeras colombianas. *Revista Fitopatología Colombiana* 18(1):1-8.
- Meneses, A. 2003. Utilización de hongos endofíticos para el control biológico del nematodo barrenador *Radhopholus similis* (Cobb). Tesis Mag. Sc. Biblioteca Orton, CATIE. Turrialba, Costa Rica, 67p.

- Merchan, V. 1998. Manejo de problemas fitosanitarios del cultivo de plátano en la zona central cafetera. In: Memorias Seminario Internacional sobre producción de plátano. Corporación Colombiana de investigación agropecuaria-Corpoica-Universidad de Quindío. Servicio nacional de Aprendizaje-SENA-Quindío. Comité Departamental de Cafeteros del Quindío. Armenia. Colombia. P. 63-70.
- Meredith, DS. and Lawrance, JS. 1969. Black leaf Streak of banana (*Mycosphaerella fijiensis*), symptoms of disease in Hawaii and notes of the causal fungus. Transaction of the British Mycological Society 52(3):459-476.
- Nunes, R. and Vasconcelos, S. 2003. 29ª Reuniao anual de sociedade brasileira de química. Universidade Federal do Ceará. Disponible en internet: https://sec.s bq.org.br/cd29ra/listaarea_pn.htm.
- Obledo E. N; A.S. Hernández-Rosales; M.L. López-Orué. 2004. Extractos vegetales, una opción en el control de la Sigatoka negra. XVI Reunión Internacional. ACORBAT. Oaxaca, México. 184 p.
- Orozco-Santos, M; Orozco-Romero, J. 2006. Manejo sustentable de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano: conocimiento del patosistema, prácticas culturales y control químico. En: Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil. Bananicultura: un negocio sostenible. Soprano, E; Tcacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds.) Editorial, Epagri, Estación experimental de Itajaí, SC, Brasil. p. 100-116
- Patiño, LF; Salazar, LM; Collazos, JC; Piedrahita, RA; Bustamante, E. 2006. Bacterias liticas y sustratos en la filofera de banano y plátano para el control de Sigatoka negra. En: Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil. Bananicultura: un negocio sostenible. Soprano, E; Tcacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds.) Editorial, Epagri, Estación experimental de Itajaí, SC, Brasil. p. 133-140
- Piñol, M. 2001. Relaciones entre el metabolismo primarios y secundario de las plantas, citado por Ascon-bieto, J. y Talon, M. Fundamentos de biología vegetal. Introducción al metabolismo secundario. S.I.: McGraw Hill Interamericana. NY, USA. 261-262 p.
- Polanco, D. 2004. Validación del potencial antifúngico de extractos de plantas sobre *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra, en el cultivo de banano. M.Sc. Ciencias Biológicas. Biblioteca Rafael Parra Cortés. Universidad del Tolima, Ibagué, Colombia. 138 p.
- Pocasangre, L. 2002. Mejoramiento biológico de vitroplantas de banano mediante la utilización de hongos endofíticos para el control del nematodo barrenador *Radopholus similis*. In: Riveros, AS; Pocasangre, L; Rosales, FE (eds). Inducción de resistencia y uso de tecnología limpias para el manejo de plagas en plantas. Memoria del Taller Internacional, realizado en CATIE, Turrialba Costa Rica, 27-30 de agosto de 2002, pp. 33-39.
- Pocasangre, LE; Menjivar, RD; zum Felde, A; Riveros, AS, Rosales, FE; Sikora, RA. 2006. Hongos endofíticos como agentes biológicos de control de fitonematodos en banano. En: Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil. Bananicultura: un negocio sostenible. Soprano,

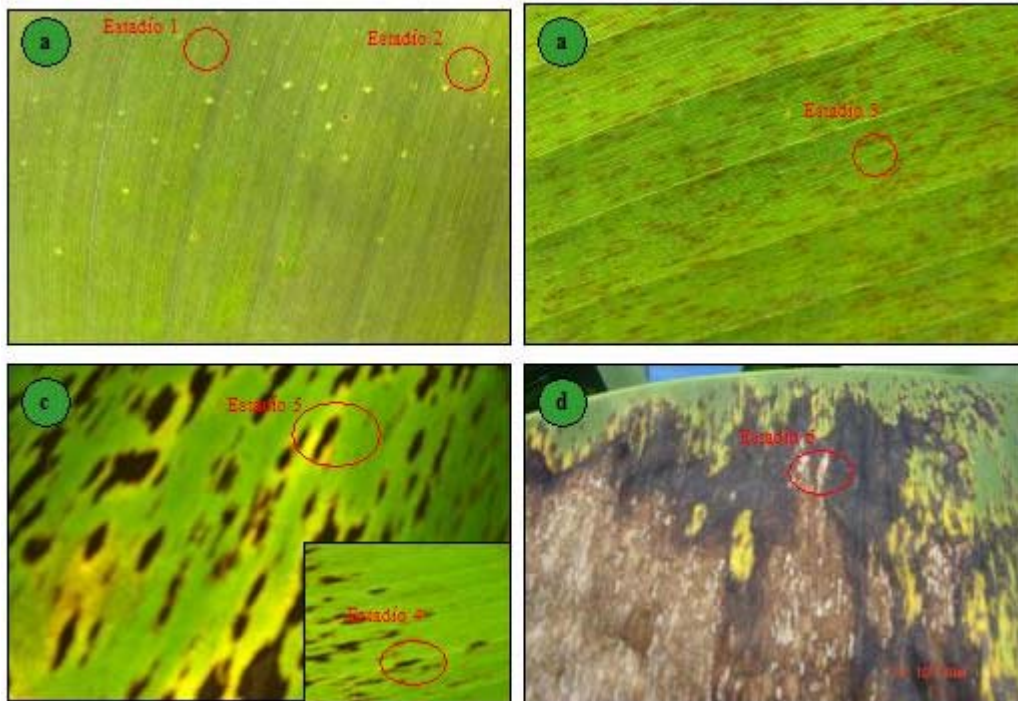
- E; Tcacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds.) Editorial, Epagri, Estación experimental de Itajaí, SC, Brasil. p.249-254.
- Pocasangre, L.; Sikora, R.A.; Vilich, V.; Schuster, P. 2000. survey of banana endophytic fungi from central America and screening for biological control of *Radopholus similis*. In: M. Blanke; J. Pohlman. 2000. Eds. ISHS Conference on fruit production in the tropics and Subtropics (s, 2000). Bonn. 283-289 p.
- Pocasangre, L.; Sikora, RA; Araya, M. 2001. Estado actual de la situación nematológica en los bananos y plátanos en América Latina. PROMUSA. Revista Infomusa. Vol. 10(2):1-12.
- Riveros AS., Arciniegas, A., Pocasangre LE y Rosales FE. 2003. Potencial antifungico de *Senna reticulata* sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, como un metodo alternativo para el control de la Sigatoka negra en el cultivo de banano organico. Informe Tecnico de Subproyecto para el Proyecto "Rehabilitacion y Modernizacion de la Produccion de Banano Organico en el Alto Beni, para Exportacion" CICAD/OEA/INIBAP. Septiembre 2003, 20 Paginas.
- Rhodes, PL. 1964. A new banana disease in Fiji. Commonwealth Phytopathological News 10(3):38.-51 p.
- Romero, RA. 2006. Caracterización y manejo de la resistencia a fungicidas de *Mycosphaerella fijiensis* en bananos. En: Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil. Bananicultura: un negocio sostenible. Soprano, E; Tcacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds.) Editorial, Epagri, Estación experimental de Itajaí, SC, Brasil. p.92-99
- Rosales, FE; Belalcazar, S. and Riveros, AS. 2002. Plantain production in Latin America: A new profitable and sustainable technology. In: Global conference on banana and plantain. 28 de septiembre 21 de octubre. Bangalore India. 37 p.
- Rosales, FE y Pocasangre, LE. 2002. Mejoramiento convencional de banano y plátano: estrategias y logros. In: Memoria de la XV Reunión internacional ACORBAT. Cartagena, Colombia. 31-43 p.
- Sepúlveda, G; Porta, H.; Rocha, M. 2003. La Participación de los Metabolitos Secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mexicana de Fitopatología. Vol. 21. No. 1. 355-363 p.
- Schuster, R.P.; Sikora, R.A.; Amin, N. 1995. Potencial of endohytic fungus for the biological control of plant parasitic nematodes. In: Mededelingen van de faculteit Landbouwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent. 60:1047-1052 p.
- Singh, I. and Singh V. P. 2000. Antifungal properties of aqueous and organic solution extracts of seed plants against *Aspergillus flavus* and *A. niger*. Phytomorphology. 50 (2). 151-157 p.
- Soledade, M; Piedras, C; y Sorensen J. 1998. Phytoalexin accumulation and antifungal compounds from the crucifer wasabi. Vol. 49. No. 7. 1959-1965p.
- Sikora, RA; Pocasangre, LE. 2006. The concept of a suppressive banana plant: root health management with a biological approach. En: Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil. Bananicultura: un negocio sostenible. Soprano, E; Tcacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds.) Editorial, Epagri, Estación experimental de Itajaí, SC, Brasil. p.241-248.

- Sikora, R.A. 2003. Uso potencial de antagonistas para la protección de las raíces de banano. In: Syposium Internacional: Sistema Radical del Banano: hacia un mejor conocimiento para su manejo productivo. San José Costa Rica. INIBAP/CORBANA. p. 74.
- Stover, R. and Dickson, J.D. 1976. Banana leaf spot cused by *Mycosphaerella musicola* and *M. fijiensis* var. *difformis*: a comparison of the first centra American epidemics. *FAO Plant Peot. Bull.* 24:36-42.
- Stover, R. and Simonds, N. 1987. Bananas. Longman Scientific and Technical. 3th ed. England. 467 p.
- Talavera, M; Bustamante, E.; González, R. y Sánchez, V. 1998. Selección y evaluación en laboratorio y campo de microorganismo glucanolíticos antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis*. *Revista Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica.* No. 47. 24-30 p.
- Tally, A.; Oostendorp, M.; Lawton, K.; staub, Th. And Bassi, B. 2000. commercial development of elicitors of induced resistance to pathogens. In: *Induced plant defenses againt pathogens and hervibores: Biochemistry, Ecology and agriculture.* Agrawal; AA.; S. Tuzun and E. Bent. Eds. APS press. St Paul, Minnesota, USA. 357-368 p.
- Tzun, S.; Kloepper, J. 1995. Practical aplication and implementation of induces resistance. In: R. Hammerschmidt y J. Kuc, eds. *Induced resistance to disease plants.* The Netherlands, Kluwer academic publishers. p. 152-168.
- van Loon, LC and van Strien. 1999. The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol Molec Plant Pathol* 55:85-97.
- Vivanco, J.; Cosio, E.; Loyola, V. y Flores, H. 2005. Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Revista Investigación y Ciencia.* Vol. 5, No. 3. 68-73 p.
- Wang, W; Ben-Daniel, B. and Cohen Y. 2004. Control of plant diseases by extracts of *Inula viscosa*. *Phytopathology.* Vol. 94, No. 10. 1042-1047 p.
- Yedidia, I; Benhamou, N; and Chet, I. 1999. Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:1061-1070.
- Yedidia, I; Srivastva, A; Kapulnik, Y. y Chet, I. 2001 Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant Soil.* 235-242 p.
- zum Felde, A; Pocasangre, L; Sikora, RA; Mancilla, R. 2002. Estudios sobre poblaciones de hongos endofíticos provenientes de suelos supresivos al nematodo barrenador *Radopholus similis* en plantaciones comerciales de banano en Bandegua. In: *Memoria 2do Encuentro de Investigadores en Agricultura Orgánica. Proyecto Agroforestal CATIE/GTZ, Turrialba, Costa Rica,* 73 p.

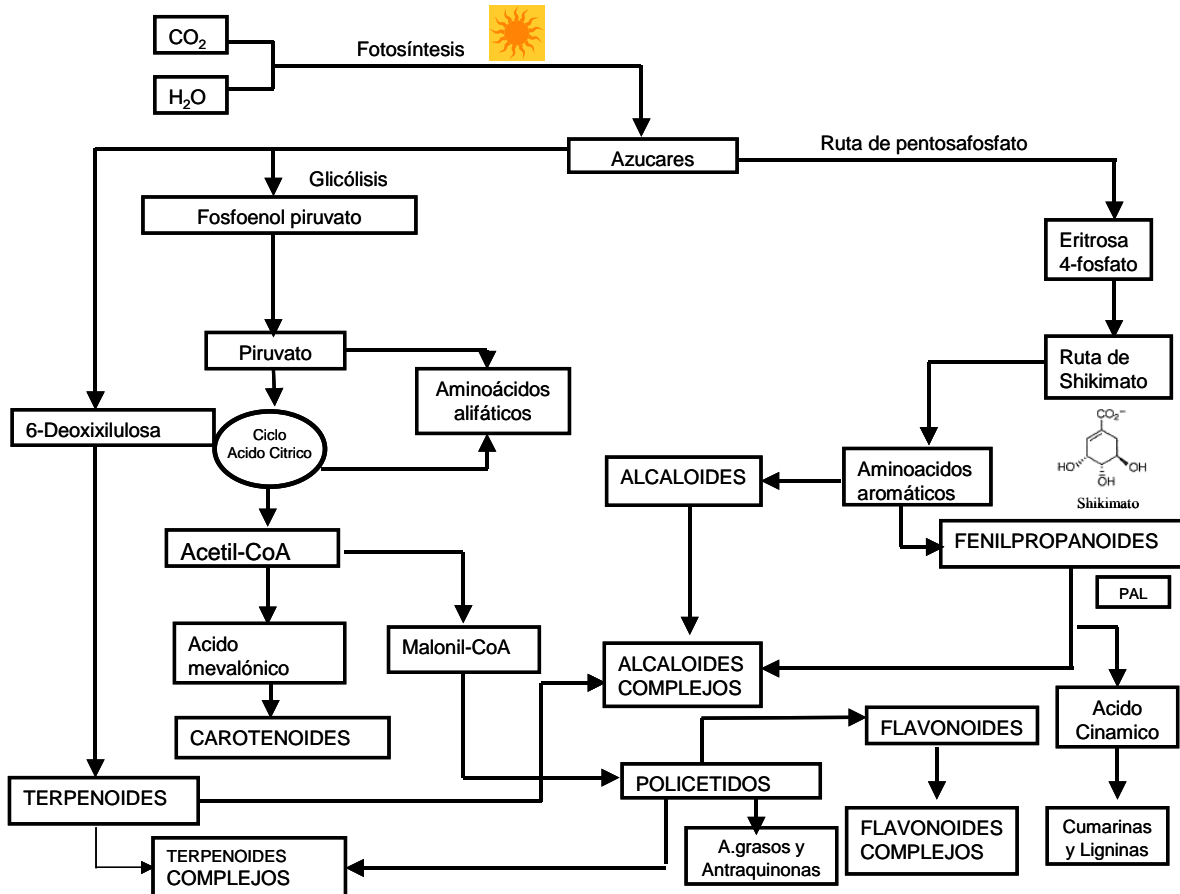
Anexo 1: Ilustra diferentes tipos de escalas; A. Desarrollo de la hoja candela según Brun (1963). B. Escala de síntomas en porcentajes, de acuerdo a Stover modificada por Gauhl (1989).



Anexo 2: Estadíos de desarrollo de la Sigatoka enra de acuerdo a a la escala de síntomas descritos por Fouré 1985. (a) Estado de desarrollo 1 y 2; (b) Estado de desarrollo 3; (c) Estado de desarrollo 4 y 5; (d) Estado de desarrollo 6.



Anexo 3: Principales rutas biosintéticas que dan lugar a la formación de metabolitos secundarios (Adaptado desde Gil 2002).



Anexo 4: Protocolo para la preparación y aplicación de bioproductos de origen vegetal para el manejo de la Sigatoka negra a escala semicomercial



1. Recolección de la muestra vegetal en campo. En el laboratorio se prepara la muestra y se obtiene el material fresco y seleccionado.



2. Secado de la muestra a 40 °C. Durante 72 horas, con circulación de aire. Maceración y tamizado empleando una malla de 2 mm.



3. Etiquetado correspondiente a cada muestra vegetal en estudio



4. Pesar 2 kg del material vegetal, y llevarlo a un recipiente para dar inicio al proceso de extracción.



5. Adicionar el material molido en una solución de alcohol 98%: agua (70:30) mezclar bien y tapar. Después se realiza tres extracciones sucesivas con intervalos de 8 días. Con la ayuda de un lienzo se separa la parte sólida de la líquida en cada momento de extracción.



6. El líquido de las tres extracciones se concentra a presión reducida, con el objetivo de eliminar la mayor cantidad de la mezcla hidroalcohólica, y finalmente obtener un extracto crudo hidroalcohólico concentrado.



7. El extracto crudo hidroalcohólico concentrado es almacenado, y una vez se determina los sólidos totales es etiquetado y listo para ser aplicado en campo.

Anexo 5: Protocolo para la determinación de sólidos totales en una muestra y dosis de aplicación en campo

Se realiza con el fin de conocer el porcentaje de Sólidos Totales (%ST) presentes en los extractos y a partir de este dato se realizaron las respectivas diluciones.

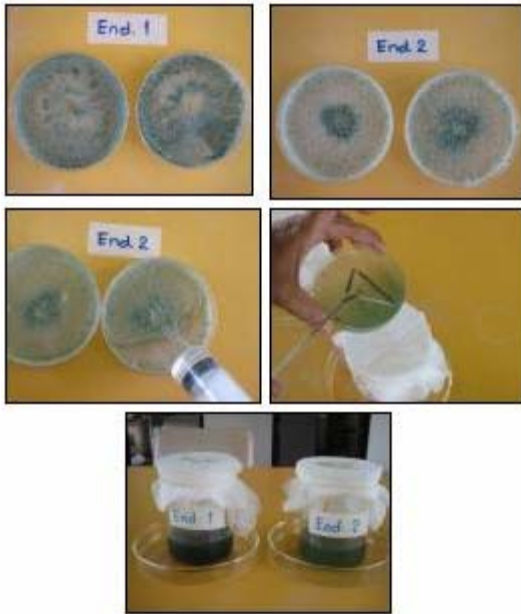
Método Gravimétrico:

1. Tarar los crisoles a 105°C por 2 horas.
2. Llevar las capsulas de porcelana a un desecador hasta quedar a temperatura ambiente.
3. Pesar en una balanza analítica y registrar peso del crisol vacío.
4. Homogenizar bien la muestra y adicionar aproximadamente 1 mil del extracto y registrar el peso del extracto.
5. Colocar en el baño maría por 20 minutos
6. llevar al horno a 105 °C por 3 horas
7. enfriar en el desecador y pesar

Calculos:

$\% ST = ((\text{peso del crisol} + \text{muestra seca}) - (\text{peso del crisol vacío})) * ((\text{peso del crisol} + \text{muestra}) - (\text{peso del crisol vacío}))$.

Anexo 6: Preparación de la suspensión de esporas



1. Se utilizaron hongos endofíticos que pertenecen a dos cepas de *Trichoderma atroviride*, aislados de plantaciones comerciales de banano en Costa Rica.

2. Se seleccionaron cultivos de hongos con dos semanas de crecimiento en medio de PDA. A estos cultivos esporulados se les agregó 25 ml de agua destilada, con la ayuda de una asa se desprendió el micelio del hongo y se filtró.

3. De esta solución se hicieron lecturas al microscopio, mediante un hematocimetro de Neubauer, para poder ajustar la concentración final de esporas a inocular en la cantidad aproximada de 1.5×10^6 unidades formadoras de colonia (CFU-esporas a inocular/ml)

Anexo 7: Preparación de las semillas e inoculación de las plantas con hongos endofíticos



1. Se utilizaron vitroplantas y cormos de banano de 200 a 300 gramos de peso, los cuales fueron mondados.

2. Las semillas fueron inoculados por cinco minutos en una suspensión de esporas a 1.5×10^6 esporas/ml de cada uno de los hongos endofíticos “promisorios” seleccionados.

3. Posteriormente, se sembraron en bolsas plásticas de 2 litros de capacidad conteniendo sustrato tierra y arena en relación 1:1.5 y se aclimataron bajo una sombra del 50%, donde se mantuvo durante un periodo de 3 meses antes de la siembra definitiva en campo .

Anexo 8: Análisis de varianza para la variable Ritmo de Emisión Foliar (REF)

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Tipo semilla	1	0.00001944	0.00001944	0.03	0.8729
Trat. Radical	3	0.00247842	0.00082614	1.10	0.3574
Trat. Foliar	3	0.00308703	0.00102901	1.37	0.2616
Tipo semilla* Trat. Radical	3	0.00389977	0.00129992	1.73	0.1711
Tipo semilla* Trat. Foliar	3	0.00030780	0.00010260	0.14	0.9381
Trat. Radical* Trat. Foliar	9	0.00241806	0.00026867	0.36	0.9510
Tipo semilla* Trat. Radical* Trat. Foliar	9	0.00236656	0.00026295	0.35	0.9542
Error	61	0.04594960			
Total	94	0.06772913			
CV = 5.90					

Anexo 9: Análisis de varianza para la variable Estado de Evolución de la enfermedad (EE), expresado en Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE)

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Tipo semilla	1	57116369	57116369	21.56	<.0001
Trat. Radical	3	74899089	24966363	9.42	<.0001
Trat. Foliar	3	1983147823	661049274	249.53	<.0001
Tipo semilla* Trat. Radical	3	20078033	6692678	2.53	0.0656
Tipo semilla* Trat. Foliar	3	15282245	5094082	1.92	0.1351
Trat. Radical* Trat. Foliar	9	10218671	1135408	0.43	0.9147
Tipo semilla* Trat. Radical* Trat. Foliar	9	10767472	1196386	0.45	0.9009
Error	62	164250408			
Total	95	2336044631			
CV = 9.69					

Anexo 10: Análisis de varianza para la variable Índice de Infección (IND), expresado en Área Bajo la Curva del Progreso de la Enfermedad (ABCPE)

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Tipo semilla	1	339680.76	339680.76	16.64	0.0001
Trat. Radical	3	1036368.79	345456.26	16.92	<.0001
Trat. Foliar	3	28761814.88	9587271.63	469.64	<.0001
Tipo semilla* Trat. Radical	3	35940.53	11980.18	0.59	0.6259
Tipo semilla* Trat. Foliar	3	100233.38	33411.13	1.64	0.1900
Trat. Radical* Trat. Foliar	9	353671.89	39296.88	1.92	0.0646
Tipo semilla* Trat. Radical* Trat. Foliar	9	163698.46	18188.72	0.89	0.5385
Error	62	1265681.81			
Total	95	32136652.78			
CV = 6.11					

Anexo 11: Análisis de varianza para la variable Total de Hojas (TH)

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Tipo semilla	1	264.323319	264.323319	3.49	0.0635
Trat. Radical	3	561.684590	187.228197	2.47	0.0636
Trat. Foliar	3	1116.929961	372.309987	4.92	0.0027
Tipo semilla* Trat. Radical	3	505.307533	168.435844	2.23	0.0872
Tipo semilla* Trat. Foliar	3	537.668387	179.222796	2.37	0.0728
Trat. Radical* Trat. Foliar	9	1694.590937	188.287882	2.49	0.0110
Tipo semilla*Trat. Radical* Trat. Foliar	9	1651.420155	183.491128	2.43	0.0131
Error	158	11953.84340			
Total	191	18691.24381			

CV = 94.65

Anexo 12: Análisis de varianza para la variable Hoja Más joven Enferma (HMJE)

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Tipo semilla	1	2.0076447	2.0076447	22.18	<.0001
Trat. Radical	3	0.9323630	0.3107877	3.43	0.0185
Trat. Foliar	3	231.3965040	77.1321680	852.33	<.0001
Tipo semilla* Trat. Radical	3	1.9040914	0.6346971	7.01	0.0002
Tipo semilla* Trat. Foliar	3	0.5584176	0.1861392	2.06	0.1081
Trat. Radical* Trat. Foliar	9	0.9815541	0.1090616	1.21	0.2954
Tipo semilla*Trat. Radical* Trat. Foliar	9	2.9872846	0.3319205	3.67	0.0003
Error	158	14.2983269			
Total	191	258.2218924			

CV = 5.10

Anexo 13: Análisis de varianza para la variable Total de Hojas a Floración (THF)

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Tipo semilla	1	7.1302083	7.1302083	13.76	0.0003
Trat. Radical	3	2.0052083	0.6684028	1.29	0.2797
Trat. Foliar	3	443.3489583	147.7829861	285.27	<.0001
Tipo semilla* Trat. Radical	3	15.9843750	5.3281250	10.29	<.0001
Tipo semilla* Trat. Foliar	3	3.9322917	1.3107639	2.53	0.0592
Trat. Radical* Trat. Foliar	9	11.7239583	1.3026620	2.51	0.0102
Tipo semilla*Trat. Radical* Trat. Foliar	9	17.9531250	1.9947917	3.85	0.0002
Error	158	81.8515625			
Total	191	614.7447917			

CV = 8.89

**Anexo 14: Análisis de varianza para la variable Hoja Más joven
Enferma a Floración (HMJEF)**

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Tipo semilla	1	0.0963021	0.0963021	0.29	0.5941
Trat. Radical	3	7.1155729	2.3718576	7.02	0.0002
Trat. Foliar	3	416.5214063	138.8404688	411.12	<.0001
Tipo semilla* Trat. Radical	3	14.4843229	4.8281076	14.30	<.0001
Tipo semilla* Trat. Foliar	3	5.3901562	1.7967187	5.32	0.0016
Trat. Radical* Trat. Foliar	9	9.2454687	1.0272743	3.04	0.0022
Tipo semilla*Trat. Radical* Trat. Foliar	9	24.8683854	2.7631539	8.18	<.0001
Error	158	53.3588542			
Total	191	546.2449479			

CV = 10.66

**Anexo 15: Análisis de varianza para la variable Índice de Infección a
Floración (INDF)**

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Tipo semilla	1	5.400208	5.400208	1.20	0.2746
Trat. Radical	3	289.803958	96.601319	21.50	<.0001
Trat. Foliar	3	5130.872292	1710.290764	380.60	<.0001
Tipo semilla*Trat. Radical	3	42.452292	14.150764	3.15	0.0267
Tipo semilla* Trat. Foliar	3	13.700625	4.566875	1.02	0.3871
Trat. Radical* Trat. Foliar	9	61.568542	6.840949	1.52	0.1442
Tipo semilla* Trat. Radical*Trat. Foliar	9	54.176875	6.019653	1.34	0.2206
Error	158	709.999583			
Total	191	6568.174792			

CV = 10.43

**Anexo 16: Análisis de varianza para la variable Días de siembra a
Floración (DSF)**

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Tipo semilla	1	10933.33594	10933.33594	22.42	0.0003
Trat. Radical	3	399.00521	133.00174	0.27	0.8441
Trat. Foliar	3	2631.45313	877.15104	3.50	0.0223
Tipo semilla*Trat. Radical	3	883.92969	294.64323	1.18	0.3285
Tipo semilla* Trat. Foliar	3	1324.76302	441.58767	1.76	0.1668
Trat. Radical* Trat. Foliar	9	2517.03125	279.67014	1.12	0.3695
Tipo semilla*Trat.Radical*Trat.Foliar	9	1797.80469	199.75608	0.80	0.6201
Error	48	12020.44792			
Total	95	39486.65625			

CV = 4.715479

Anexo 17: Análisis de varianza para la variable Altura de la Planta a Floración (APF)

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Tipo semilla	1	20020.48253	20020.48253	49.16	<.0001
Trat. Radical	3	482.09367	160.69789	0.39	0.7589
Trat. Foliar	3	1320.00680	440.00227	4.22	0.0099
Tipo semilla*Trat. Radical	3	839.86721	279.95574	2.69	0.0568
Tipo semilla* Trat. Foliar	3	488.21367	162.73789	1.56	0.2107
Trat. Radical* Trat. Foliar	9	1190.28846	132.25427	1.27	0.2777
Tipo semilla*Trat. Radical*Trat. Fol	9	1827.61201	203.06800	1.95	0.0669
Error	48	4999.79406			
Total	95	38608.55435			

CV = 4.710494

Anexo 18: Análisis de varianza para la variable Circunferencia del Pseudotallo a Floración (CSF)

Source	DF	Sum of squares	Mean square	F value	Pr > F
Tipo semilla	1	947.3695898	947.3695898	45.85	<.0001
Trat. Radical	3	97.6002279	32.5334093	1.57	0.2399
Trat. Foliar	3	15.5858529	5.1952843	0.89	0.4513
Tipo semilla*Trat. Radical	3	47.7507487	15.9169162	2.74	0.0536
Tipo semilla* Trat. Foliar	3	46.4391862	15.4797287	2.66	0.0585
Trat. Radical* Trat. Foliar	9	53.2904753	5.9211639	1.02	0.4391
Tipo semilla* Trat. Radical*Trat. Folia	9	112.2453711	12.4717079	2.15	0.0434
Error	48	279.083958			
Total	95	2033.019368			

CV = 4.760638

