

**CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE EDUCACIÓN PARA EL
DESARROLLO Y LA CONSERVACIÓN
ESCUELA DE POSTGRADO**

**ESTUDIO DE FACTORES EN LA INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A
Mycosphaerella fijiensis Y PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO EN PLANTAS DE
BANANO**

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

MAGISTER SCIENTIAE

Por

Francisco Adrián Gutiérrez Chan

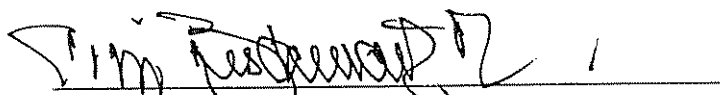
Turrialba, Costa Rica

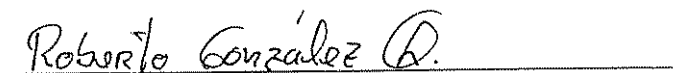
1996


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

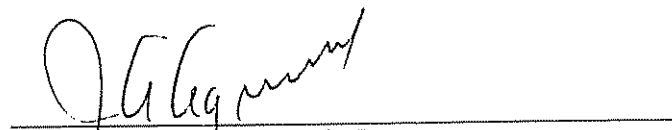
CIENCIAS
MAGISTER SCIENTIAE

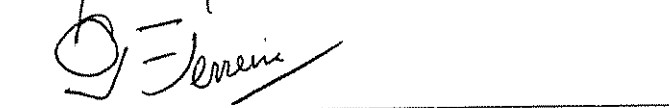
FIRMANTES:

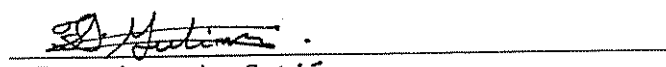

Elkin Bustamante, Ph.D.
Profesor Consejero


Roberto González M.Sc.
Miembro Comité Asesor


Fritz Elango Ph.D.
Miembro Comité Asesor


Juan A. Aguirre, Ph.D.
Jefe, Area de Postgrado


Pedro Ferreira, Ph.D.
Director, Programa de Enseñanza


Francisco A. Gutiérrez
Candidato

DEDICATORIA

**A mi esposa Isabel y mi hija Yasil
Mi mayor motivo**

A mis padres

**Irma y Eleuterio
Por su gran amor
y porque siempre han creído en mí**

A mis hermanos

**Lisbet, René y Miguel
Por su amor y apoyo**

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Elkin Bustamante por su gran apoyo y guía en la dirección de este trabajo y por su amistad.

A los miembros de mi comité asesor, al M.Sc. Roberto González por su apoyo incondicional y amistad y al Dr. Fritz Elango, por su apoyo, su carisma y su amistad.

A los compañeros de mi promoción, en especial al grupo MIP, por todos los buenos tiempos que compartimos y esa gran amistad que nos une.

Al personal del área de fitoprotección por el apoyo durante los cursos y trabajo de tesis, en especial al señor Arturo Gamboa.

A todos los que de una forma u otra contribuyeron a la realización de este trabajo y a mi formación como profesional.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. OBJETIVOS GENERALES.....	4
3. HIPÓTESIS	4
4. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
4.1. ASPECTOS GENERALES DE <i>M. FIJENSIS</i>	5
4.1.1 <i>Taxonomía</i>	5
4.1.2 <i>Biología</i>	5
4.1.3 <i>Origen de la sigatoka negra</i>	7
4.2. EL PROBLEMA DE LA SIGATOKA NEGRA EN LA PRODUCCIÓN BANANERA.....	8
4.3. MANEJO CONVENCIONAL DE LA SIGATOKA NEGRA	9
4.4. CONTROL BIOLÓGICO	11
4.5. SITUACIÓN ACTUAL DE LOS PRODUCTOS BIOLÓGICOS REGISTRADOS PARA USO COMERCIAL.....	12
4.6. EL CONTROL BIOLÓGICO COMO ALTERNATIVA EN EL MANEJO DE ENFERMEDADES.....	14
4.7. RESPUESTAS DE DEFENSA EN LAS PLANTAS Y REGULACIÓN MOLECULAR	16
4.7.1. <i>Respuestas de defensa tempranas e inmediatas: reconocimiento y señalización intracelular</i>	16
4.7.2. <i>Respuestas locales de defensa</i>	18
4.7.3. <i>Respuestas sistémicas de defensa</i>	20
4.7.4. <i>Promoción de crecimiento</i>	21
4.8. MICROORGANISMOS COMO AGENTES DE CONTROL BIOLÓGICO	23
4.8.1. <i>Serratia marcescens</i>	23
4.8.2. <i>Pseudomonas cepacia</i>	24
4.8.3. <i>Pseudomonas fluorescens</i>	24
4.8.4. <i>Trichoderma harzianum</i>	26
4.8.5. <i>Bacillus cereus</i>	27
4.9. FOSFATOS COMO AGENTES INDUCTORES DE RESISTENCIA Y PROMOTORES DE CRECIMIENTO	28
4.10. USO DE BACTERIAS DE LA RIZOSFERA COMO INDUCTORES DE RESISTENCIA Y PROMOTORES DE CRECIMIENTO CONTRA PATÓGENOS FOLIARES.....	29
4.11. CONTROL BIOLÓGICO DE LA SIGATOKA.....	29
4.12. EL USO DE SUSTRATOS Y FORMULACIONES EN EL CONTROL BIOLÓGICO CON MICROORGANISMOS.....	31

5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
5.1. LOCALIZACIÓN.....	34
5.2. EXPERIMENTO I: INDUCCIÓN DE RESISTENCIA Y PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO CON LA APLICACIÓN DE MICROORGANISMOS EN SUSPENSIÓN ACUOSA, Y SUSTANCIAS INDUCTORAS DE RESISTENCIA.....	34
5.2.1. <i>Material experimental</i>	34
5.2.2. <i>Diseño experimental</i>	36
5.2.3. <i>Inoculación de microorganismos a la rizosfera y aplicación de sustancias químicas al filoplano...</i>	36
5.2.4. <i>Inoculación con M. fijiensis</i>	38
5.2.5. <i>Variables evaluadas</i>	38
5.2.6. <i>Análisis estadístico</i>	40
5.3. EXPERIMENTO II: INDUCCIÓN DE RESISTENCIA Y PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO CON LA APLICACIÓN DE MICROORGANISMOS EN SUSTRATOS.....	41
5.3.1. <i>Material experimental</i>	41
5.3.2. <i>Diseño experimental</i>	42
5.3.3. <i>Preparación de los sustratos</i>	42
5.3.4. <i>Formulación con microorganismos</i>	43
5.3.5. <i>Inoculación con microorganismos</i>	44
5.3.6. <i>Inoculación con M. fijiensis</i>	44
5.3.7. <i>Variables evaluadas</i>	44
5.3.8. <i>Análisis estadístico</i>	46
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	47
6.1 PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO CON MICROORGANISMOS APLICADOS EN SUSPENSIÓN Y FOSFATOS EN SOLUCIÓN ACUOSA.....	47
6.1.1 <i>Variable emisión foliar</i>	47
6.1.2 <i>Variable altura</i>	47
6.1.3 <i>Variable grosor del pseudotallo</i>	48
6.1.4 <i>Área foliar</i>	48
6.2 PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO CON MICROORGANISMOS FORMULADOS EN SUSTRATOS.....	51
6.2.1 <i>Variable emisión foliar</i>	53
6.2.2 <i>Variable altura</i>	54
6.2.3 <i>Variable grosor del pseudotallo</i>	55
6.2.4 <i>Variable área foliar</i>	56
6.3 INDUCCIÓN DE RESISTENCIA CON MICROORGANISMOS FORMULADOS EN SUSPENSIÓN, Y CON SOLUCIONES DE SALES DE FOSFATOS.....	60
6.4 INDUCCIÓN DE RESISTENCIA CON MICROORGANISMOS FORMULADOS EN SUSTRATOS.....	62
6.5 RELACIÓN ENTRE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO E INDUCCIÓN DE RESISTENCIA.....	65
7. CONCLUSIONES.....	68
8. RECOMENDACIONES.....	70
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
10. ANEXOS.....	87

GUTIERREZ, F.A. 1996. Estudio de factores en la inducción de resistencia a *Mycosphaerella fijiensis* y promoción de crecimiento en plantas de banano. Tesis M.Sc., CATIE, Turrialba, Costa Rica. p.

Palabras claves: *Mycosphaerella fijiensis*, banano, control biológico, inducción de resistencia, promoción de crecimiento, sustratos.

Resumen

La sigatoka negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* es el principal problema fitopatológico del cultivo del banano. Tradicionalmente, el control de la enfermedad se basa en el uso casi unilateral de fungicidas. Las aplicaciones frecuentes incrementan considerablemente los costos de producción, imponen una fuerte selección al patógeno con el consecuente desarrollo de resistencia, ponen en peligro la salud humana y originan problemas de contaminación ambiental.

El control biológico surge como una opción más en el manejo integrado de la enfermedad. Anteriormente se ha trabajado en control biológico con microorganismos antagonistas. Este trabajo propone la inducción de resistencia y promoción de crecimiento como mecanismos potenciales para el manejo de la enfermedad. El fenómeno de inducción de resistencia se basa en que las plantas susceptibles contienen la información genética para la resistencia y que pueden ser estimulados por varios medios, incluyendo patógenos, microorganismos no patogénicos y sustancias químicas.

El presente trabajo se realizó con el propósito de inducir la resistencia a *M. fijiensis* y a la vez promover el crecimiento en plantas de banano. Se colocaron dos experimentos en casa de mallas con plantas de banano crecidas en macetas. El primer experimento consistió en hacer aplicaciones de suspensiones a la rizosfera de la planta, con cuatro bacterias y un hongo, y aplicaciones al área foliar con sales de fosfatos. El segundo experimento consistió en aplicar cuatro bacterias y un hongo en tres sustratos, bagazo, cachaza y broza, a la rizosfera del banano, y evaluar los efectos de estos sobre la promoción de crecimiento e inducción de resistencia.

Los microorganismos utilizados fueron *Serratia marcescens* (R1), *Bacillus cereus* (A30), *Pseudomonas fluorescens* (PRA25), *Pseudomonas cepacia* (AMMD) y *Trichoderma harzianum*. Se utilizaron las sales de fosfatos KH_2PO_4 Y K_2HPO_4 . No se logró promover el crecimiento ni inducir resistencia con la aplicación de suspensiones bacteriales/fungales ni con las sales de fosfatos. En las aplicaciones con sustratos, los microorganismos lograron promover el crecimiento solamente en la variable área foliar y al mismo tiempo lograron inducir un grado de resistencia. Los microorganismos con el sustrato bagazo no fueron eficientes en la promoción de crecimiento en general. Los microorganismos que mostraron un mayor desempeño en promoción de crecimiento del área foliar fueron *P. cepacia*, *P. fluorescens*, *S. marcescens* y *T. harzianum*. Los mismos presentaron el mayor desempeño en la reducción del porcentaje de infección en relación a los testigos agua y sustratos. Sin embargo, el porcentaje más bajo de infección correspondió al tratamiento con Tilt. Existe una correlación significativa negativa entre promoción de crecimiento y porcentaje de infección

GUTIERREZ, F.A. 1996. The study of factors in induced resistance to *Mycosphaerella fijiensis* and plant growth-promotion in banana. Thesis M.Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. p.

Key words: *Mycosphaerella fijiensis*, banana, biological control, induced resistance, plant growth-promotion, substrates.

Summary

Black Sigatoka, caused by the fungus *Mycosphaerella fijiensis*, is the main phytopathological problem in banana cultivation. Traditionally, management of the pathogen is based on the almost unilateral use of fungicides. The frequent applications increase considerably the cost of production, impose a strong selection process on the pathogen with the consequent development of resistance, endangers human health and originates environmental contamination problems.

Biological control arises as another option in the integrated management of the disease. Formerly, research work has been undertaken with antagonistic microorganisms. The present work proposes induced resistance and plant growth-promotion as potential mechanisms for the management of the disease. The phenomenon of induced resistance is based on the precept that susceptible plants contain the genetic information for resistance and that these can be stimulated by various means, including pathogens, non-pathogenic beneficial microorganisms and chemical substances.

The present work was undertaken with the objective of inducing resistance against *M. fijiensis* and at the same time obtain plant growth-promotion in banana. Two experiments were set up in a screen house, with banana plants grown in pots. The first experiment consisted of the frequent application to the rhizosphere of suspensions of four plant growth-promoting bacteria and a fungus, and foliar applications with phosphate salts. The second experiment consisted of the application to the rhizosphere of four bacteria and a fungus, formulated in three substrates, sugarcane pulp, sugarcane filter press and coffee hull and the posterior evaluation of plant growth-promotion and induced resistance.

The microorganisms used were *Serratia marcescens* (R1), *Bacillus cereus* (A30), *Pseudomonas fluorescens* (PRA25), *Pseudomonas cepacia* (AMMD) and *Trichoderma*

harzianum. The potassium salts KH_2PO_4 and K_2HPO_4 were used as chemical inductors. It was not possible to achieve growth promotion nor induce resistance with the applications of bacterial/fungal suspensions nor with the phosphate salts. Regarding the applications with the substrate formulations, the microorganisms managed to promote growth only of the foliar area and at the same time achieve a certain degree of induced resistance. The microorganisms formulated in sugarcane pulp were not efficient in promoting growth in general. The microorganisms that showed the best performance in growth promotion were *P. cepacia*, *P. fluorescens* and *T. harzianum*. These also showed the best performance with the reduction of infection, in relation to the controls with water and substrates. However, the lowest percentage of infection was obtained with the application of Tilt. There is a significant and negative correlation between growth promotion and percentage of infection.

ESTUDIO DE FACTORES EN LA INDUCCIÓN DE RESISTENCIA A *MYCOSPHAERELLA FIJIENSIS* Y PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO EN PLANTAS DE BANANO

1. INTRODUCCIÓN

La sigatoka negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* es una enfermedad del follaje del banano y plátano, la cual, si no se le controla adecuadamente, afecta el rendimiento y calidad del fruto ya que las hojas son los órganos que sintetizan las sustancias necesarias para su desarrollo.

Su manejo convencional se basa en el uso de fungicidas protectores y sistémicos. Las aplicaciones frecuentes que en ciertos casos alcanzan hasta treinta y cinco ciclos de fungicidas por año (CORBANA, 1993), ha causado la resistencia del patógeno, especialmente a los fungicidas sistémicos, aumentando el potencial de daño al ambiente y elevando los costos de producción. Sin embargo, la tendencia ha sido de seguir con el uso de los fungicidas como el arma principal para el combate y se cuenta con pocos productos químicos capaces de ejercer un control efectivo.

Ante este problema, el control biológico surge como una alternativa para el manejo de la sigatoka negra. Éste presenta varias ventajas en el manejo de enfermedades; por ejemplo, reduce el uso de plaguicidas sintéticos disminuyendo de esta forma la contaminación al ambiente, incluyendo a las fuentes acuíferas y el riesgo a la salud humana. Otra ventaja importante es su efecto duradero ya que a largo plazo se logra establecer un equilibrio en los sistemas de producción. Además, es más difícil que los patógenos logren desarrollar resistencia a los plaguicidas biológicos.

En banano se ha trabajado con resultados positivos en el control biológico del hongo causante de la sigatoka negra, principalmente a través del mecanismo de antagonismo. En trabajos realizados por González *et al* (1996b), las bacterias *Serratia marcescens* y *Bacillus cereus* ejercieron un excelente control el campo con aplicaciones al follaje. Ruiz (1995) probó diferentes sustratos para mejorar la persistencia de los microorganismos anteriores. Las aplicaciones al follaje con distintos sustratos pueden desarrollar el balance de la flora bacteriana antagónica del filoplano. Sin embargo, existe el riesgo de estimular el crecimiento de otros microorganismos indeseables. Para eliminar los riesgos de la aplicación de antagonistas al follaje es importante considerar la inducción de resistencia y la promoción de crecimiento.

La inducción de resistencia tiene la ventaja de poder estimular mecanismos de defensa en plantas totalmente susceptibles a una enfermedad. En ciertos casos, la inducción puede ser permanente, protegiendo así la planta durante toda su ciclo de vida. Otra ventaja es que puede ser sistémica, ya que la inducción en un sitio puede servir para otras partes de la planta.

La promoción de crecimiento es un fenómeno relacionado a la inducción de resistencia. La promoción de crecimiento se da como consecuencia de una eliminación de la actividad de microorganismos deletéreos. De esta forma, se reduce el efecto del patógeno y se presenta una condición secundaria que es un incremento en el crecimiento de la planta.

Las referencias que se tienen sobre la inducción de resistencia y promoción de crecimiento en banano son muy pocas y más bien se fundamentan en observaciones preliminares y empíricas. A nivel visual, González *et al*, (1996b) y Ruiz (1996) han observado diferencias

en crecimiento de las plantas tratadas con organismos antagonistas que se conocen por tener propiedades para inducir resistencia y promover el crecimiento. Miranda (1996) logró establecer diferencias en el grosor del pseudotallo en plantas tratadas en la raíz con diferentes cepas de bacterias.

En algunas pruebas es difícil separar los efectos antagónicos de los efectos de inducción de resistencia. Además, surge el problema de la alteración de la flora del filoplano. Para evitar este problema, la aplicación de los microorganismos a la rizosfera podría demostrar si los antagonistas probados inducen resistencia.

El establecimiento de las poblaciones de los microorganismos depende de varios factores. Uno de estos es la disponibilidad de fuentes de alimento para que sobreviva el agente de control. El vehículo usado para portar y mantener a los agentes en el suelo debe cumplir con esta condición. Las bacterias y hongos usados en el control biológico, comúnmente han sido aplicados en vehículos como turba y talcos o encapsulados en gomas y geles. Es importante trabajar con un sustrato fácil de adquirir y con la capacidad de proporcionar las condiciones de supervivencia a los microorganismos.

Dada la importancia del banano y plátano en centroamérica, y el compromiso de CATIE de producir conservando y conservar produciendo, surge la necesidad de profundizar más en investigaciones sobre el mecanismo de inducción de resistencia y la promoción de crecimiento, como posibles tácticas en el manejo de la sigatoka negra y su aplicación mediante sustratos apropiados.

2. OBJETIVOS GENERALES

Evaluar la capacidad de cuatro bacterias, un hongo y un inductor químico para inducir resistencia a *M. fijiensis* y promover el crecimiento en banano.

Evaluar la eficiencia de tres sustratos para la aplicación de los microorganismos inductores de resistencia y promotores de crecimiento a la rizosfera de la planta de banano.

3. HIPÓTESIS

Las bacterias, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas (Burkholderia) cepacia*, *Pseudomonas (Burkholderia) fluorescens*, *Bacillus cereus*, el hongo, *Trichoderma harzianum* y el agente químico fosfato no promueven el crecimiento del banano ni inducen resistencia contra *M. fijiensis*.

No hay diferencia en el desempeño de los organismos al utilizar varios sustratos

4. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1. Aspectos generales de *M. fijiensis*

4.1.1 Taxonomía

Mycosphaerella fijiensis pertenece a la clase Ascomycetos, sub clase Loculoascomycetidae, orden Dothideales, familia Dothideaceae, genero *Mycosphaerella* (Alexopoulos y Mims, 1979).

M. fijiensis (Morelet) es la forma sexual o teleomórfica del patógeno mientras el estado imperfecto o anamórfico corresponde a *Paracercospora fijiensis* (Zim) (Pons, 1989). Se caracterizan por tener estructuras miceliales con paredes de quitina, ascas en ascocarpos y otras características que se han establecido para el subreino (Whittaker, 1969).

4.1.2. Biología

4.1.2.1. Estructuras reproductivas

El hongo se caracteriza por la producción de conidios y ascosporas. En los primeros estados se forman conidióforos y conidios. Los conidióforos se desarrollan primero sobre la superficie abaxial de pizcas iniciales en el primer estado de estrías y continúa hasta el primer estado de mancha (Meredith y Lawrence, 1969). Poco tiempo después del desarrollo de la lesión, ocurre un cese en la producción de conidióforos y se inicia la formación de espermagonios yseudotecios.

Los espermagonios se desarrollan en el segundo estado de estría o primer grado de mancha y son más abundantes sobre la cara abaxial que sobre la adaxial. Estos frecuentemente lo hacen en la superficie abaxial en la cámara subestomática de la cual uno o más conidióforos han emergido. Los pseudotecios son más anfigenos pero se encuentran más frecuentemente sobre la superficie adaxial de la mancha (Leach, 1964). La principal fuente de inóculo son las ascosporas (Meredith *et al*, 1973; Gauhl 1990). Los conidios son importantes al parecer, en la diseminación entre hojas vecinas mientras las ascosporas son responsables de la diseminación en el campo.

La importancia se nota en la capacidad de producir unidades infectivas. Se considera que una estría de sigatoka negra produce en promedio 134 conidióforos cada uno con 6 conidios, lo cual implica que cada estría puede producir más de 1000 conidios (Quiñon, 1972). Mientras tanto, en conteos de ascosporas en plantaciones comerciales, se han encontrado entre 8000 a 32000 ascosporas por m³ de aire durante 24 horas (Stover, 1980).

4.1.2.2. Condiciones climáticas que favorecen al patógeno

La lluvia, el rocío y la temperatura son los componentes del clima más importantes en el desarrollo y diseminación de la enfermedad. Las altas temperaturas, la alta humedad relativa y los climas lluviosos favorecen la rápida propagación y alto grado de infección (González y Jaramillo, 1979).

La temperatura óptima para el crecimiento del patógeno es de 26° C pero si la humedad es baja y las temperaturas nocturnas menores a 20° C, se frena el desarrollo de la enfermedad (Stover y Simmonds, 1987).

4.1.3. Origen de la sigatoka negra

La mancha causada por sigatoka se reportó por primera vez en la isla de Java en 1902 y posteriormente en Fiji en 1912 (Meredith, 1970). En años posteriores, la enfermedad se distribuyó a varias regiones bananeras incluyendo Australia en 1924. Para 1937 se reportaban serios daños en varios países incluyendo México, América Central, Colombia, el Caribe (Stover, 1972) y al Ecuador en 1950, África Oriental en 1938 y África Occidental en 1940. Esta forma del patógeno se conocía como *Mycosphaerella musicola*. En 1963, en Fiji se presentó un tipo más severo del patógeno, probablemente proveniente de Nueva Guinea o de las islas Solomón (Stover, 1978) y se le conoció como sigatoka negra, causada por *M. fijiensis*. Se diseminó en toda Asia, posteriormente. *M. fijiensis* hizo su aparición en centroamérica en 1972 en Honduras, y desde 1977 hasta 1980 se dispersó por el resto de centroamérica y sur de México. Algunas áreas se mantienen libres aun, como por ejemplo, ciertas áreas en Colombia, Ecuador, Venezuela, Brasil e islas del Caribe.

4.2. El problema de la sigatoka negra en la producción bananera

La sigatoka negra presenta un problema económico importante ya que el manejo constituye un rubro económico muy elevado en los costos de producción. Además, ejerce un efecto negativo sobre el desarrollo, rendimiento y calidad del fruto. La enfermedad causa una defoliación severa en la planta aunque no la mata. Sin embargo, ocurre un efecto adverso sobre la calidad de la fruta. Si la enfermedad no se controla, la fruta tiende a madurarse en tránsito. Esto causa que el fruto se coseche a un menor grado para evitar la maduración, causando una disminución en el peso promedio de los racimos. En el campo, las hojas llegan a la senescencia rápidamente y se remueven prematuramente como una práctica para reducir inóculo, causando una disminución adicional en el peso del racimo (Stover y Simmonds, 1987).

Sauma (1995) reportó que en Costa Rica los rendimientos disminuyeron de un promedio nacional de 2731 cajas año⁻¹ ha⁻¹ en 1989 a 1850 cajas año⁻¹ ha⁻¹ en 1994. Esto se atribuye en parte a los efectos del patógeno, además de los pocos incentivos de los productores a hacer un mejor control, debido a los bajos precios internacionales del banano. El manejo de la enfermedad cuesta en Costa Rica cerca de \$46 millones para mantener las 46000 ha en producción, con aproximadamente 35 aplicaciones por año (CORBANA, 1993.)

4.3. Manejo convencional de la Sigatoka negra

Mycosphaerella fijiensis se introdujo al Caribe y América Central en 1972 (Stover y Dickson, 1976). Desde entonces la enfermedad se ha manejado con base en fungicidas. Stover (1989) describe las diferentes etapas por la cual pasó el manejo químico de *M. musicola* y *M. fijiensis*. Desde 1936-1962, el control se basó en el uso de fungicidas protectantes. Éstos inclulan las mezclas bordelesas, fungicidas cúpricos, aceites y los ditiocarbamatos. Describe también una etapa antes de 1978 cuando los aceites derivados de petróleo fueron usados extensivamente. En 1967, Du Pont introdujo el Benlate (benomil) en Honduras que resultó muy eficiente en el manejo de la enfermedad. Calixin (tridemorph) también fue introducido al mismo tiempo pero no fue sino hasta diez años después que se descubrió su efectividad contra el hongo. Sin embargo en 1976 se empezó a observar resistencia al benomil y se volvieron a reintroducir otros protectantes, incluyendo clorothalonil y mancozeb. También se empezó a experimentar con mezclas entre fungicidas sistémicos y protectantes.

Otras modificaciones al manejo de la sigatoka incluyeron el diseño de sistemas de preaviso. Klein (1960) utilizó un método de conteo de rayas y los efectos de los fungicidas en diferentes etapas de desarrollo y correlacionado a factores climáticos. Ganry y Meyer (1972ab) diseñaron otro método que medía el desarrollo de la lesiones, y correlacionado con las temperaturas y tasa de evaporación. Cada método involucraba el uso de aceites y fungicidas los cuales han sido modificados para ajustarlos a diferentes latitudes. Se han reportado éxitos con estos métodos. Por ejemplo, en Camerún, la sigatoka era controlada con

tan solo 10 - 14 aplicaciones año⁻¹ en comparación a centroamérica donde se hacen hasta 35-45 aplicaciones (Stover, 1989).

En 1984, se introdujo el Tilt (propioconazole) de la familia de los triazoles y hasta el momento constituye la base del control químico. El Tilt se trató de manejar de una forma adecuada para evitar el desarrollo de resistencia. Algunos criterios usados fueron los siguientes: alternancia de productos de acción diferente, utilización de mezclas de productos sistémicos y protectantes, limitar el uso de un sistémico a no más de 8 aplicaciones año⁻¹, y no más de dos aplicaciones consecutivas con un mismo fungicida sistémico (Vargas y Calderón. 1991).

Sin embargo, recientemente el hongo ha presentado resistencia a este fungicida y se están probando otros productos para el control de la enfermedad. Se están usando otros productos tales como Baycor, Calixin y Bumper (Elango 1996, comunicación personal). Actualmente, están surgiendo otras moléculas con potencial contra la enfermedad pero es cuestión de tiempo para comprobar si éstas son eficientes para el manejo. Por esta razón, se ha hecho necesario incursionar en otros campos de manejo de enfermedades para enfocar el problema de la sigatoka.

4.4. Control biológico

Baker y Cook (1974) definen el control biológico como la reducción del inóculo o de la actividad de la producción de la enfermedad logrado por o a través de uno o más organismos excluyendo al hombre. La definición es bastante amplia e incluye varios conceptos de control biológico tanto clásicos como nuevos. En la actualidad se incluyen varios conceptos nuevos tales como el uso de bacterias promotoras de crecimiento, resistencia inducida, sistemas bióticos que excluyen al patógeno del hospedante, y el uso de plantas transgénicas.

Andrews (1992) propone una definición más concisa. El control biológico es fundamentalmente ecología aplicada. Específicamente, su meta es de manejar una comunidad microbial para favorecer al agente de control y desfavorecer al patógeno. El uso de microorganismos como agentes de control ha atraído mucho interés en la rama de fitopatología en los últimos veinte a treinta años (Cook, 1993). Jacobson y Backman (1993) proponen que las razones por este cambio son las siguientes:

- El público percibe que los residuos de los plaguicidas sintéticos causan problemas de seguridad en los alimentos y que son dañinos al ambiente.
- La resistencia a los plaguicidas es otro problema que va en incremento al igual que la calidad del agua superficial y subterránea
- Existe preocupación sobre especies en peligro de extinción y seguridad de los trabajadores que aplican los plaguicidas.
- El auge por los productos orgánicos está apoyando el uso y desarrollo de productos biológicos.

Sin embargo, las estrategias de control biológico han sido limitadas por una demora en el desarrollo de productos de control biológico o el bajo retorno económico de los agentes de control biológico, el costo, el volumen de los materiales y enmiendas requeridos para favorecer la supresión por parte de los agentes de control. Además, los agentes de control biológico son de un espectro reducido y muchas veces menos eficaces que los plaguicidas sintéticos.

4.5. Situación actual de los productos biológicos registrados para uso comercial

Son muy pocos los productos registrados por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los EE.UU. como control biológico de enfermedades. La corta lista incluye las siguientes (Cook, 1993):

Binab-T : a base de *T. harzianum/polisporum* usado para la protección de heridas causada por la poda en varios cultivos.

Galtrol-A: a base de *Agrobacterium agrobacter* K-84 para el control de agallas causadas por *A. tumefaciens* en los cultivos en que se presenta esta enfermedad.

Dagger-G: a base de *Pseudomonas fluorescens* para el control de enfermedades de plántulas de algodón.

F-Stop: a base de *T. harzianum* para el control del mal de talluelo en frijol, maní y arveja.

GL-21 y GlioGard: a base de *Gliocladium virens* contra *Pythium* y *Rhizoctonia*.

Quantum 4000 LTH y **Kodiak** a base de *Bacillus subtilis* raza A-13/GB03 como inoculante para semillas de maní, algodón y frijol contra la pudrición de la raíz causada por *Rhizoctonia*.

Los microorganismos se usan más a la manera de un plaguicida que de un producto biológico (Cook, 1991). Esto se debe en gran parte por la experiencia obtenida con *Bacillus thuringiensis* contra lepidópteros. Además, para las aplicaciones, existe el uso de formulaciones, adyuvantes, y equipo similar al usado para agroquímicos (Sutton y Peng, 1993).

La barrera que se interpone al desarrollo de productos comerciales a base de microorganismos existe sobre todo en el registro de nuevos productos. En los Estados Unidos, la EPA considera a los microorganismos que colonizan a las plantas o partes de ellas como plaguicidas microbiales y por ende sujetas a control regulatorio por la Acta Federal sobre Insecticidas, Fungicidas y Rodenticidas (FIFRA) y la Acta Federal sobre Alimentos, Drogas y Cosméticos (FFDDA). Estas agencias requieren un permiso de uso experimental si el microorganismo se usara en más de 3.9 ha y deben ser registrados como plaguicidas microbiales antes de ser vendidos. Debido a esto se filtran productos o agentes que no justifican el costo de registro. Además, este registro requiere que se hagan pruebas toxicológicas, las cuales pueden costar hasta US\$200000 (Cook, 1993)

4.6. El control biológico como alternativa en el manejo de enfermedades

El control biológico de patógenos puede ocurrir a través de varias formas. El uso de microorganismos antagonistas es una de ellas. Otras formas se basan en la inducción de resistencia local o sistémica causada por microorganismos que también pueden ser promotores de crecimiento de las plantas (Kloepper, 1994).

El fenómeno de resistencia inducida se basa en que las plantas susceptibles contienen la información genética para la resistencia contra las enfermedades y que éstas se pueden expresar sistemáticamente por periodos extendidos de tiempo con la previa inoculación de patógenos, formas avirulentas de patógenos, razas no patogénicas a cultivares, componentes microbiales, y otros químicos de origen no microbial. (Kuc, 1982, 1987).

Los microorganismos involucrados en inducir la resistencia en un hospedero promueven una respuesta que en cambio protege partes de la planta, siendo el caso de inmunización local (Dehne *et al*, 1984; Giri y Sinha, 1979; Weltzein, 1989) o partes de la planta distantes al sitio de inducción, siendo el caso de inmunización sistémica (Dean y Kuc, 1985, Gottstein y Kuc, 1989, Tuzun y Kuc 1985a,b).

Los agentes inductores de resistencia se dividen en varios grupos. Uno muy importante son los microorganismos patogénicos. El concepto de como la planta se vuelve resistente se basa en que las plantas susceptibles pueden ser infectadas y luego logran recobrase o también ser infectadas en sitios donde la enfermedad no causa daño. Cualquier condición induce la resistencia. (Tuzun y Kloepper, 1995). Otro grupo de inductores son los microorganismos no patogénicos. Estos toman la forma de suspensiones y/o filtrados de bacterias saprofiticas (

Schmidt, 1988; Schönbeck *et al*, 1980) hongos saprofiticos (Gregersen y Smedegaard-Peterson, 1989) e inclusive micorriza contra hongos(Rosendahl, 1985) y nemátodos (Carling *et al*, 1989).

El otro grupo involucrado en la inducción de resistencia se refiere a las rizobacteria promotores de crecimiento de las plantas. Este grupo presenta varios efectos benéficos. Uno es la promoción directa del crecimiento (Kapulnik, 1991; Schroth y Becker ,1990). Otro efecto es el control biológico de la enfermedad (Bakker *et al*, 1991; Kloepper 1991, 1993) y por último, la inducción de resistencia en el hospedante (Kloepper *et al*, 1993; Tuzun y Kloepper, 1994). Meera *et al* (1993) también describieron a hongos promotores de crecimiento en zacates para céspedes que inducen resistencia sistémica contra *C. orbiculare* en pepino.

Además de inducción por parte de microorganismo, el fenómeno se puede lograr con ciertos tipos de agentes químicos. Se sabe que varias formas de fosfatos , tales como oxalatos, dipotasio/sódico o tripotasio/sódico, logran inducir resistencia (Gottstein y Kuc, 1989). El uso de ácidos grasos insaturados (Cohen *et al*, 1991a), herbicidas del grupo de los dinitroanilinas (Cohen *et al*, 1991b), los ácidos salicílicos, 7-methanol benzol-1,2,3-thiadiazol, ethapón (Okuno *et al*, 1991), chitosán, y otros compuestos son responsables de muchos casos de resistencia inducida.

4.7 Respuestas de defensa en las plantas y regulación molecular

Las plantas superiores cuentan con varios mecanismos de defensa que son inducibles al ocurrir las interacciones planta-patógeno. Muchas de estas respuestas son el resultado de la activación en la transcripción de genes específicos (Kombrink y Somssich, 1995)

Las muchas interacciones se pueden agrupar en tres clases que pueden estar o no relacionadas entre sí. Generalmente, se reconocen los siguientes:

1. Respuestas de defensa tempranas e inmediatas: reconocimiento y señalización intracelular
2. Respuestas locales de defensa
3. respuestas sistémicas de defensa

Un cuarto fenómeno, la promoción de crecimiento, esta asociado al sistema de defensa pero su aporte a los otros mecanismos no es tan claro aún.

4.7.1. Respuestas de defensa tempranas e inmediatas: reconocimiento y señalización intracelular

Esta respuestas de defensa se conocen como una primera línea de defensa debido a la reacción rápida y a su correlación de la inducción subsecuente a otras respuestas de defensa.

Algunas de las respuestas que ocurren es el cambio en los flujos iónicos (H^+ , K^+ , Cl^- , Ca^{2+}) a través de la membrana plasmática y la formación de H_2O_2 tan pronto como 2-5 minutos después de la aplicación de elicitores (Nurnberger *et al*, 1994). El Ca^{2+} se ha ligado a la fosforilación de proteínas. Al mismo tiempo, ocurre una rápida biosíntesis de etileno y la activación transcripcional de genes relacionados a la defensa de las plantas.

Estos flujos iónicos, fosforilaciones proteicas y síntesis de especies activas de oxígeno cumplen funciones como componentes que ejecutan señales que activan otros genes de defensa, en lo que sería una segunda línea de defensa (Kombrink y Somssich, 1995).

Sin embargo, no en todos los casos se asocia esta señalización con la inducción de respuestas subsecuentes de defensa, como el caso que conlleva a la síntesis de fitoalexinas. Esto indica que pueden existir vías de señalización alternativas (Devlin y Gustine, 1992; Felix *et al*, 1993).

Algunos de estos componentes que se forman rápidamente y forman parte de las vías señaladoras, pueden participar directamente en la defensa de las plantas contra patógenos. Algunas formas o especies de oxígeno, tales como el anión superóxido (O_2^-) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) son citotóxicos y debido al proceso del “estallido de oxígeno” pueden causar la muerte del patógeno y/o hacer lento el ingreso de éstos, al reforzar la pared celular a través de un enlazamiento cruzado oxidativo de proteínas específicas estructurales (Apostol *et al*, 1989; Bradley *et al*, 1992; Mehdy, 1994).

Estas formas activas de oxígeno pueden contribuir a la muerte celular de los hospedantes y se asocian al colapso rápido y a la muerte de las células infectadas , proceso que ocurre durante la reacción de hipersensibilidad. Por su parte, la reacción de hipersensibilidad parece ser un proceso multicomponente genéticamente determinado que es poco entendido a nivel molecular. Al parecer este proceso restringe al patógeno al privarlo de los nutrientes requeridos para el crecimiento y el desarrollo. El proceso, al parecer, involucra un daño irreversible a la membrana que resulta en un escape de electrolitos y peroxidación de lípidos

(Atkinson, 1993; Collinge *et al*, 1994). Esto causa la muerte celular y aislamiento del patógeno, que no llega a producir enfermedad.

4.7.2. Respuestas locales de defensa

Esta segunda clase de defensa se asocia también a la reacción de hipersensibilidad. Estas respuestas bioquímicas muchas veces involucran la resíntesis de proteínas y son consecuentes de un transcripción por parte de los genes que se activan. Estas proteínas pueden directamente o indirectamente restringir el desarrollo de los patógenos invasores. Éstos incluyen enzimas claves de metabolismo general de polipropanoides tales como Liasa-amónica de fenilalanina y 4-coumarato: CoA ligasa, innumerables proteínas involucradas en la biosíntesis de fitoalexinas y otros metabolitos secundarios, glicoproteínas ricas en hidroxipolina y proteínas ricas en glicina, proteínas relacionadas a la patogenicidad intra y extra celulares que incluyen quitinasas y 1,3- β -glucanasa, peroxidasa, lipoxigenasa, proteinasa e inhibidores de poligalacturonasa, y proteínas antimicrobiales (Somssich *et al*, 1989; Taylor *et al*, 1990; Pontier *et al*, 1994).

El metabolismo del fenilpropanoide es de mucha importancia ya que de sus tantas vías ramificadas se produce una gran variedad de compuestos con diversas funciones. Estos incluyen pigmentos, antibióticos (fitoalexinas), protectores de rayos ultravioletas, moléculas señaladoras y compuestos estructurales tales como lignina, suberina y otros componentes de pared celular que la convierten menos permeables a los patógenos (Hahlbrock y Scheel, 1989).

Las fitoalexinas constituyen un grupo de componentes químicos con amplio espectro de actividad antibiótica (Nicholson y Hammerschmidt, 1992). Cada especie de planta produce un conjunto característico de fitoalexinas que se derivan de metabolitos secundarios y frecuentemente constituyen de derivados de fenilpropanoide, terpenoides y poliacetilenos (Hahlbrock y Scheel, 1989).

Este tipo de defensa local se da como respuesta rápida y localizada de los mecanismos de defensa en el sitio de ingreso del patógeno, después de un reconocimiento inicial. Por esto se considera como una segunda línea de defensa que es esencial para limitar la invasión a pequeñas áreas de tejido. Aparentemente, en este tipo de respuesta, los niveles inducidos de la expresión genética, es lo mismo para todas las células en toda el área afectada y existe una demarcación fija entre células totalmente activadas y aquellas sin afectar (Schmelzer *et al*, 1989).

Aun cuando existe una correlación de estas formas de activación de los genes relacionados a la defensa, con la reacción de hipersensibilidad, hay pocos datos que muestran una relación estrecha entre los dos mecanismos. Muchos de estos genes relacionados a la defensa pueden ser activados por elicitores que no causan la reacción de hipersensibilidad o se expresan en niveles similares en interacciones compatibles y no compatibles (Schroder *et al*, 1992; Atkinson, 1993; Jakobek y Lindgren, 1993). La reacción de hipersensibilidad solo ocurre en interacciones incompatibles y requiere la presencia de un grupo de genes conocidos como *hrp*. Los mutantes patogénicos que carecen de estos genes inducen la producción de sustancias relacionadas a la defensa pero no la reacción de hipersensibilidad. Además, aunque existe mucha evidencia de que la reacción de hipersensibilidad es un componente

altamente importante de defensa, en muchos casos se observa resistencia independiente de este mecanismo (Atkinson, 1993). Se puede deducir entonces que las plantas poseen otras maneras para detener la invasión.

4.7.3. Respuestas sistémicas de defensa

El tercer tipo de respuesta de defensa se conoce como resistencia inducida o resistencia sistémica adquirida. La infección local por algunos patógenos puede llevar a una resistencia generalizada, aunque se reconoce una serie de elicitores bióticos y abióticos que pueden iniciar el proceso.

Este tipo de resistencia es efectivo contra un amplio rango de patógenos, incluyendo virus, bacterias y hongos y puede durar por varias semanas o meses. El mecanismo se ha correlacionado con la activación sistémica de varias respuestas de defensa específicas, por una vía de transducción iniciada localmente en el sitio de ataque del patógeno (Kessmann *et al*, 1994). Sin embargo, de todos los mecanismos de defensa conocidos, solo algunos se correlacionan con la resistencia inducida. Este mecanismo se considera como un componente adicional del sistema de defensa de la planta que, al ser dirigido a subsecuentes invasores, se considera como una tercera línea de defensa.

De los cambios notados en el proceso de inducción de defensa se encuentra la producción de proteínas relacionadas a la patogénesis. En tabaco, se reconocen por lo menos nueve familias de genes que se activan sistémicamente como respuesta a la infección local con el virus del mosaico del tabaco (Ward *et al*, 1991). Estos genes codifican proteínas tales como 1.3- β -glucanasa, quitinasas, proteínas ligadoras de quitinas, proteínas parecidas a la taumatina, y

PR1, todos con actividad antifúngica (Kombrink y Somssich, 1995). La aplicación de ácido salicílico y de ácido 2,6-dicloroisonicotínico activó estos mismos genes (Kessmann, *et al*, 1994).

En varios estudios, la inducción se restringió a las isoformas ácidas de las proteínas relacionadas a la patogenicidad (PR), sugiriendo que las isoformas básicas no se involucran en la inducción sistémica (Brederode *et al*, 1991; Ward *et al*, 1991). Sin embargo, la inducción sistémica en papa muestra que las isoformas básicas y ácidas se involucran en el proceso (Schroder *et al*, 1992).

Las reacciones que ocurren varían de acuerdo a la especie. Por ejemplo, en pepino, se forman otros compuestos tales como una quitinasa única de clase III, niveles elevados de peroxidasa, glucoproteínas ricas en hidroxiprolina, lipogenasas y ácido salicílico (Madamanchi y Kuc, 1991; Hammerschmidt, 1993). En otros casos, específicamente en melón tomate y tabaco, se activan inhibidores de proteínasa pero sus funciones en la resistencia no han sido establecidos (Roby *et al*, 1987; Geoffroy *et al*, 1990; Pautot *et al*, 1991; Linthorst *et al*, 1993).

4.7.4. Promoción de crecimiento

Muchos estudios han ligado el fenómeno de promoción de crecimiento por ciertos grupos de organismos esencialmente bacterias saprofitas, con la inducción de resistencia a hongos, bacterias y virus (Wei *et al*, 1991; Liu *et al*, 1995 a,b; Raupach *et al*, 1996). Sin embargo, mientras en la inducción clásica, se han determinado una serie de reacciones que explican dicho fenómeno, los que explican la promoción de crecimiento no son tan claras. Muchas

bacterias promotoras de crecimiento se han asociado con la estimulación de la producción de compuestos bioquímicos asociados a la defensa. Van Peer *et al* (1991) observaron incrementos en la acumulación de fitoalexinas en claveles con el uso de *Pseudomonas sp.* En frijol, también se han incrementado los niveles de proteínas PR (Hynes y Lazarovitz, 1989), incrementos en la actividad de la peroxidasa (Albert y Anderson, 1987), y un incremento en la lignificación (Anderson y Guerra, 1985).

Los mecanismos por los cuales los microorganismos promotores de crecimiento causan un incremento en el crecimiento no son claros aun. Algunos han sido propuestos para explicar el fenómeno. Se cree que la promoción de crecimiento se da como una respuesta indirecta al cambiar el balance microbial en la rizósfera (Kloepper y Schroth, 1981). Algunos de los mecanismos involucrados son, por ejemplo, que las bacterias benéficas brindan protección contra patógenos no parasíticos de las raíces, posiblemente mediante el empleo de sustancias antibióticas (Broadbent *et al*, 1977, Weller, 1988). Estos organismos no parásitos se cree inhiben el crecimiento sin causar síntomas algunos. Rovira (1972) calculó que por lo menos el 20% de la producción potencial de las plantas se debe a la acción de estos microorganismos. Las bacterias benéficas podrían inhibir a estos microorganismos o destruir las fitotoxinas que producen.

Algunos promotores de crecimiento también cuentan con sideróforos quelatantes de hierro (Kloepper *et al*, 1980), otros producen HCN, que esta implicado en la supresión de bacterias deletéreas (Stutz, *et al*, 1986).

Otro mecanismo es el de producción de sustancias que promueven el crecimiento, incluyendo reguladores de crecimiento como giberelina (Brown 1972), o auxinas

(Merrimann *et al*, 1975). Algunas bacterias también pueden transformar minerales no disponibles y compuestos orgánicos en formas disponibles a la planta (Bajpal y Sundara Rao, 1971). En algunos casos, especies como *Bacillus polymyxa*, *B. racemosus* y *B. circulans* logran fijar nitrógeno libre en condiciones anaeróbicas (Rovira, 1963; Mulder y Brotonegoro, 1974).

La forma como se asocian los organismos promotores de crecimiento a la defensa de la planta se pueden colocar en dos grupos principales: los que controlan enfermedades por antagonismo y los que controlan las enfermedades por mecanismos que no involucran la producción de compuestos tóxicos. En este último se incluyen los que compiten por sustrato o sitio y los que inducen resistencia.

4.8. Microorganismos como agentes de control biológico

4.8.1. *Serratia marcescens*

Es una bacteria productora de enzimas, incluyendo dos proteasas, una metaloproteasa, una serinoproteasa (Kaska, 1976), y una quitinasa (Lysenko, 1976). Varios aislados de la bacteria pueden ejercer control sobre varios grupos de plagas, incluyendo insectos como el caso de *Cnaphalocrocis medinalis* en arroz (Joshi *et al*, 1987), en nemátodos, como *Meloidogyne incognita* en tomate (Zavaleta-Mejía y Van Gundy, 1989). En este caso la acción se atribuyó a la secreción de sustancias volátiles producidas por la actividad metabólica de la bacteria.

El microorganismo se ha usado para el control de enfermedades bacterianas y fungales. Entre varios trabajos figuran algunos tales como el control de *Xanthomonas campestris* pv *vignaradiatae* en frijol (Bora *et al*, 1993). Se han reportado casos de control eficiente contra hongos como *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*. El mecanismo de acción considerado es la competencia por nutrimentos con el patógeno (Ordentlich *et al*, 1987). Algunas cepas aisladas de la filósfera del banano han tenido acción antagonista contra *M. fijiensis* atribuyendo esta acción a las propiedades quitinolíticas del organismo (González *et al*, 1996b).

4.8.2. *Pseudomonas cepacia*

Ha sido utilizada en el control biológico contra patógenos foliares. Knudsen y Spurr (1987) obtuvieron un antagonismo contra *Cercospora arachidicola* mayores al control utilizado. Una cepa también ha sido utilizada contra *Rhizoctonia solani* en rábano japonés (Homma *et al*. 1989).

4.8.3. *Pseudomonas fluorescens*

Es una bacteria que está asociada al filoplano como también a la rizósfera. Cuando la bacteria se introduce en la semilla o material de siembra, controla enfermedades patogénicas del suelo y promueve el crecimiento al suprimir organismos dañinos del suelo (Kloepper, 1991). Son varios los mecanismos que operan en el control biológico con *P. fluorescens*. Esta bacteria es de acción antagonista. Como antagonista, se cree que reduce la germinación

de esporas y crecimiento del tubo germinativo y causa lisis de la hifa, lo cual reduce el desarrollo de las lesiones (Austin *et al.*, 1977).

Hay razas que producen sideróforos, los cuales inhiben el crecimiento de otros microorganismos de las raíces al competir por y fijar el hierro disponible en el suelo (Schroth y Hancock, 1982). Además, varios aislamientos de *P. fluorescens* producen dos antibióticos fenil pirrol clorinados, uno con acción inhibitoria contra oomicetos (Howell y Stipanovic, 1980). Además de producir antibióticos antifungales, otros aislamientos producen antibióticos antibacteriales no identificados que inhiben el crecimiento de *P. syringae* pv. *phaseolicola* en frijol (Teliz-Ortiz y Burkholder, 1960). En otros casos producen sustancias tales como el cianuro (Voisard *et al.*, 1989).

El mejor ejemplo del uso de *P. fluorescens* es en el control de *Gaeumannomyces graminis* var *tritici*. La raza 2-79 se aisló en 1979 de las raíces de trigo y se ha usado intensivamente para el control de la enfermedad (Cook, 1991) y el mecanismo de control es por antibiosis. La bacteria también ejerce efectos de promoción de crecimiento e inductores de resistencia. En papa, la bacteria ha causado incrementos en los rendimientos y control de varias enfermedades (Kloepper y Schroth, 1981).

4.8.4. *Trichoderma harzianum*

Trichoderma spp. se encuentra entre los mejores antagonistas conocidos y ha sido utilizado por largo tiempo en control biológico de varias enfermedades de plantas y bajo diferentes condiciones ambientales. Actúa como hiperparásito, como productor de antibióticos o como competidor de nutrientes con características de crecimiento rápido (Reinecke, 1974).

Trichoderma spp. producen antibióticos volátiles y no volátiles (Dennis y Webster 1971 a,b). Se han identificado dos sustancias antibióticas que son, trichodermina, un antibiótico sesquiterpeno activo contra hongos y varios antibióticos peptídicos activos contra hongos y bacterias. El acetaldehído se cree es uno de los antibióticos volátiles.

Algunos mutantes de *T. harzianum* pueden degradar el mucílago de los ápices radiculares de las plantas que consisten en parte de carbohidratos complejos tales como celulosa, hemicelulosa y pectina (Ahmad y Baker 1987 a,b). Esto le confiere a estos mutantes una mejor utilización de celulosa en la raíz y una mejor habilidad competitiva.

Como competidor, *T. harzianum* se ha reportado para el control de *Botrytis cinerea* en frutas de fresa durante la cosecha y almacenamiento (Tronsmo y Dennis, 1977). Además de ser controladores de la área foliar, *T. harzianum* es un hiperparásito de patógenos de la raíz. Alcantara (1978) utilizó *T. harzianum* exitosamente contra *Sclerotium rolfsii*.

También ha sido usado bajo un sistema de exclusión de nicho. Una formulación conocida como Dinab T (*Trichoderma harzianum* | *polysporum*) se utiliza para proteger heridas producidas durante la poda contra hongos que pudren la madera (Ricard, 1981). Otra

formulación conocida como F-Stop (*Trichoderma harzianum*) se usa como tratamiento de semillas para mejorar plántulos de maíz, frijol y otras hortalizas (Cook, 1993).

4.8.5. *Bacillus cereus*

Bacillus spp son candidatos promisorios para el control biológico de enfermedades por la características de producir endosporas que son tolerantes al calor y a la desecación (Weller, 1988). *Bacillus spp.* ejerce efectos inhibitorios contra muchos patógenos y a la vez es un promotor de crecimiento en varios géneros de plantas (Broadbent *et al*, 1977).

B. cereus ha sido utilizado en el control de enfermedades foliares. Kokalis-Burelle *et al* (1992) obtuvieron reducciones significativas comparativas con el uso de *B. cereus* más quitina contra *Cercospora arachidicola* en maní.

Doherty y Preece (1978) descubrieron que *B. cereus* se asociaba a uredosporas de *Puccinia allii* y que inhibía la germinación de uredosporas *in vitro* y podía reducir el número de pústulas *in vivo* si se aplicaba a altas concentraciones.

Okumoto *et al* (1993a) utilizó *B. cereus* contra *Alternaria solani* con buenos resultados a nivel de laboratorio e invernadero. En el caso de *M. fijiensis* González *et al* (1996b) obtuvo un antagonismo aceptable y comparable al uso de fungicidas con la cepa A30 de *B. cereus*.

4.9. Fosfatos como agentes inductores de resistencia y promotores de crecimiento

Se ha comprobado que las sales de fosfatos tienen potencial de inducir resistencia contra varias enfermedades y al mismo tiempo estimular el crecimiento. Reuveni *et al* (1993) reportan sobre el uso de sales de fosfatos en el control de *Exserohilum turcicum* en maíz con una protección del 83% en el número de lesiones y un 98% en la reducción del número de pústulas causadas por *Puccinia sorghi* en el mismo cultivo.

El uso de estas sales se reportan en el control de *Sphaerotheca fulginea* en pepino donde se ha obtenido hasta un 98% de protección, además de estimular el crecimiento en la planta. Gottstein y Kuc (1989) reportaron sobre el uso de sales de fosfato de potasio dibásico y tribásico como inductores en pepino. Otros trabajos han reportado inducción de resistencia contra la roya en *Vicia faba* (Walters y Murray, 1992) y contra mildew polvoso, bacterias y virus en pepino (Mucharromah y Kuc, 1991).

No se sabe exactamente cual es el mecanismo que causa la inducción de resistencia pero se han observado cambios en procesos fisiológicos de la planta. Irwin y Kuc (1990) obtuvieron resultados positivos de inducción de resistencia con K_2HPO_4 contra *C. lagenarium*. Ellos observaron un incremento en la actividad de la peroxidasa y la quitinasa hasta diez veces mayor que la normal.

4.10. Uso de bacterias de la rizosfera como inductores de resistencia y promotores de crecimiento contra patógenos foliares

Son pocos los casos y trabajos publicados sobre el uso de microorganismos de la rizósfera que inducen resistencia a patógenos foliares a través de la promoción de crecimiento. Wei *et al* (1991) utilizaron varias bacterias promotoras de crecimiento, incluyendo *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. aureoginosa* y *Serratia polymuthica* contra *Colletotrichum orbiculare* en frijol. Éstas causaron una reducción en el número y diámetro de las lesiones causadas por el patógeno. En un sistema de frijol, *P. fluorescens* redujo el número de lesiones foliares causadas por *P. syringae* pv. *phaseolicola* al inocular la semilla antes de la siembra (Alstrom, 1991).

4.11. Control biológico de la sigatoka

El control de la sigatoka negra se ha limitado a muy pocos trabajos y es una táctica muy poco estudiada y aprovechada. Entre los trabajos llevados a cabo se encuentra el de Jiménez *et al* (1985), que reportan el efecto antagonista *in vitro* de 12 cepas de *Pseudomonas sp.* y el de una cepa de *Pseudomonas sp.* con un antagonismo superior al clorotalonil en plantas de invernadero.

Esquivel (1992) menciona cinco hiperparásitos de *M. fijiensis*, el más común *Hansfordia pulvinata*, asociado a la fase anamórfica del patógeno. González *et al* (1996b) utilizaron las bacterias de acción quitinolítica, *Serratia marcesens* y *Bacillus cereus* contra el patógeno. Estas bacterias ejercieron un antagonismo *in vitro* de 84% y 70% respectivamente, muy

similar al fungicida utilizado en el control de la enfermedad. En pruebas de campo se logró un control del 41%, en comparación con el 60 % alcanzado con los químicos. En otros trabajos realizados por Ruiz (1995), los diferentes sustratos permitieron la persistencia del microorganismo en el filoplano. No se detectaron diferencias en severidad con respecto a las plantaciones comerciales. En observaciones hechas por González *et al* (1996b) y Ruiz (1995), las plantas tratadas con microorganismos quitinolíticos presentaban un crecimiento notable en vigor y reducción de la enfermedad. Se cree que este vigor se debe a que las soluciones con bacterias se incorporan al suelo desde el filoplano y estas bacterias colonizan la rizosfera y ejerciendo una promoción de crecimiento. Estas observaciones abren campo para investigaciones con microorganismos inductores.

Otros trabajos con microorganismos han sido reportados. Rodríguez (1995) probó organismos inoculados via endofítica en plátano de la variedad Curaré pero no se observaron efectos sobre la enfermedad. Miranda (1996) probó organismos con potencial de promover crecimiento e inducir resistencia con la aplicación de sustratos y bacterias al suelo. Los resultados indicaron que la bacteria *B. cereus* cepa A30 ha mostrado una promoción de crecimiento significativa en plántas de banano en el invernadero

4.12. El uso de sustratos y formulaciones en el control biológico con microorganismos.

El control biológico depende del establecimiento y mantenimiento de un umbral poblacional de bacterias en el material de siembra o en el suelo; por lo tanto una reducción de la viabilidad bajo dicho nivel puede eliminar su eficiencia (Bull, 1987). La supervivencia y el establecimiento de las bacterias en el suelo dependen de varios factores edáficos incluyendo la temperatura, humedad, pH, y contenido de arcilla. Además, la manera en que las bacterias se cultivan y luego se procesan, afecta la viabilidad y tolerancia a condiciones adversas una vez aplicadas al suelo (Weller, 1988).

El manejo y la aplicación de microorganismos al suelo, especialmente bacterias gram-negativas es un asunto delicado, debido a que éstas son muy sensibles a la desecación y al calor (Davidson y Reuszer, 1978). Este problema es menos importante con *Bacillus* spp ya que estos producen endosporas y a la vez son más fácilmente formuladas (Knudsen y Spurr, 1987). Debido a estos problemas, el material que se use para las formulaciones debe cumplir con los requisitos necesarios para promover la persistencia del microorganismo. Muchos de los materiales usados actualmente son los mismos desarrollados para *Rhizobium* spp. Comúnmente se ha usado turba (Thompson, 1980) y suelos minerales (Chao y Alexander, 1984). Por ejemplo, la turba se ha usado para *P. fluorescens* en la formulación del producto comercial Dagger-G (Weller, 1988).

Sin embargo, se están usando otras formulaciones más sofisticadas como es la encapsulación de bacterias en materiales sintéticos tales como polímeros de gelatinas. Bashan (1986) reporta sobre el uso de alginato de sodio y leche descremada en forma peletizada para

bacterias de los géneros *Azospirillum brasilense* y *Pseudomonas* spp. Este material le confiere ventajas a la formulación ya que contiene un reservorio de cultivo de bacterias que libera a éstas de una forma controlada y a una tasa constante. Estos pelets son biodegradables, son fáciles de aplicar y se pueden aplicar al mismo tiempo que las semillas. Éstos, además se pueden almacenar a temperatura ambiente por tiempos prolongados sin la pérdida de la efectividad en el contenido bacterial, ocupa menos espacio y el control de calidad del número de bacterias en el pelet es simple.

Otras formas de encapsulación se basan en el uso de geles de alginatos y arcillas (Fravel *et al.*, 1985) *P. cepacia* y los hongos *Talaromyces flavus*, *Gliocladium virens*, *Penicillium oxalicum* y *Trichoderma viride* han sido formulados en estos sustratos.

Los polímeros de gelatinas no solamente incluyen a los alginatos. Las gomas de xantana han sido utilizadas juntamente con talcos para formulaciones secas de bacterias promotoras de crecimiento para papa (Kloepper y Schroth, 1981).

La encapsulación con otros materiales que no sean geles también se ha reportado. Zidack *et al.* (1995) han logrado la encapsulación de bacterias gram-negativas y hongos usando materiales simples tales como aceite vegetal, almidón de maíz y azúcares en un producto final que es barato y que presenta una viabilidad en almacenamiento excelente.

Otra forma común de aplicar microorganismos es a través de formulaciones líquidas. Esto es común para bacterias y hongos benéficos. Papavizas *et al.* (1984) reportan sobre el uso de la fermentación líquida para *G. virens*, *T. hamatum*, *T. harzianum*, *T. viride* y *Talaromyces flavus* utilizando materiales comunes tales como melaza y levadura. Se reporta también la

importancia de una base de alimentos para la proliferación en el suelo de *Gliocladium sp* y *Trichoderma sp*.

También se hacen aplicaciones de suspensiones acuosas de polvos mojables o talcos, especialmente con bacterias. Knudsen y Spurr (1987) reportan sobre el uso de polvos de bacterias liofilizadas de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* como aplicaciones foliares contra *C. arachidicola*.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Localización

El experimento se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Agronomico Tropical de Investigacion y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica, ubicado a 640 metros sobre el nivel del mar. La temperatura media anual es de 22 C°, una humedad relativa media anual de 90.4 % y una precipitación anual promedia de 2600 mm.

5.2. Experimento I: Inducción de resistencia y promoción de crecimiento con la aplicación de microorganismos en suspensión acuosa, y sustancias inductoras de resistencia.

5.2.1. Material experimental

5.2.1.1. Microorganismos evaluados

Los microorganismos se seleccionaron con base en su capacidad de inducir resistencia y promover crecimiento en varias especies de plantas.

Bacterias

La bacteria *Serratia marcescens* cepa R1 se obtuvo de la colección del proyecto MIP, aislada originalmente de plantas de banano (Gonzalez *et al*, 1996a)

Pseudomonas fluorescens cepa Pra 25 se obtuvo de la colección MIP, *Pseudomonas cepacia* cepa AMMD se obtuvo de la colección MIP, proveniente de EEUU,

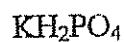
Bacillus cereus cepa A30 se obtuvo de la colección MIP, aislada originalmente de tomate (Okumoto y Bustamante, 1993b)

Hongo

La cepa de *Trichoderma harzianum* se obtuvo de la colección MIP y provino originalmente de EEUU.

5.2.1.2. Agente químico evaluado

Las sales de fosfatos de potasio dibásicas y tribásicas presentan las características de poder inducir resistencia y promover el crecimiento en varias especies de plantas. Existen muchas formas pero las que han presentado mejores resultados son los siguientes:



5.2.1.3. Variedad de banano

Se utilizaron plantas de banano de la variedad Gran Enano, provenientes de cultivos de tejido. Las plantas se sembraron en macetas con capacidad volumétrica de 8000 ml, en suelo esterilizado con Basagran. No se hizo ninguna aplicación de fertilizantes al suelo ya que podría enmascarar los efectos de la promoción de crecimiento por los microorganismos. Se utilizó un suelo franco arcilloso de fertilidad aceptable para el banano (Anexo 1). Las aplicaciones se empezaron cuando las plantas tenían cuatro semanas de trasplante.

5.2.2. Diseño experimental

Se utilizó un diseño completamente al azar con nueve tratamientos consistiendo de cinco microorganismos, dos agentes químicos, un testigo aplicado con Tilt y un testigo con agua. Se colocaron seis repeticiones por tratamiento.

5.2.3. Inoculación de microorganismos a la rizosfera y aplicación de sustancias químicas al filoplano.

5.2.3.1. Bacterias

Se prepararon suspensiones bacteriales de las diferentes cepas. Las cepas se rayaron en medios específicos (*P. cepacia* y *P. fluorescens* en medio King's B (KBM) (King *et al.*, 1954); *S. marcescens* y *B. cereus* en agar nutriente quitina (ANQ)). Para obtener las concentraciones deseadas, se tomó el crecimiento bacterial de platos petri con cuarentiocho horas, se colocaron en tubos de ensayo con agua estéril, se determinó la concentración bacteriana con un hematocímetro y se ajustó hasta 1×10^9 unidades formadoras de colonias (ufc) ml^{-1} . Luego, se determinó la densidad óptica o absorción de luz en un espectrofotómetro, obteniendo un valor que posteriormente se utilizaba para ajustar las suspensiones, sin tener que recurrir todas las veces al hematocímetro.

Las suspensiones se aplicaban al suelo en las macetas hasta llevarlas a capacidad de campo. Las aplicaciones se hicieron con intervalos de cuatro días. Cada maceta requirió 400 ml de suspensión por aplicación. Las aplicaciones se hicieron durante 200 días, incluyendo 15 días después de la inoculación con el patógeno *M. fijiensis*.

5.2.3.2. Hongo

Se prepararon suspensiones de *T. harzianum* de 1×10^6 conidios ml^{-1} . El hongo se sembró anteriormente en agar de papa dextrosa (PDA) y se dejó esporular por 8 días. El crecimiento se recuperó de los platos petri, se diluyó en en tubos de ensayo con agua estéril y se determinó la concentración conidial con un hematocímetro y se ajustó hasta la concentración deseada. Luego, se determinó la densidad óptica o absorción de luz en un espectrofotómetro y el valor se utilizaba para las preparaciones posteriores.

Las aplicaciones se hicieron de la misma forma que las bacterias y con la misma frecuencia.

5.2.3.3. Agente químico

Se prepararon soluciones de KH_2PO_4 y K_2HPO_4 en agua estéril a 200 mM. Para obtener la concentración adecuada se diluyeron 27.2 g de KH_2PO_4 y 34.8 g de K_2HPO_4 por litro de agua. Las sales de fosfato se aplicaron a las hojas 2 y 3 una vez por semana durante un mes antes de la inoculación con el patógeno. Se hicieron aplicaciones con soluciones de KH_2PO_4 y K_2HPO_4 en agua estéril a 200 mM. La aplicación se hizo con una asperjadora de mano. Se cubría toda la planta con plástico excepto las hojas a aplicar, con el propósito de lograr la separación del área tratada para la inducción de resistencia sistémica.

5.2.3.4. Tilt.

El fungicida se comenzó a aplicar 30 días antes de la inoculación con la última a los 15 días después de la inoculación, con un intervalo de aplicación de 15 días. Se utilizó una dosis de 100 g de ingrediente activo (i.a.) ha⁻¹.

Para esto, se utilizó una aspersora manual y se aplicó toda la planta.

5.2.4. Inoculación con *M. fijiensis*

Las plantas fueron trasladadas a una plantación de banano en la Montaña, con una extensión de dos ha, la cual presentaba un alto grado de infección con sigatoka y al cual no se le hacía ningún tipo de manejo contra la enfermedad. Las plantas se dejaron por cuatro días para asegurar una buena exposición al inóculo natural.

5.2.5. Variables evaluadas

Las variables que se evaluaron fueron las siguientes:

5.2.5.1 Promoción de crecimiento

5.2.5.1.1. Altura

Esta variable consistió del crecimiento en altura observado durante 150 días de evaluación del experimento. Se calculó la diferencia de altura al inicio y final del experimento. La medición de altura se tomó desde el nivel del suelo hasta el ángulo formado por el pecíolo de la hoja más nueva desarrollada y la segunda hoja.

5.2.5.1.2. Grosor del pseudotallo

El grosor del tallo se midió a cinco cm de la base del suelo. Se tomaron dos mediciones por planta. Con un calíper de Vernier, se hacía una medición en la parte más ancha del pseudotallo y otra en la parte más angosta, promediando los valores.

5.2.5.1.3 Emisión foliar

La emisión foliar consistió en medir el número de hojas emitidas durante 150 días. Las mediciones se hicieron semanalmente de acuerdo a la escala de Brun (Anexo 2).

5.2.5.1.4 Área foliar

Se hizo una sola medición del área foliar al final del experimento y consistió en determinar el área total de la planta. Se obtuvo el área foliar usando la siguiente fórmula (Soto, 1985):

$$L \cdot A (0.8)$$

donde L = largo de la hoja

A = ancho de la hoja

0.8 = factor debido a la curvatura de la hoja.

El área total se obtuvo sumando las áreas individuales.

5.2.5.2. Inducción de resistencia

Se hizo una medición del porcentaje de infección 30 días post inoculación. Para hacer la evaluación, se utilizó un marco de 3 cm². La evaluación se hizo en la hoja más joven que fue expuesta a la inoculación. El marco se colocó en el margen derecho de la hoja, viendo la hoja de frente (Anexo 3). Una medición se hizo en la punta cerca de la periferia de la hoja y la otra se hizo a la mitad de la hoja, contando el número de estrías dentro del marco.

El porcentaje se determinó midiendo el área infectada y restando del área total del marco y los dos porcentajes se promediaron (Gauhl, 1990). Los datos porcentuales se transformaron obteniendo el arcoseno de la raíz cuadrada del valor porcentual para un posterior análisis estadístico.

5.2.6. Análisis estadístico

Se hizo un análisis de varianza y se utilizó la prueba de rango múltiple de Duncan para comprobar si hubo diferencia entre los tratamientos.

5.3. Experimento II: Inducción de resistencia y promoción de crecimiento con la aplicación de microorganismos en sustratos

5.3.1. Material experimental

5.3.1.1. Sustratos

Se utilizaron tres sustratos que son subproductos de cultivos principales de la zona. El bagazo es el subproducto de la molienda de la caña de azúcar. La cachaza se obtiene de los residuos de la purificación de la miel de la caña de azúcar. La broza proviene de los residuos de la remoción de la cáscara de los granos de café. A estos sustratos se les agregó otros ingredientes como se presentan a continuación:

Bagazo de caña/sucrosa/melaza/aceite de maíz

Cachaza/sucrosa/melaza/aceite de maíz

Broza/sucrosa/melaza/aceite de maíz

5.3.1.2. Microorganismos

Serratia marcescens cepa R1

Pseudomonas fluorescens cepa Pra 25

Pseudomonas cepacia cepa AMMD

Bacillus cereus cepa A30

Trichoderma harzianum

5.3.2. Diseño experimental

Se utilizó un modelo de parcelas divididas en un diseño completamente al azar con los tres sustratos como parcelas principales y los microorganismos como subparcelas. Se utilizaron tres sustratos (bagazo, broza, cachaza) más un testigo con agua, un testigo para cada sustrato, consistiendo del sustrato preparado y aplicado sin ningún microorganismo y un testigo con el fungicida Tilt. Se usaron cinco microorganismos como tratamientos, con cuatro repeticiones por tratamiento.

5.3.3 Preparación de los sustratos

5.3.3.1. Materiales

1. BROZA (1000 cc broza + 30 g sucrosa + 30 ml aceite + 30 ml melaza)
2. CACHAZA (1000 cc cachaza + 30 g sucrosa + 30 ml aceite + 30 ml melaza)
3. BAGAZO (1000 cc bagazo + 30 g azúcar + 60 ml aceite + 30 ml melaza)

5.3.3.2. Procedimiento

Se tamizaron los tres materiales (Broza, Cachaza y Bagazo) en una malla de 3mm x 3mm para eliminar grumos, piedras e impurezas.

Se sometieron a autoclave por 30 min. a 121°C. dos veces consecutivas. Para esto, se usaron contenedores metálicos o bolsas autoclavables.

Después de enfriarse el material, se procedió a mezclar cada sustrato con los suplementos azúcar, aceite y melaza. Se tomaron los volúmenes indicados anteriormente para cada

material (Broza, Cachaza o bagazo) y se colocaron en un recipiente suficientemente grande para poder mezclar con facilidad. Luego se adicionó el aceite, la melaza y azúcar y se procedió a homogenizar hasta obtener una buena humectación o tener la seguridad que los materiales se mezclaron totalmente.

Las diferentes mezclas se colocaron en beakers de 400 ml. Se colocaron 250 ml del sustrato y se taparon con papel aluminio. Se llevo a cabo una tercera esterilización en autoclave por 30 min. a 121°C.

5.3.4 Formulación con microorganismos

Después de esterilizar el medio, se procedió a la adición de los microorganismos benéficos. Previamente, los microorganismos se rayaron en medios de cultivo específicos (*P. cepacia* y *P. fluorescens* en KBM; *S. marcescens* y *B. cereus* en ANQ; *T. harzianum* en PDA. Cuarenta y ocho horas después, las bacterias estuvieron listas para usar (*T. harzianum* requiere de 10-15 días para esporular). El procedimiento de recuperación y mezcla se llevó a cabo en la cámara de flujo laminar. Para recuperar a los microorganismos, se adicionaron 20 ml de agua estéril sobre el crecimiento bacterial y se rayó con una asa para desprender. La suspensión bacterial/fungal se adicionó al sustrato en el beaker (Se usa un plato con buen crecimiento para los 250 ml de sustrato). Es necesario homogenizar bien el sustrato para distribuir la suspensión bacterial/fungal. Esto se hizo con pinzas esterilizadas en un mechero. A este punto, el sustrato está listo para aplicar a la maceta.

5.3.5. Inoculación con microorganismos

Se colocaron 250 gramos del sustrato más el microorganismo en cada maceta sembrada con plántulas de banano con 30 días de trasplantadas. Para esto, se removió la capa superficial de suelo de la maceta, se distribuyó uniformemente el sustrato y se volvió a tapar con el mismo suelo removido.

Se aplicaba riego a las macetas regularmente, manteniendo el suelo a capacidad de campo. Se llevaron a cabo cuatro aplicaciones durante el experimento con intervalo de treinta días.

5.3.6. Inoculación con *M. fijiensis*

Las plantas fueron trasladadas a una plantación de banano en la Montaña, que presentaba un alto grado de infección con sigatoka y al cual no se le hace ningún tipo de manejo contra la enfermedad. Las plantas se dejaron por cuatro días para asegurar una buena exposición al inóculo natural.

5.3.7. Variables evaluadas

Las variables que se evaluaron fueron las siguientes:

5.3.7.1 Promoción de crecimiento

5.3.7.1.1. Altura

Esta variable consistió del crecimiento en altura observado durante 110 días de evaluación del experimento. Se calculó la diferencia de altura al inicio y final del experimento. La

medición de altura se tomó desde el nivel del suelo hasta el ángulo formado por el pecíolo de la hoja más nueva desarrollada y la segunda hoja.

5.3.7.1.2. Grosor del pseudotallo

El grosor del pseudotallo se midió a cinco cm de la base del suelo. Se tomaron dos mediciones por planta. Con un calíper de Vernier, se hacía una medición en la parte más ancha del pseudotallo y otra en la parte más angosta, promediando los valores.

5.3.7.1.3 Emisión foliar

La emisión foliar consistió en medir el número de hojas emitidas durante 150 días.

5.3.7.1.4 Área foliar

Se hizo una sola medición del área foliar al final del experimento y consistió en determinar el área total de la planta. Se obtuvo el área foliar usando la siguiente fórmula:

$$L \cdot A \cdot (0.8)$$

donde L = largo de la hoja

A = ancho de la hoja

0.8 = factor debido a la curvatura de la hoja.

El área total se obtuvo sumando las áreas individuales.

5.3.7.2. Inducción de resistencia

Se hizo una medición del porcentaje de infección 30 días post inoculación. Para hacer la evaluación, se utilizó un marco de 3 cm². La evaluación se hizo en la hoja más joven que fue expuesta a la inoculación. El marco se colocó en el margen derecho de la hoja, viendo la hoja de frente. Una medición se hizo en la punta cerca de la periferia de la hoja y la otra se hizo a la mitad de la hoja, contando el número de estrias dentro del marco.

El porcentaje se determinó midiendo el área infectada y restando del área total del marco y los dos porcentajes se promediaron. Los datos porcentuales se transformaron obteniendo el arcoseno de la raíz cuadrada del valor porcentual, para un posterior análisis estadístico.

5.3.8. Análisis estadístico

Se hizo un ANOVA y se aplicó la prueba de rango múltiple de Duncan como comparador de medias para determinar si existió diferencias entre los tratamientos. Se analizaron las interacciones y de ser significativas se compararon los microorganismos dentro de cada sustrato. Si no existía interacción se compararon los tres sustratos y los microorganismos con la prueba de Duncan.

Se llevó a cabo un análisis de correlación entre la promoción de crecimiento, variable área foliar y los porcentajes de infección.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO CON MICROORGANISMOS APLICADOS EN SUSPENSIÓN Y FOSFATOS EN SOLUCIÓN ACUOSA.

6.1.1 Variable emisión foliar

La prueba de promoción de crecimiento con la aplicación de suspensiones bacterianas y fungales y dos sales de fosfatos KH_2PO_4 Y K_2HPO_4 no presentaron diferencias entre los tratamientos en cuanto a la variable de emisión foliar. Aparentemente es una variable poco indicativa de la promoción de crecimiento. Esta variable obtuvo una correlación (R^2) muy baja para ser considerada (Cuadro 1).

6.1.2 Variable altura

La variable altura tampoco presentó diferencias entre los tratamientos y no es confiable (Cuadro 1) por poseer un R^2 muy bajo y un coeficiente de variación (CV) muy alto.

6.1.3 Variable grosor del pseudotallo

El análisis de varianza indicó que no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. El grosor del pseudotallo aparentemente es afectado cuando la planta crece en macetas. Esta variable posiblemente es más confiable cuando se mide en un ensayo de campo. Debido al corto tiempo en que se midió la variable, no se detectaron diferencias significativas.

6.1.4 Área foliar

El área foliar parece ser la variable más indicativa para la promoción de crecimiento. Sin embargo, con el régimen de aplicaciones acuosas al pseudotallo, las diferencias fueron poco perceptibles como indica el análisis de varianza en el cuadro 1. Los tratamientos con áreas foliares mayores que Tilt y KH_2PO_4 fueron las bacterias *S. marcescens*, *P. fluorescens* y *P. cepacia*; sin embargo, no se presentaron diferencias con el testigo.

A pesar de la frecuencia constante de aplicación, los organismos no lograron ejercer un crecimiento significativo.

Lo más probable en este caso es que los microorganismos no lograron mantenerse en el suelo. Desafortunadamente, no se hicieron evaluaciones periódicas de los cambios en la población bacteriana. Kloepper *et al*, (1980) indican que quizás el factor más importante en la falta de promoción de crecimiento es la inhabilidad de los microorganismos para colonizar la rizósfera. Esto puede ser el resultado de varios factores tales como aislamientos no efectivos, viabilidad del microorganismo introducido, humedad de suelo, tipo de suelo y temperatura.

Otro factor que no se puede descartar es el balance microbial del suelo. Aun cuando se usó suelo esterilizado, sin duda ocurrió una recolonización de éste por otros microorganismos. Miranda (1996), explicó que microorganismos tales como *Trichoderma* sp. son colonizadores que causan un desbalance y compiten con los microorganismos introducidos. Además, los hongos como *Trichoderma* sp. pueden causar una promoción de crecimiento que enmascare el efecto del microorganismo introducido. En este caso, posiblemente estos colonizadores causaron un efecto de crecimiento en los testigos, causando que no se detectaran diferencias estadísticas. Miranda (1996), obtuvo diferencias en el grosor del pseudotallo, durante un mes de evaluación, al utilizar suspensiones bacteriales de A30, mas no fue así cuando se aplicó la misma cepa en sustrato de arroz. Existe una diferencia con el experimento actual ya que en éste no se detectaron diferencias en el grosor de pseudotallo. En este caso, las evaluaciones se llevaron a cabo por un período más largo (150 días). Es posible que después de un período largo de aplicar las soluciones, otros microorganismos lograron establecerse también, logrando un balance microbial en la rizósfera y enmascararon cualquier efecto visible de crecimiento.

Cuadro 1. Análisis de varianza de la emisión foliar, altura, grosor del pseudotallo y área foliar de las plantas de banano tratadas con bacterias, hongos y sustancias promotoras de crecimiento.

TRATAMIENTO ⁽⁺⁾	EMISION FOLIAR ^(e)	ALTURA ^(a)	GROSOR PSEUDOTALLO ^(s)	AREA FOLIAR ^(f)
<i>S. marcescens</i>	9.43 a	20.33 a	2.00 a	841.83 a
<i>B. cereus</i>	8.77 a	20.67 a	1.95 a	778.83 ab
<i>P. fluorescens</i>	8.72 a	21.02 a	1.88 a	854.17 a
<i>P. cepacia</i>	8.80 a	20.75 a	1.94 a	838.33 a
<i>T. harzianum</i>	8.57 a	21.08 a	2.19 a	790.00 ab
K ₂ HPO ₄	8.73 a	21.25 a	2.06 a	749.00 ab
KH ₂ PO ₄	8.73 a	19.33 a	1.96 a	693.83 b
TestigoTilt	8.83 a	20.25 a	2.10 a	710.33 b
Testigo H ₂ O	8.03 a	21.08 a	1.94 a	786.33 ab
P> F	0.4025	0.993	0.267	0.0327
R ²	0.159	0.03	0.188	0.295
CV	9.7	15.97	10.53	11.63

(e) Evaluación durante 150 días representando el número de hojas nuevas emitidas durante el periodo

(a) Evaluación durante 150 días representando el cambio de altura en cm desde el inicio hasta el final del estudio

(s) Evaluación durante 150 días representando el cambio en grosor del pseudotallo en cm.

(f) Evaluación durante 150 días representando el promedio del área foliar en cm cuadrados de las tres hojas más jóvenes.

(+) Los tratamientos con las mismas letras no son significativamente diferentes

6.2 PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO CON MICROORGANISMOS FORMULADOS EN SUSTRATOS.

El uso de sustratos aplicados a la rizosfera presentó una diferencia considerable en la promoción de crecimiento, en contraste con la aplicación de suspensiones acuosas. Sin embargo, no todas las variables medidas fueron indicativas de la promoción de crecimiento. Se presentaron diferencias entre los bloques principales bagazo, cachaza y broza en dos de las variables medidas (Cuadro 2). La variable de emisión foliar mostró la misma tendencia que en el experimento anterior. Al parecer, es un parámetro que no se afecta con la introducción de promotores de crecimiento. La variable grosor del pseudotallo también mostró la misma tendencia que en el experimento anterior.

En las variables altura y área foliar hubo diferencias significativas, aunque la variable área foliar fue la más confiable por tener un R^2 alto y un CV bajo. En todos los casos los sustratos cachaza y broza fueron los que mejor promovieron el crecimiento del área foliar.

Cuadro2. Desempeño de sustratos en la promoción de crecimiento.

SUSTRATO ⁽⁺⁾	EMISION FOLIAR ^(e)	ALTURA ^(h)	GROSOR PSEUDOTALLO ^(s)	AREA FOLIAR ^(f)
BAGAZO	5.064 a	6.589 b	0.9739 a	3266.30 b
CACHAZA	5.000 a	7.911 b	0.9532 a	4073.10 a
BROZA	5.029 a	10.268 a	1.0964 a	4192.80 a
PR>F	0.7529	0.0069	0.0591	0.0001
R²	0.062	0.237	0.1751	0.7463
CV	17.816	43.42	20.77	11.0179

(e) Evaluación durante 110 días representando el número de hojas nuevas emitidas durante el período

(a) Evaluación durante 110 días representando el cambio de altura en cm desde el inicio hasta el final del estudio

(s) Evaluación durante 110 días representando el cambio en grosor del pseudotallo en cm.

(f) Evaluación durante 110 días representando el total del área foliar en cm cuadrados.

(+) Los tratamientos con las mismas letras no son significativamente diferentes

6.2.1 Variable emisión foliar

El análisis de varianza para la variable emisión foliar indica que no existe diferencia entre los tratamientos en los tres sustratos (Cuadro 3). Las razones por las cuales esta variable no se afecta no son claras. Es posible que los mecanismos que los microorganismos ejercen para promover el crecimiento no tienen ningún efecto sobre la emisión foliar, al menos para el cultivo del banano.

Cuadro 3. Análisis de varianza variable emisión foliar

TRATAMIENTO ⁽⁺⁾	BAGAZO	CACHAZA	BROZA
<i>S. marcescens</i>	5.40 a	4.80 a	4.85 a
<i>B. cereus</i>	5.35 a	5.20 a	4.35 a
<i>P. fluorescens</i>	5.20 a	4.90 a	5.25 a
<i>P. cepacia.</i>	4.35 a	5.30 a	4.95 a
<i>T. harzianum</i>	4.90 a	5.20 a	4.85 a
Testigo sustrato	4.75 a	4.10 a	5.45 a
Testigo H ₂ O	5.50 a	5.50 a	5.50 a
PR>F	0.3946	0.7408	0.1189
R ²	0.239	0.142	0.358
CV	15.661	24.22	11.497

(+) Los tratamientos con las mismas letras no son significativamente diferentes

6.2.2 Variable altura

El análisis de varianza para la variable altura indica que hay diferencias entre los tratamientos utilizados (Cuadro 4). Como se indicó anteriormente en el cuadro 2., el sustrato broza ejerció un mejor desempeño que el bagazo y la cachaza. Los tratamientos en el sustrato cachaza no presentaron ninguna diferencia respecto a los testigos y en el sustrato bagazo, solamente el tratamiento *S. marcescens* ejerció un efecto de crecimiento un poco mayor que los testigos. Sin embargo, este mismo tratamiento no fue mejor que los testigos en el sustrato broza. Esto indica que los microorganismos podrían presentar un grado de selectividad por los sustratos. En el sustrato broza, solamente los tratamientos con *P. cepacia* y *P. fluorescens* presentaron una mayor altura que los testigos.

Cuadro 4. Análisis de varianza variable altura

TRATAMIENTO ⁽⁺⁾	BAGAZO	CACHAZA	BROZA
<i>S. marcescens</i>	9.38 a	5.88 a	7.63 c
<i>B. cereus</i>	5.00 ab	6.63 a	8.75 bc
<i>P. fluorescens</i>	7.38 ab	9.00 a	12.88 ab
<i>P. cepacia</i>	3.00 b	9.00 a	14.75 a
<i>T. harzianum</i>	6.75 ab	10.13 a	11.63 abc
Testigo sustrato	6.25 ab	6.375 a	7.88 c
Testigo H ₂ O	8.38 ab	8.38 a	8.38 c
PR>F	0.199	0.6368	0.0083
R2	0.312	0.1712	0.5314
CV	51.20	48.012	27.459

(+) Los tratamientos con las mismas letras no son significativamente diferentes

6.2.3 Variable grosor del pseudotallo

El análisis de varianza para la variable grosor del pseudotallo indica que no existen diferencias entre los tratamientos. Es una variable poco confiable debido a un bajo R^2 para los tres sustratos.

Cuadro 5. Análisis de varianza variable grosor pseudotallo

TRATAMIENTO ⁽⁺⁾	BAGAZO	CACHAZA	BROZA
<i>S. marcescens</i>	1.175 a	0.977 a	0.997 a
<i>B. cereus</i>	1.022 a	1.012 a	1.145 a
<i>P. fluorescens</i>	0.940 a	0.965 a	1.125 a
<i>P. cepacia.</i>	0.842 a	0.933 a	1.220 a
<i>T. harzianum</i>	0.997 a	0.905 a	1.137 a
Testigo sustrato	0.775 a	0.815 a	0.985 a
Testigo H ₂ O	1.065 a	1.065 a	1.065 a
PR>F	0.973	0.823	0.6964
R ²	0.357	0.1183	0.1548
CV	19.9	24.55	19.357

(+) Los tratamientos con las mismas letras no son significativamente diferentes

6.2.4 Variable área foliar

El análisis de varianza para el área foliar de las plantas indica que hubo diferencias significativas entre los sustratos y entre tratamientos en los tres sustratos. Los tratamientos con bagazo presentaron el promedio más bajo y los sustratos cachaza y broza presentaron los promedios mayores. No hubo diferencia significativa entre estos dos últimos (Cuadro 6).

En el sustrato bagazo el mejor tratamiento fue con *S. marcescens*. Los tratamientos con el área foliar más bajo fueron los testigos con sustrato, los testigos con agua y el tratamiento *T. harzianum* (Fig 1).

En el sustrato cachaza, los mejores tratamientos fueron *P. cepacia*, *P. fluorescens* y *T. harzianum*.

Los más bajos fueron los testigos con el sustrato solamente, testigo agua y *B. cereus*. Con la excepción de este último, los tratamientos con microorganismos fueron superiores a los testigos (Fig 1).

En el sustrato broza, el mejor tratamiento fue *P. cepacia*, seguido de *T. harzianum* y *S. marcescens*. Todos los tratamientos con microorganismos fueron superiores al testigo con sustrato y al testigo con agua (Fig 1).

Los datos indican además que existe una relación entre el microorganismo y el sustrato utilizado. El sustrato bagazo parece no proporcionar las condiciones apropiadas para que el microorganismo pueda ejercer una promoción de crecimiento. Al mismo tiempo es posible que el crecimiento sea menor debido a la alta relación Carbono/Nitrógeno (C/N) del sustrato. Cualquier posible crecimiento es neutralizado porque las bacterias degradadoras en el suelo y las presentes en el sustrato requieren de N, recurso que será tomado del suelo en

detrimento del desarrollo de la planta. El Anexo 4 resume las características químicas de los tres sustratos.

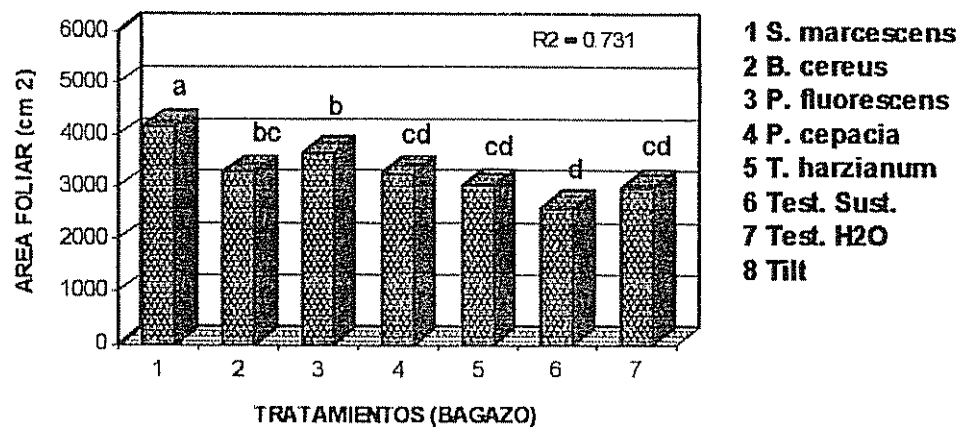
El comportamiento de los microorganismos en los sustratos cachaza y broza indica que éstos promueven significativamente el crecimiento. La diferencia en promoción de crecimiento no fue debido a un efecto de fertilización por parte del sustrato ya que el testigo con el sustrato fue inferior al los tratamientos. Los microorganismos, sin embargo, podrían ejercer un efecto de solubilización de nutrientes presentes en los sustratos y el suelo, facilitando la absorción de éstos por la planta.

El mecanismo de antagonismo a organismos deletéreos de la rizosfera se pueden descartar en este caso ya que las plantas provinieron de cultivo de tejido y el suelo fue esterilizado. Aunque puede ocurrir una invasión posterior a la esterilización, la carga sería baja como para que la promoción de crecimiento se explique por la supresión de dichos organismos.

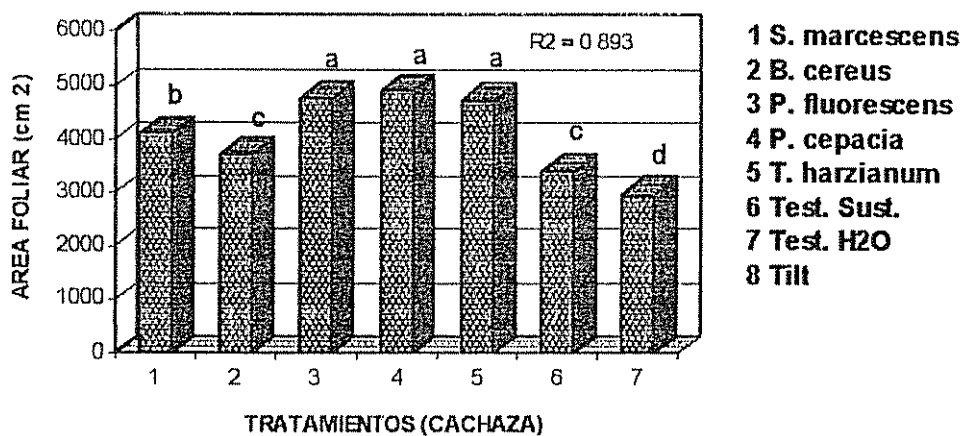
Cuadro 6. Análisis de varianza variable área foliar.

TRATAMIENTO ⁽⁺⁾	BAGAZO	CACHAZA	BROZA
<i>S. marcescens</i>	4138.8 a	4100.8 b	4764.0 ab
<i>B. cereus</i>	3264.3 bc	3694.8 c	4061.5 c
<i>P. fluorescens</i>	3627.3 b	4747.8 a	4395.0 bc
<i>P. cepacia.</i>	3254.0 bc	4887.0 a	5129.0 a
<i>T. harzianum</i>	3006.5 cd	4710.3 a	4629.3 b
Testigo sustrato	2596.0 d	3393.8 c	3393.3 d
Testigo H ₂ O	2977.5 cd	2977.5 d	2977.5 e
PR>F	0.0001	0.0001	0.0001
R2	0.7306	0.893	0.907
CV	9.908	6.769	6.29

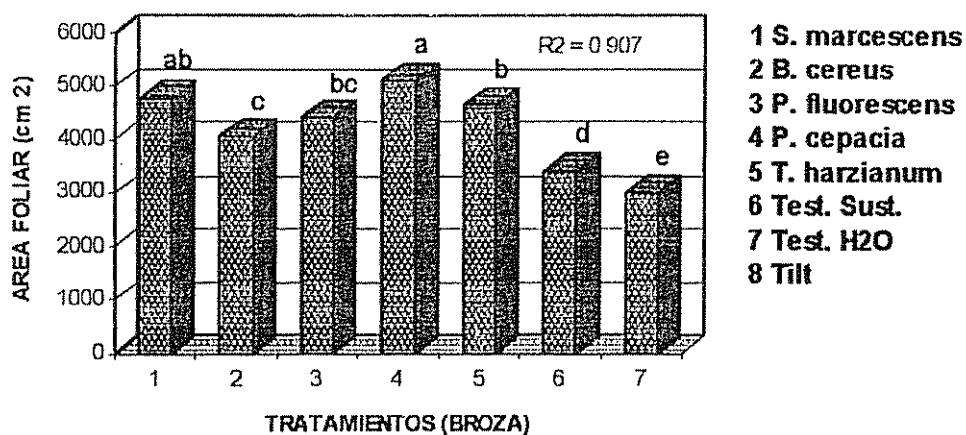
(+) Los tratamientos con las mismas letras no son significativamente diferentes



- 1 *S. marcescens*
- 2 *B. cereus*
- 3 *P. fluorescens*
- 4 *P. cepacia*
- 5 *T. harzianum*
- 6 Test. Sust.
- 7 Test. H₂O
- 8 Tilt



- 1 *S. marcescens*
- 2 *B. cereus*
- 3 *P. fluorescens*
- 4 *P. cepacia*
- 5 *T. harzianum*
- 6 Test. Sust.
- 7 Test. H₂O
- 8 Tilt



- 1 *S. marcescens*
- 2 *B. cereus*
- 3 *P. fluorescens*
- 4 *P. cepacia*
- 5 *T. harzianum*
- 6 Test. Sust.
- 7 Test. H₂O
- 8 Tilt

FIG 1. Comportamiento de los tratamientos formulados en sustratos en la promoción de crecimiento, variable área foliar.

6.3 INDUCCIÓN DE RESISTENCIA CON MICROORGANISMOS FORMULADOS EN SUSPENSIONES, Y CON SOLUCIONES DE SALES DE FOSFATOS.

El análisis de varianza de los porcentajes de infección indicó que los microorganismos y los agentes químicos no lograron inducir resistencia cuando eran aplicados a la rizósfera y al follaje respectivamente (Cuadro 7).

Los niveles más bajos de infección se lograron con el testigo fungicida Tilt. Solamente la *B. cereus* presentó un porcentaje menor que el testigo con agua. Los demás tratamientos fueron similares al testigo con agua.

Al igual que la promoción de crecimiento, la inducción de resistencia no se dió. Estos resultados sugieren que los microorganismos no se establecieron en la rizósfera a pesar de la frecuencia de las aplicaciones. Posiblemente, la falta de un sustrato alimenticio sea necesario para mantener a los microorganismos o simplemente para albergarlo, ya que puede estar ocurriendo una lixiviación de éstos a las partes inferiores de la maceta, donde la actividad de absorción es menor.

La aplicación de las sales de fosfatos KH_2PO_4 Y K_2HPO_4 tampoco lograron inducir resistencia. A las plantas de banano se les aplicó el doble de la concentración aplicada a otros cultivos (200 Mm), considerando la cerosidad de las hojas. El tejido aplicado sufrió un necrosamiento, tal como se esperaba de la aplicación de estas sustancias, indicando que éstas lograron una penetración adecuada. Posiblemente las sustancias no son compatibles con el modelo banano o se necesitaban concentraciones mayores y aplicaciones más frecuentes.

Cuadro 7. Análisis de varianza para los porcentajes de infección con la aplicación de microorganismos y sustancias químicas inductoras de resistencia aplicadas en suspensión.

TRATAMIENTO ⁽⁺⁾	MEDIA ^(t)	% INFECCIÓN	R ²	CV	PR>F
<i>S. marcescens</i>	19.94 ab	10.5	0.444	27.836	0.0005
<i>B. cereus</i>	15.35 b	6.0			
<i>P. fluorescens</i>	23.02 a	12.6			
<i>P. cepacia</i>	20.66 ab	10.5			
<i>T. harzianum</i>	18.82 ab	9.1			
K ₂ HPO ₄	19.64 ab	9.7			
KH ₂ PO ₄	20.55 ab	10.9			
Testigo Tilt	8.00 c	1.6			
Testigo H ₂ O	21.22 ab	10.9			

(t) valores obtenidos de la transformación de los datos porcentuales mediante la fórmula
 $\arcseno(\sqrt{\% \text{ infección}})$

(+) Los tratamientos con las mismas letras no son significativamente diferentes

6.4 INDUCCIÓN DE RESISTENCIA CON MICROORGANISMOS FORMULADOS EN SUSTRATOS.

La prueba de inducción de resistencia con microorganismos en sustratos presentó diferencias significativas entre tratamientos. En relación a los testigos sustratos y testigo con agua, los tratamientos con microorganismos presentaron porcentajes menores de infección. El testigo con fungicida presentó el porcentaje más bajo de infección (Cuadro 9). No existió diferencia significativa entre los tres sustratos (Cuadro 8).

Los tratamientos *P. fluorescens* y *P. cepacia* presentaron los porcentajes de infección menores. Los tratamientos que más sobresalieron fueron *P. fluorescens* y *P. cepacia*. *P. fluorescens* fue consistente en porcentajes bajos de infección en los tres sustratos. *P. cepacia* mostró niveles bajos en bagazo y cachaza. En broza, el nivel de infección no fue el menor para este tratamiento pero aun así fue menor que los testigos. Los otros microorganismos mantienen la misma tendencia en todos los sustratos con niveles inferiores a los testigos sustrato y agua.

En el primer ensayo, el testigo con agua se comportó similar a los tratamientos biológicos. En el segundo caso, los testigos presentaron mayores niveles de infección que los tratamientos. El primer caso indicó que no hay un efecto sobre la enfermedad, al no haber diferencias con el testigo absoluto. El segundo caso indica que existe un efecto contra el patógeno ya que los testigos presentaron porcentajes de infección mayores que los tratamientos con microorganismos

Esta diferencia se puede atribuir a la persistencia de los microorganismos en la rizósfera, debido a las condiciones suministradas por el sustrato.

Cuadro 8. Análisis de varianza de los sustratos en la inducción de resistencia.

SUSTRATO ⁽⁺⁾	MEDIA ^(t)	DUNCAN	R ²	CV	PR>F
BAGAZO	23.87	a	0.6227	19.35	0.0001
CACHAZA	24.89	a			
BROZA	23.839	a			

(t) valores obtenidos de la transformación de los datos porcentuales mediante la fórmula
arcoseno ($\sqrt{\%}$ infección)

(+) Los tratamientos con las mismas letras no son significativamente diferentes

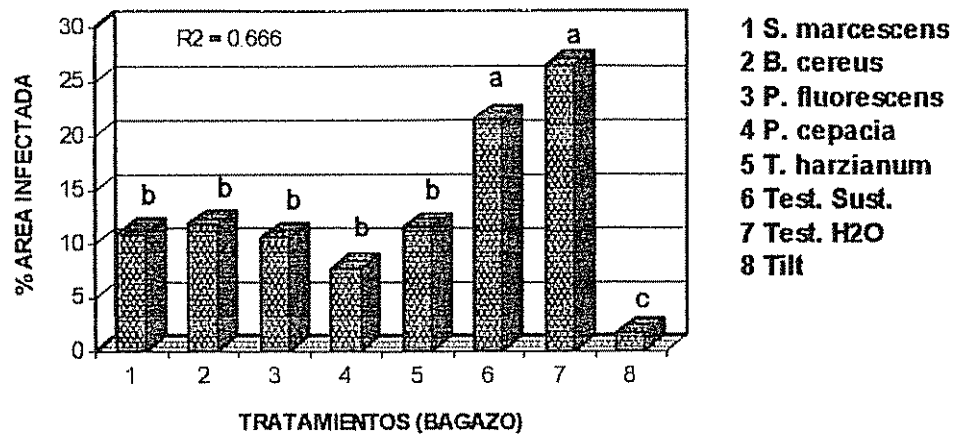
Cuadro 9. Análisis de varianza para los porcentajes de infección con la aplicación de microorganismos en sustratos.

TRATAMIENTO ⁽⁺⁾	BAGAZO ^{(t) (P)}	CACHAZA ^{(t) (P)}	BROZA ^{(t) (P)}
<i>S. marcescens</i>	21.27 b (10.9)	22.68 bc (12.3)	19.85 bc (9.4)
<i>B. cereus</i>	21.73 b (11.7)	23.50 bc (14.5)	19.95 bc (9.6)
<i>P. fluorescens</i>	20.93 b (10.4)	19.98 c (9.7)	16.70 c (6.9)
<i>P. cepacia</i>	17.25 b (7.6)	19.58 c (9.6)	23.72 b (13.4)
<i>T. harzianum</i>	21.33 b (11.4)	20.80 c (10.4)	18.83 bc (8.6)
Testigo sustrato	30.40 a (21.4)	29.90 ba (20.8)	33.53 a (25.9)
Testigo H ₂ O	34.40 a (26.4)	34.40 a (26.4)	34.40 a (26.4)
Testigo Tilt	9.25 c (1.6)	9.25 d (1.6)	9.25 d (1.6)
PR>F	0.0003	0.0048	0.0001
R ²	0.666	0.559	0.766
CV	19.26	21.79	17.82

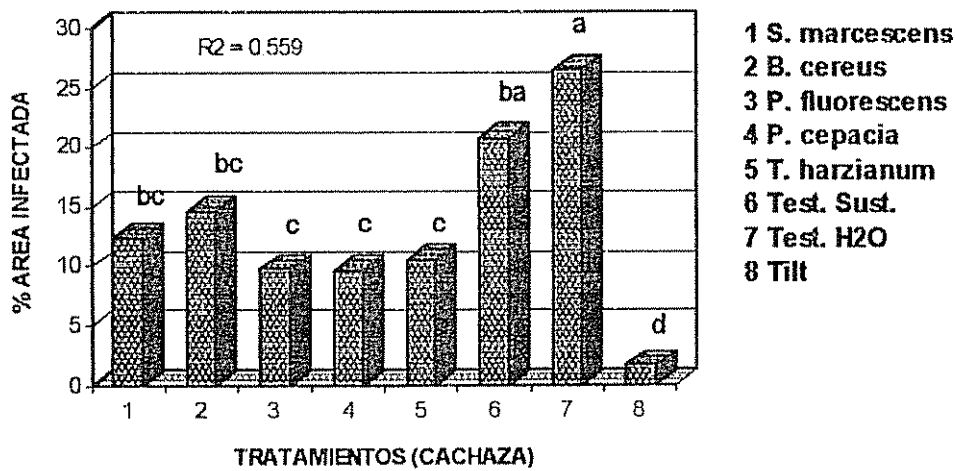
(t) valores obtenidos de la transformación de los datos porcentuales mediante la fórmula
arcoseno ($\sqrt{\%}$ infección)

(P) Los valores en paréntesis son los porcentajes reales de infección

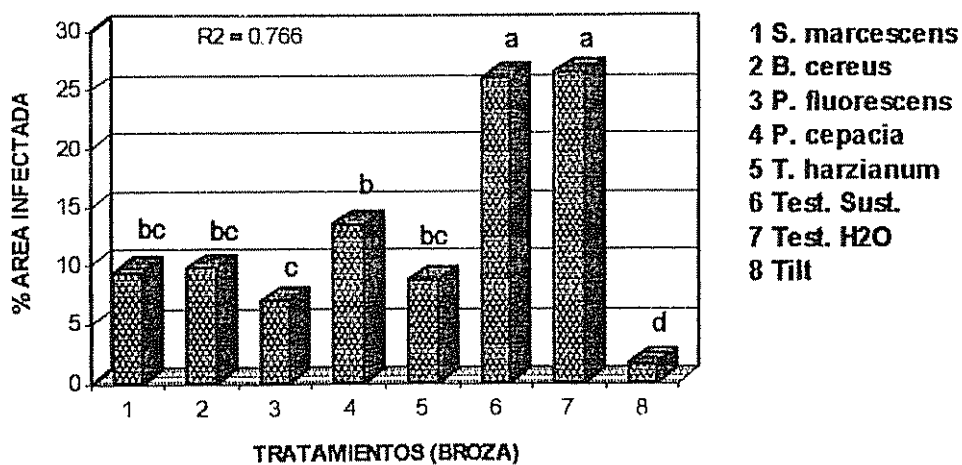
(+) Los tratamientos con las mismas letras no son significativamente diferentes



- 1 *S. marcescens*
- 2 *B. cereus*
- 3 *P. fluorescens*
- 4 *P. cepacia*
- 5 *T. harzianum*
- 6 Test. Sust.
- 7 Test. H₂O
- 8 Tilt



- 1 *S. marcescens*
- 2 *B. cereus*
- 3 *P. fluorescens*
- 4 *P. cepacia*
- 5 *T. harzianum*
- 6 Test. Sust.
- 7 Test. H₂O
- 8 Tilt



- 1 *S. marcescens*
- 2 *B. cereus*
- 3 *P. fluorescens*
- 4 *P. cepacia*
- 5 *T. harzianum*
- 6 Test. Sust.
- 7 Test. H₂O
- 8 Tilt

FIG 2. Comportamiento de los tratamientos en los diferentes sustratos, en la inducción de resistencia.

6.5 RELACIÓN ENTRE PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO E INDUCCIÓN DE RESISTENCIA.

Los resultados de promoción de crecimiento del área foliar y las diferencias entre los grados de infección entre los tratamientos indican que existe una relación entre los dos fenómenos. En forma general, se observa que en los tratamientos con microorganismos formulados en sustrato, se obtuvieron mayores áreas foliares y al mismo tiempo, los porcentajes de infección fueron menores. Los testigos agua y sustrato presentaron áreas foliares menores y mayores grados de infección (Fig1, Fig2). Sin embargo, cuando se consideran tratamientos específicos, las relaciones no son tan estrechas y ocurren inconsistencias. Por ejemplo, el tratamiento con *P. cepacia* en el sustrato broza presentó la mayor área foliar pero no el menor grado de infección. Sin embargo, en el sustrato cachaza para el mismo tratamiento, los efectos fueron inversamente proporcionales ya que obtuvo la mayor área foliar y el menor grado de infección. El análisis de correlación (Cuadro 10) indica que existe una correlación significativa negativa entre el área foliar y el grado de infección, indicando que los tratamientos que presentaron una mayor promoción de crecimiento, presentaron bajos porcentajes de infección. Las mejores correlaciones se obtuvieron con cachaza, seguida de broza. Los tratamientos en cachaza presentaron una correlación baja aunque significativa. Cuando se analizaron juntamente los tres sustratos con sus tratamiento, la correlación fue significativa y aceptable. Estos resultados indican que los dos fenómenos están relacionados y que cuando ocurre la promoción, ocurre la inducción o por lo menos un efecto sobre el patógeno. Sin embargo, no indican si es requisito que ocurra la promoción de crecimiento para que ocurra la inducción de resistencia. En la promoción de crecimiento del área foliar, los tratamientos en el sustrato bagazo, con excepción de *S. marcescens* y *P.*

fluorescens, no fueron eficientes para promover el crecimiento. En el análisis de inducción de resistencia, los tres sustratos muestran desempeños similares en cuanto a las diferencias de porcentajes de infección (Cuadro 8) sin haber diferencias significativas. En resumen, algunos tratamientos en el sustrato bagazo ejercieron un efecto de inducción sin promover efectivamente el crecimiento. Posiblemente los dos fenómenos ocurren bajo diferentes condiciones y relaciones poblacionales de los microorganismos. Podría ser que la promoción de crecimiento requiere de poblaciones altas de los microorganismos para que se lleve a cabo. Al parecer, el sustrato bagazo no proporciona esta condición y los otros dos sustratos sí. La inducción de resistencia al contrario se puede lograr con poblaciones bajas establecidas de los microorganismos y de esta forma aun los tratamientos en el bagazo lograron ejercer un efecto inductivo.

La otra posibilidad, que ha sido discutida anteriormente es que los tratamientos en el sustrato bagazo lograron promover el crecimiento pero que los efectos son enmascarados debido a relaciones nutricionales entre el sustrato el suelo y la planta. En este caso, el efecto inductivo logró manifestarse a pesar de las limitantes del sustrato

Cuadro 10. Matriz de análisis de correlación entre promoción de crecimiento e inducción de resistencia

Sustrato		% Infección	Área foliar
Bagazo	% Infección	1.00000 0.0	- 0.36670 ^a 0.0549 ^b
	Área foliar	- 0.36670 0.0549	1.00000 0.0
Cachaza	% Infección	1.00000 0.0	-0.74820 0.0001
	Área foliar	-0.74820 0.0001	1.00000 0.0
Broza	% Infección	1.00000 0.0	-0.62901 0.0003
	Área foliar	-0.62901 0.0003	1.00000 0.0
Todos los tratamientos ^c	% Infección	1.00000 0.0	-0.50635 0.0001
	Área foliar	-0.50635 0.0001	1.00000 0.0

a Representa el coeficiente de correlación. El signo enfrente indica si la correlación es positiva o negativa.

b Representa la probabilidad de que el coeficiente sea cero

c Análisis de todos los tratamientos independiente de sustratos

7. CONCLUSIONES

1. La promoción de crecimiento no se logró con la aplicación frecuente de suspensiones acuosas de bacterias, un hongo y sales de fosfatos en ninguno de las variables medidas.
2. Los microorganismos formulados en los sustratos cachaza y broza lograron promover el crecimiento del área foliar en el banano. Las bacterias *S. marcescens* y *P. fluorescens* con el sustrato bagazo lograron promover un crecimiento mayor que los testigos. Los otros no fueron eficientes en este sustrato.
3. La variable área foliar fue la más confiable para medir la promoción de crecimiento. La variable altura logró establecer diferencias solamente en el sustrato broza. Las variables emisión foliar y grosor de pseudotallo no lograron establecer diferencias entre los tratamientos ni entre sustratos.
4. Los microorganismos que mostraron un mayor desempeño en la promoción de crecimiento del área foliar fueron *S. marcescens* en sustrato bagazo, *P. cepacia*, *P. fluorescens*, *T. harzianum* y *S. marcescens* en sustrato cachaza, y broza. En la variable altura se encontró diferencia significativa en el sustrato broza.
5. Los microorganismos formulados en suspensiones acuosas y las sales de fosfatos no lograron inducir resistencia contra *M. fijiensis*.

6. Los microorganismos formulados en sustratos ejercieron un efecto inductivo visto como un porcentaje de infección menor que los testigos agua y sustrato, en los cinco microorganismos evaluados y en los tres sustratos. El testigo con fungicida presentó el nivel de infección menor de todos los tratamientos

7. Los microorganismos de mayor desempeño en la reducción de la infección fueron *P. cepacia*, *P. fluorescens* y *T. harzianum*.

8. En general, los microorganismos que promovieron el mayor crecimiento foliar, lograron los niveles más bajos de infección y existe una correlación significativa negativa entre promoción de crecimiento y porcentaje de infección.

8. RECOMENDACIONES

1. Mejorar los sustratos utilizados en los ensayos en relación a necesidades nutricionales de los microorganismos y probar otros sustratos que sean de fácil acceso y baratos.
2. Probar una gama más amplia de microorganismos y sustancias promotoras de crecimiento e inductoras de resistencia.
3. Aislar microorganismos de la rizósfera de banano en zonas de producción donde la incidencia de sigatoka es menor (zonas “no calientes”) y probar en subsecuentes ensayos. Estos organismos pueden provenir de suelos supresores y ser posibles inductores.
4. Probar otros métodos de inoculación de los agentes promotores de crecimiento e inductores de resistencia tales como inyecciones periódicas al seudotallo.
5. Determinar la dinámica poblacional y la persistencia de los microorganismos en cada uno de los sustratos utilizados.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, J.S.; BAKER, R. 1987a. Competitive saprofitic ability and cellulolytic ability of rhizosphere-competent mutants of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77: 358-362.
- AHMAD, J.S.; BAKER, R. 1987b. Rhizosphere competence of *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 77: 182-189.
- ALBERT, F.; ANDERSON, A.J. 1987. The effect of *Pseudomonas putida* colonization on root surface peroxidase. *Plant Physiology* 85:535-541.
- ALCANTARA, T.P. 1987. Antagonistic activities of *Trichoderma* species against vegetable fungal pathogens *in vitro*. B.Ag. Sc.Thesis. University of the Philippines at Los Baños. 46 pp.
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W. 1979. *Introductory Mycology*. 3ed. Wiley, New York. 632 p.
- ALSTRÖM, S. 1991. Induction of disease resistance in common bean susceptible to halo blight bacterial pathogen after seed bacterization with rhizosphere pseudomonads. *Journal of General and Applied Microbiology* 37, 495-501.
- ANDERSON, A.J.; GUERRA, D. 1985. Responses of bean to root colonization with *Pseudomonas putida* in a hydroponic system. *Phytopathology* 75:992-995.
- ANDREWS, J.H. 1992. Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology* 30:603-635.
- APOSTOL, I.; HEINSTEIN, P.F.; LOW, P.S. 1989. Rapid stimulation of an oxidative burst during elicitation of cultured plant cells. *Plant Physiology* 90:109-116.
- ATKINSON, M.M. 1993. Molecular mechanisms of pathogen recognition by plants. *Advances in Plant Pathology* 10:35-64.

- AUSTIN, B.; DICKINSON, C.H.; GOODFELLOW, M. 1977. Antagonistic interactions of phylloplane bacteria with *Drechslera dictyoides* (Drechsler) Shoemaker. Canadian Journal of Microbiology. 23:710-715.
- BAJPAL, P.D.; SUNDARA RAO, W.V.B. 1971. Phosphate solubilising bacteria. III. Soil inoculation with phosphorus solubilising bacteria. Soil Science and Plant Nutrition 17:46-53.
- BAKER, K.F.; COOK, R.J. 1974. Biological control of plant pathogens. W.H. Freeman & Co., San Francisco.
- BAKKER, P.A.H.M.; VAN PEER, R.; SCHIPPERS, B. 1991. Suppression of soil-borne plant pathogens by fluorescent pseudomonads: mechanisms and prospects. in A.B.R. Beemster; G.J. Bollen; M. Gerlagh; M.A. Puissen, B. Schippers; A. Temple, eds. Biotic interactions and soil-borne diseases. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands. pp. 217-223.
- BASHAN, Y. 1986. Alginate beads as synthetic inoculant carriers for slow release of bacteria that affect plant growth. Applied and Environmental Microbiology. 51:1089-1098.
- BORA, L.; GANGOPADHYAY, S.; CHAND, J. 1993. Biological control of bacterial leaf spot (*Xanthomonas campestris* pv *vignearadiatae* Dye) of mung bean with phylloplane antagonists. Indian Journal of Mycology and Plant Pathology, 23(2):162-168).
- BRADLEY, D.J.; KJELLBOM, P.; LAMB, C.J. 1992. Elicitor- and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein: a novel, rapid defense response. Cell 70:21-30.
- BREDERODE, F.T.; LINTHORST, H.J.M.; BOL, J.F. 1991. Differential induction of acquired resistance and PR gene expression in tobacco by virus infection, ethephon treatment, UV light and wounding. Plant Molecular Biology 17:1117-1125.
- BROADBENT, P.; BAKER, K.F.; FRANKS, N.; HOLLAND, J. 1977. Effect of *Bacillus* spp. on increased growth of seedlings in steamed and in nontreated soil. Phytopathology 67:1027-1034.

- BROWN, M.E. 1972. Plant growth substances produced by microorganisms of soil and rhizosphere. *Journal of Applied Bacteriology* 34:443-451.
- BULL, C.T. 1987. Wheat root colonization by disease-suppressive or nonsuppressive bacteria and the effect of population size on severity of take all caused by *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici*. MS Thesis. Washington State University, Pullman. 75 p.
- CARLING, D.E.; RONCADORI, R.W.; HUSSEY, R.S. 1989. Interactions of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi, root-knot nematode, and phosphorus fertilization in soybean. *Plant Disease* 73:730-733.
- CHAO, W.L.; ALEXANDER, M. 1984. Mineral soils as carriers for *Rhizobium* inoculants. *Applied and Environmental Microbiology*. 47:94-97.
- COHEN, R.; CUPPELS, D.A.; BRAMMAL, R.A.; LAZORAVITTS, G. 1991b. Induction of resistance towards bacterial pathogens of tomato by exposure of the host to dinitroaniline herbicides. *Phytopathology* 82:110-114.
- COHEN, Y.; GISI, U.; MOSSINGER, E. 1991a. Systemic resistance of potato plants against *Phytophthora infestans* induced by unsaturated fatty acids. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 38: 255-263.
- COLLINGE, D.B.; GREGERSEN, P.L.; THORDAL-CHRISTENSEN, H. 1994. The induction of gene expression in response to pathogenic microbes. *in* A.S. Basra, ed. *Mechanisms of plant growth and improved productivity: modern approaches and perspectives*. pp 391-433. Marcel Dekker, New York.
- COOK, R.J. 1991. Success with biological control requires new thinking by industry. *Counterpoint. Impact Agribusiness*. Oxon, U.K. CAB International p. 3-4.
- COOK, R.J. 1991. Biological control of plant diseases: broad concepts and applications. Pages 1-29 *in* J.B. Petersen, ed. 1991. *The biological control of plant diseases*. Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region. book-series no 42. 215 pp.

- COOK, R.J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 31:53-80
- CORPORACION BANANERA NACIONAL. 1993. Sigatoka negra: un grave problema en los bananales de Costa Rica. *Carta Informativa CORBANA (C.R.)* no. 9:1-2.
- DAVIDSON, F.; REUSZER, H.W. 1978. Persistence of *Rhizobium japonicum* on the soybean seed coat under control temperature and humidity. *Applied and Environmental Microbiology*. 35:94-96.
- DEAN, R.A.; KUC, J. 1985. Induced systemic protection in plants. *Trends in Biotechnology* 3:125-129.
- DEHNE, H.W.; STEMZEL, K.; SCHÖNBECK, F. 1984. The efficiency of induced resistance under practical culture conditions III. Reproduction of powdery mildew on induced resistant plants. *Journal of Plant Disease and Protection* 91:258-265.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. 1971a. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. I. Production of non-volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*. 57: 25-39.
- DENNIS, C.; WEBSTER, J. 1971b. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma*. II. Production of volatile antibiotics. *Transactions of the British Mycological Society*. 57: 25-39.
- DEVLIN, W.S.; GUSTINE, D.L. 1992. Involvement of the oxidative burst in phytoalexin accumulation and the hypersensitive reaction. *Plant Physiology* 100:1189-1195.
- DOHERTY, M.A.; PREECE, T.F. 1978. *Bacillus cereus* prevents germination of uredospores of *Puccinia allii* and the development of rust disease of leek, *Allium porrum*, in controlled environments. *Physiological Plant Pathology*. 12:123-132.
- ESQUIVEL, R. 1992. Algunos deuteromicetos hiperparasitos de *M. fijiensis* Morelet, Panama. Instituto de Investigaciones agropecuarias de Panama (IDIAP). 12 p.

- FELIX, G.; REGENASS, M.; BOLLER, T. 1993. Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation and establishment of a refractory state. *Plant Journal* 4:307-316
- FOSTER, R.C.; ROVIRA, A.D.; COCK, T.W. 1983. Ultrastructure of the root-soil interface. St. Paul: American Phytopathological Society. 157 pp.
- FRAVEL, D.R.; MAROIS, J.J.; LUMSDEN, R.D.; CONNICK JR, W.J. 1985. Encapsulation of potential biocontrol agents in an alginate-clay matrix. *Phytopathology*. 75:774-777.
- GANRY, J.; MEYER, J.P. 1972a. La lutte contrôlée contre la cercosporiose aux Antilles. Bases climatiques de l'avertissement. *Fruits* 27(10):665-676.
- GANRY, J.; MEYER, J.P. 1972b. La lutte contrôlée contre la cercosporiose aux Antilles. Techniques d'observation et de numérotation de la maladie. *Fruits* 27(11):767-774.°
- GAUHL, F. 1990. Epidemiologia y ecología de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*. Morelet) en plátano (*Musa sp*), en Costa Rica. Trad. Jaime Espinoza. Panamá, INIBAP. 126 p.
- GEOFFROY, P; LEGRAND, M.; FRITIG, B. 1990. Isolation and characterization of a proteinaceous inhibitor of microbial proteinases induced during the hypersensitive reaction of tobacco to tobacco mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 3:327-333.
- GIRI, D.N.; SINHA, A.K. 1979. Effect of nontoxic chemical on brown spot disease in rice seedlings. *International Rice Research Newsletter*. 4:10-11.
- GONZÁLEZ, M.; JARAMILLO, R. 1979. Enfermedades de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet var. *difformis* Mulder y Stover). ASBANA. 3-7-8 pgs.

- GONZÁLEZ, R.; BUSTAMANTE, E; SHANNON, P.; OKUMOTO, S.; LEANDRO, G. 1996a. Selección de microorganismos quitinolíticos en el control de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Manejo Integrado de Plagas 40:6-11.
- GONZÁLEZ, R.; BUSTAMANTE, E; SHANNON, P.; OKUMOTO, S.; LEANDRO, G. 1996b. Evaluación de microorganismos quitinolíticos en el control de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Manejo Integrado de Plagas 40:12-16
- GOTTSTEIN, H.D.; KUC, J. 1989. Induction of systemic resistance in cucumber by phosphates. *Phytopathology*. 79: 176-179.
- GREGERSEN, P.L.; SMEDEGAARD-PETERSEN, V. 1989. Induction of resistance in barley against *Erisiphe graminis* f.sp. *hordei* after preinoculation with saprophytic fungus, *Cladosporium macrocarpum*. *Journal of Phytopathology* 124:128-136.
- HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. 1989. Physiology and molecular biology of phenylpropanoid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 40:347-369.
- HAMMERSCHMIDT, R. 1993. The nature and generation of systemic signals induced by pathogens, arthropod herbivores and wounds. *Advances in Plant Pathology* 10:307-337.
- HOMMA, Y.; SATO, Z.; HIRAYAMA, F.; KONNO, K.; SHIRAHAMA, H.; SUZUI, T. 1989. Production of antibiotics by *P. cepacia* as an agent for biological control of soilborne plant pathogens. *Soil Biology and Biochemistry*. 21: 723-728
- HOWELL, C.R.; STIPANOVIC, R.D. 1980. Suppression of *Pythium ultimum*- induced damping off of cotton seedlings by *Pseudomonas fluorescens* and its antibiotic, pyoluteorin. *Phytopathology* 70: 712-715.
- HYNES, R.K.; LAZAROVITZ, G. 1989. Effect of seed treatment with plant growth promoting rhizobacteria on the protein profiles of intercellular fluids from bean and tomato leaves. *Canadian Journal of Plant Pathology* 11:191.

- IRWIN, H.R.; KUC, J. 1990. Local and systemic induction of peroxidase, chitinase, and resistance in cucumber plants by K_2PO_4 . *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 37:355-366
- JACOBSEN, B.J.; BACKMAN, P.A. 1993. Biological and cultural plant disease controls: alternatives and supplements to chemicals in IPM systems. *Plant disease* 77(3): 311-315.
- JAKOBEK, J.L.; LINDGREN, P.B. 1993. Generalized induction of defense responses in bean is not correlated with the induction of the hypersensitive response. *The Plant Cell* 5:49-56.
- JIMENEZ, J.; GALINDO, J.; RAMIREZ, C. 1985. Estudios sobre combate biologico de *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis* mediante bacterias epifitas. in Reunion ACORBAT (7., 1985, San Jose, Costa Rica). Memorias. Turrialba, Costa Rica, CATIE. Serie tecnica, Boletin tecnico no. 121. 503 p.
- JOSHI, R.; CADAPAN, E.; HENRICHS, E. 1987. Natural enemies of rice fodder, *Cnapahlocrocis medinalis* Guenee (Pyralisae:Lepidoptera), a critical review (1913-1983). *Agricultural Reviews (Philippines)* 8(1):22-34.
- KAPULNIK, Y.; 1991. Plant growth-promoting rhizobacteria. in Y. Waisel; A. Eshel; U. Kafkafi, eds. *Plant roots: the hidden half*. Marcel Dekker, Inc.; New York, NY, pp 717-729.
- KASKA, M. 1976. The toxicity of extracellular proteases of the bacterium *Serratia marcescens* for larvae of greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 27:271.
- KESSMANN, H.; STAUB, T.; HOFMANN, C.; MAETZKE, T.; HERZOG, J.; WARD, E.; UKNES, S.; RYALS, J. 1994. Induction of systemic acquired resistance in plants by chemicals. *Annual Review of Phytopathology* 32:439-459.
- KING, E.O.; WARD, M.K.; RANEY, D.E. 1954. Two simple media for demonstration of pyocyanin and fluorecin. *Journal of Laboratory and Clinical Med.* 44:301-307.

- KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. 1981. Development of a powder formulation of rhizobacteria for inoculation of potato seed pieces. *Phytopathology*. 71:590-592.
- KLOEPPER, J.W.; LEONG, J.; TEINTZE, M.; SCHROTH, M.N. 1980. Enhanced plant growth by siderophores produced by plant growth-promoting rhizobacteria. *Nature* 286:885-886.
- KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. 1981. Relationship of in vitro antibiosis of plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology* 70: 1078-1082.
- KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S.; LIU, L.; WEI, G. 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as inducers of systemic disease resistance. *in* R.D. Lumsden; J.L. Waughn, eds. *Pest management: biologically based technologies*. ACS Conference Proceedings Series. American Chemical Society Press. pp. 156-165.
- KLOEPPER, J.W. 1991. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents of soil-borne diseases. *in* J. Bay-Petersen, ed. *The biological control of plant diseases*. Food and Fertilizer Technology Center for the Asian and Pacific Region. book series no 42. Taipei, Taiwan. p 142-156.
- KNUDSEN, G.R.; SPURR, H.W. 1987. Field persistence and efficacy of five bacterial preparations for control of peanut leaf spot. *Plant Disease* 71(5) 442-445
- KOKALIS-BURELLE, N.; BACKMAN, P.A.; RODRIGUEZ-KABANA, R., PLOPER, L.D. 1992. Potential for biological control of early leafspot of peanut using *Bacillus cereus* and chitin as foliar amendments. *Biological Control* 2: 321-328
- KOMBRINK, E.; SOMSSICH, I.E. 1995. Defense responses of plants to pathogens. *Advances in botanical research incorporating advances in plant pathology*. Vol 21.
- KOMBRINK, E.; SOMSSICH, I.E. 1995. Pathogenesis-related proteins and plant defense. *in* G. Carroll y P. Tudzynski, eds. *Plant relationships*. The Mycota, Vol 6, Springer-Verlag, Berlin.
- KUC, J. 1982. Induced immunity to plant disease. *Bioscience* 32:854-860.

- KUC, J. 1987. Plant immunization and its applicability for disease control. *in* I. Chet, ed. Innovative Approaches to plant disease control. John Wiley, N.Y. pp 255-274.
- LEACH, R. 1964. A new form of banana leaf spot in fiji, black leaf streak. *World Crops* 16:60-64.
- LINTHORST, H.J.M.; BREDERODE, F.T.; VAN DER DOES, C.; BOL, J.F. 1993. Tobacco proteinase inhibitor I genes are locally, but not systemically induced by stress. *Plant molecular biology* 21:985-992.
- LIU, L.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. 1995a. Induction of systemic resistance in cucumber against *Fusarium* wilt by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 85: 695-698.
- LIU, L.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. 1995b. Induction of systemic resistance in cucumber against bacterial angular leaf spot by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 85: 843-847.
- LYSENKO, O. 1976. Chitinase of *Serratia marcescens* and its toxicity to insects. *Journal of Invertebrate Pathology*. 27:385-386.
- MADAMANCHI, N.R.; KUC, J. 1991. Induced systemic resistance in plants. *in* G.T. Cole y H.C. Hoch, eds. The fungal spore and disease initiation in plants and animals. pp. 347-362. Plenum, New York.
- MARIN, D. 1992. Conferencia pre-aviso biologico para el control de la sigatoka negra. *in* Memorias Segundo Congreso Bananero, UPEB, Costa Rica
- MARIN, D.; ROMERO, R. 1992. El combate de la Sigatoka negra. *Boletin no. 4 CORBANA*. 22 p.
- MEERA, M.S.; SHIVANNA, M.B.; KAGEYAMA, K.; HYAKUMACHI, M. 1993. Induction of systemic resistance in cucumber plants using turfgrass rhizosphere fungi. *Annals of the Phytopathological Society of Japan* 59:279.
- MEHDY, M.C. 1994. Active oxygen species in plant defense against pathogens. *Plant Physiology* 105:467-472.

- MEREDITH, D.S. 1970. Banana leaf spot disease (Sigatoka) caused by *Mycosphaerella musicola* Leach. Phytopathological papers no 11 Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. p. 165-198.
- MEREDITH, D.S.; LAWRENCE, J.S. 1969. Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): Symptoms of the disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the casual fungus. Transactions of the British Mycological Society. 52 (3):459-476.
- MEREDITH, D.S.; LAWRENCE, J.S. 1970. Morphology of the conidial state of *Mycosphaerella musicola* in the pacific region. Transactions of the British Mycological Society. 54(2)265-289.
- MEREDITH, D.S.; LAWRENCE, J.S.; FIRMAN, D. 1973. Ascospores release and dispersal in black leaf streak disease of banana (*Mycosphaerella musicola*). Transactions of the British Mycological Society. 60(3)547-554.
- MERRIMANN, P.R.; PRICE, R.D.; BAKER, K.F.; KOLLMORGEN, J.F.; PIGGOTT, T.; RIDGE, E.H. 1975. Effects of *Bacillus* and *Streptomyces* spp. applied to seed. pp 130-133 in G.W. Bruehl, ed. Biology and control of soil-borne plant pathogens. American Phytopathological Society, St Paul, Minnesota. 216 p.
- MIRANDA, J.E. 1996. Evaluación de microorganismos antagonistas al hongo *Mycosphaerella fijiensis* (Morelet), colocados en el interior y exterior de la planta de banano. Tesis M.Sc., CATIE, Turrialba, Costa Rica. 110 p.
- MUCHARROMAH, E; KUC, J. 1991. Oxalates and phosphates induce systemic protection against disease caused by fungi, bacteria and viruses in cucumber. Crop Protection 10:265-270.
- MULDER, E.G.; BROTONEGORO, S. 1974. Free-living heterotropic nitrogen-fixing bacteria. pp 37-85. in A. Quisquel, ed. The biology of nitrogen fixation. North Holland Publishing Company, Amsterdam. 769 p.
- NICHOLSON, R.L.; HAMMERSCHMIDT, R. 1992. Phenolic compounds and their role in disease resistance. Annual Review of Phytopathology. 30:369-389.

- NURNBERGER, T.; NENNSTIEL, D.; JABS, T.; SACKS, W.R., HAHLBROCK, K.; SCHEEL, D. 1994. High affinity binding of a fungal oligopeptide elicitor to parsley plasma membranes triggers multiple defense responses. *Cell* 78:449-460.
- OKUMOTO, S.; BUSTAMANTE, E. 1993a. Efecto de enmiendas foliares sobre el desarrollo del tizón temprano causado por *Alternaria solani* y sobre la población bacteriana en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Manejo Integrado de Plagas*. 28:1-6
- OKUMOTO, S.; BUSTAMANTE, E. 1993b. Selección in vitro de bacterias antagónicas a *Alternaria solani*. *Manejo Integrado de Plagas* 28:7-10.
- OKUNO, T.; NAKAYAMA, M.; OKAJIMA, N.; FARASAWA, I. 1991. Systemic resistance to downy mildew and appearance of acid soluble proteins in cucumber leaves treated with biotic and abiotic inducers. *Annals of the Phytopathological Society of Japan*. 57:203-211.
- ORDENTLICH, A.; ELAD, T.; CHET, Y. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfii*. *Phytopathology*. 78:84-88.
- PAPAVIZAS, G.C. ed. 1981. Biological control in crop production. Allanheld Osmun, London 461 pp.
- PAPAVIZAS, G.C.; DUNN, M.T.; LEWIS, J.A.; BEAGLE-RISTAINO, J. 1984. Liquid fermentation technology for experimental production of biocontrol fungi. *Phytopathology* 74:1171-1175.
- PAUTOT, V.; HOLZER, F.M.; WALLING, L.L. 1991. Differential expression of tomato proteinase inhibitor I y II genes during bacterial pathogen invasion and wounding. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4:284-292.
- PONS, N. 1989. Taxonomy of *Cercospora* and related genera. in R.A. Fullerton; R.H. Stover, eds. Sigatoka leaf spot diseases of bananas. Proceedings INIBAP, San Jose, Costa Rica.

- PONTIER, D.; GODIARD, L.; MARCO, I.; ROBY, D. 1994. *hsr203J*, a tobacco gene whose activation is rapid, highly localized and specific for incompatible plant/pathogen interactions. *Plant Journal* 5:507-521.
- QUIÑON, V.L. 1972. Epidemiology and control of black leaf streak disease of bananas caused by *Mycosphaerella fijiensis*. Ph.D. Thesis. University of Hawaii. 139 p.
- RAUPACH, G.S.; LIU, L.; MURPHY, J.F.; TUZUN, S.; KLOEPPER, J.W. 1996. Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Plant Disease* 80:891-894.
- REINECKE, P. 1974. Antagonism and biological control on aerial surfaces of the gramineae. *Annual Review of Phytopathology*. 20:383-390.
- REUVENI, M.; AGAPOV, V.; REUVENI, R. 1992. Local and systemic protection against powdery mildew and growth increase in cucumber plants induced by phosphate salts. (Abstract). *Phytopathology* 82:1179.
- REUVENI, R.; AGAPOV, V.; REUVENI, M. 1992. Systemic resistance against Northern leaf blight and common rust in maize induced by foliar spray of phosphates. (Abstract). *Phytopathology*, 82:1179.
- RICARD, J.L. 1981. Commercialization of a *Trichoderma* based mycofungicide: some problems and solutions. *Biocontrol News Information* 22: 95-98
- ROBY, D.; TOPPAN, A.; ESQUERRÉ-TUGAGAYÉ, M.T. 1987. Cell surfaces in plant microorganism interactions. VII. Increased proteinase inhibitor activity in melon plants in response to infection by *Colletotrichum lagenarium* or to treatment with an elicitor fraction from this fungus. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 30, 453-460.
- RODRIGUEZ, L. 1995. Antagonismo endofítico de microorganismos a *Mycosphaerella fijiensis* en plátano y *Alternaria solani* en tomate. Tesis M.Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica.

- ROSENDAHL, S. 1985. Interactions between vesicular-arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus fasciculatum* and *Aphanomyces euteiches* root rot of peas. *Phytopathologische Zeitschrift*. 114:31-40.
- ROVIRA, A.D. 1963. Microbial inoculation of plants.1. Establishment of free-living nitrogen fixing bacteria in the rhizosphere and their effects on maize, tomato, and wheat. *Plant soil* 19:304-314.
- ROVIRA, A.D. 1972. Studies on the interactions between plant roots and microorganisms. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Sciences* 38:91-94.
- RUIZ, C. 1995. Efecto de sustratos sobre bacterias antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis* en banano. Tesis, M.Sc., CATIE, Turrialba, Costa Rica. 123 p.
- SAUMA, J. 1995. CORBANA preocupada por baja productividad bananera del país. La Republica. San Jose, Costa Rica. 23 marzo. p 5C.
- SCHMELZER, E.; KRUGER-LEBUS, S.; HAHLBROCK, K. 1989. Temporal and spatial patterns of gene expression around sites of attempted fungal infection in parsley leaves. *The Plant Cell* 1:993-1001.
- SCHMIDT, D. 1988. Prevention of bacterial wilt of grasses by phylloplane bacteria. *Journal of Phytopathology*. 122:253-260.
- SCHÖNBECK, F.; DEHNE, H.W.; BEICHT, W. 1980. Activation of unspecific resistance mechanisms in plants. *Journal of plant diseases and Protection*. 87:654-666.
- SCHRODER, M.; HAHLBROCK, K.; KOMBRINK, E. 1992. Temporal and spatial patterns of 1,3-B-glucanase and chitinase induction in potato leaves infected by *Phytophthora infestans*. *Plant Journal* 2:161-172.
- SCHROTH, M.N., HANCOCK, J.G. 1982. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science* 216:1376-1381.

- SCHROTH, M.N.; BECKER, J.O. 1990. Concepts of ecological and physiological activities of rhizobacteria related to biological control and plant growth promotion. *in* D. Hornby, ed. Biological control of soil-borne plant pathogens. CAB International, Wallingford, Oxon, U.K. PP 389-414.
- SOMSSICH, I.E.; BOLLMANN, J.; HAHLBROCK, K.; KOMBRINK, E.; SCHULZ, W. 1989. Differential early activation of defense-related genes in elicitor-treated parsley cells. *Plant Molecular Biology* 12:227-234.
- SOTO, M. 1985. Bananos: cultivo y comercialización. San José, costa Rica, UCR. 648 p.
- STOVER, R.H. 1978. Distribution and probable origin of *Mycosphaerella fijiensis* in southeast Asia. *Tropical Agriculture*. 55(1)65-69.
- STOVER, R.H. 1980. Sigatoka leaf spots of bananas and plantains. *Plant Disease* 64:750-756.
- STOVER, R.H. 1989. Sigatoka leaf spot: thirty years of changing control strategies: 1959-1989. *in* R.A. Fullerton; R.H. Stover, eds. Sigatoka leaf spot diseases of bananas. Proceedings INIBAP, San Jose, Costa Rica.
- STOVER, R.H.; SIMMONDS, N.W. 1987. Bananas, 3rd ed. Longman, London 468 p.
- STOVER, R.H.; DICKSON, J.D. 1976. Banana leaf spot caused by *Mycosphaerella musicola* and *Mycosphaerella fijiensis* var. *difformis*: a comparison of the first Central American epidemics. *FAO Plant Prot. Bull.*, 24:36-42.
- STUTZ, E.W.; DÉFAGO, G.; KERN, H. 1986. Naturally occurring fluorescent pseudomonads involved in suppression of black root rot of tobacco. *Phytopathology* 76:181-185.
- SUTTON, J.C.; PENG, G. 1993. Manipulation and vectoring of biocontrol organisms to manage foliage and fruit diseases in crop systems. *Annual Review of Phytopathology*. 31:473-493.

- TAYLOR, J.L.; FRITZEMEIER, K.H.; HAUSER, I.; KOMBRINK, E.; ROHWER, F.; SCHRODER, M.; STRITTMATTER, G.; HAHLBROCK, K. 1990. Structural analysis and activation by fungal infection of a gene encoding a pathogenesis-related protein in potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 3:72-77.
- TELIZ-ORTIZ, M.; BURKHOLDER, W.H. 1960. A strain of *Pseudomonas fluorescens* antagonistic to *Pseudomonas phaseolicola* and other bacterial plant pathogens. *Phytopathology* 50:119-123.
- THOMPSON, J.A. 1980. Production and quality control of legume inoculants. *in* Methods of evaluating biological nitrogen fixation, pp. 489-533. F.J. Bergersen, ed.. John Wiley 702 pp.
- TRONSMO, A.; DENNIS, C. 1977. The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. *Netherlands Journal of Plant Pathology*. 83:suppl. 1, pp. 449-455.
- TUZUN, S.; KLOEPPER, J.W. 1994. Induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria . pp 104-109. *in* M.H. Ryder; P.M. Stephens; G.D. Bowen, eds. Improving plant productivity with rhizosphere bacteria, Proc. 3rd. international Workshop on plant growth- promoting rhizobacteria, CSIRO, Australia.
- TUZUN, S.; KLOEPPER, J.W. 1995. Practical application and implementation of induced resistance. *in* R. Hammerschmidt; J. Kuc, eds. Induced resistance to disease in plants. Kluwer Academic Publishers. The Netherlands.
- TUZUN, S.; KUC, J. 1985a. A modified technique for inducing systemic resistance to blue mold and increasing growth of tobacco. *Phytopathology* 75:1127-1129.
- TUZUN, S.; KUC, J. 1985b. Movement of a factor in tobacco infected with *Peronospora tabacina* Adam which systemically protects against blue mold. *Physiological Plant Pathology*. 26:321-330.
- VAN PEER, R.; NIEMANN, G.J.; SCHIPPERS, B. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp strain WCS417r. *Phytopathology*. 81:728-734.

- VARGAS, D.M.; CALDERÓN, R.R. 1991. El combate de la sigatoka negra. CORBANA, Boletín no.4.
- VOISARD, C.; KEEL, C.; HASS, D.; DÉFAGO, G. 1989. Cyanide production by *Pseudomonas fluorescens* helps suppress black root rot of tobacco under gnotobiotic conditions. The EMBO Journal. 8:351-358.
- WALTERS, D.R.; MURRAY, D.C. 1992. Induction of systemic resistance to rust in *Vicia faba* by phosphates and EDTA: effects of calcium. Plant Pathology, 41:444-448.
- WARD, E.R.; UKNES, S.J.; WILLIAMS, S.C.; DINCHER, S.S.; WIEDERHOLD, D.L.; ALEXANDER, D.C.; AHL-GOY, P.; MÉTRAUX, J.P.; RYALS, J.A. 1991. Coordinate gene activity in response to agents that induce systemic acquired resistance. The Plant Cell 3:1085-1094.
- WEI, G.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. Phytopathology 81:1508-1512.
- WELLER, D.M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. Annual Review of Phytopathology. 26:379-407.
- WELTZEL, H.C. 1989. Some effects of composed organic materials on plant health. Agriculture, Ecosystems and Environment 27:439-446.
- WHITTAKER, R.H. 1969. New concepts of kingdoms of organisms. Science, 103:150-160.
- ZAVALETA-MEJIA, E.; VAN GUNDY, S. 1989. Effect of the bacterium *Serratia marcescens* Bizio on *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood. Revista Mexicana de Fitopatología 7(2):178-187.
- ZIDACK, N.K.; QUIMBY JR, P.C.; CAESAR, A.J. 1996. An oil/starch/sugar encapsulation method suitable for gram-negative bacteria and other microbes. Phytopathology (Abstract).

10. ANEXOS

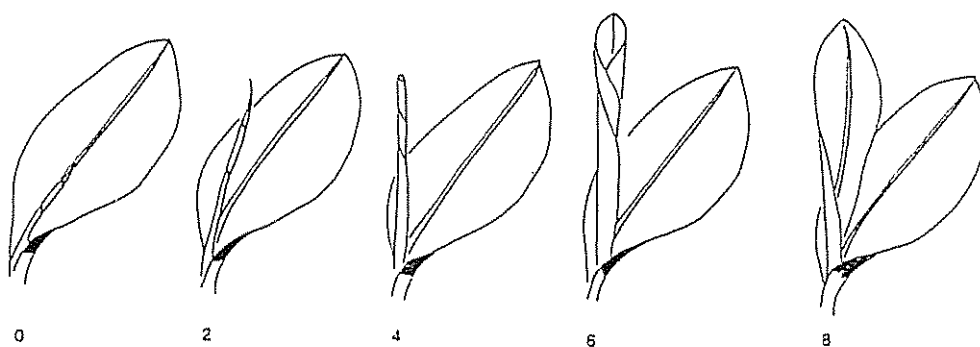
ANEXO 1 Características físicas y químicas del suelo utilizado para la siembra de plántulas de banano.

TEXTURA

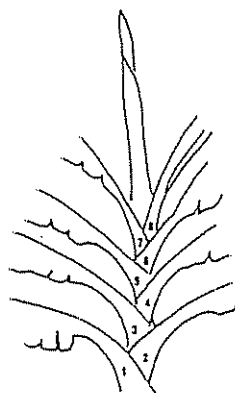
PROFUNDIDAD	ARENA	LIMO	ARCILLA	TEXTURA
0-10	30.4 %	30.4 %	39.2 %	FRANCO ARCILLOSO

CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS

M.O.	pH AGUA	cmol(+)/L				mg/L				%
		ACD. EXT.	Ca	Mg	K	P	Cu	Mn	Zn	
8.97	5.4	0.26	7.76	2.11	0.76	42.6	17.3	31.1	5.7	0.3

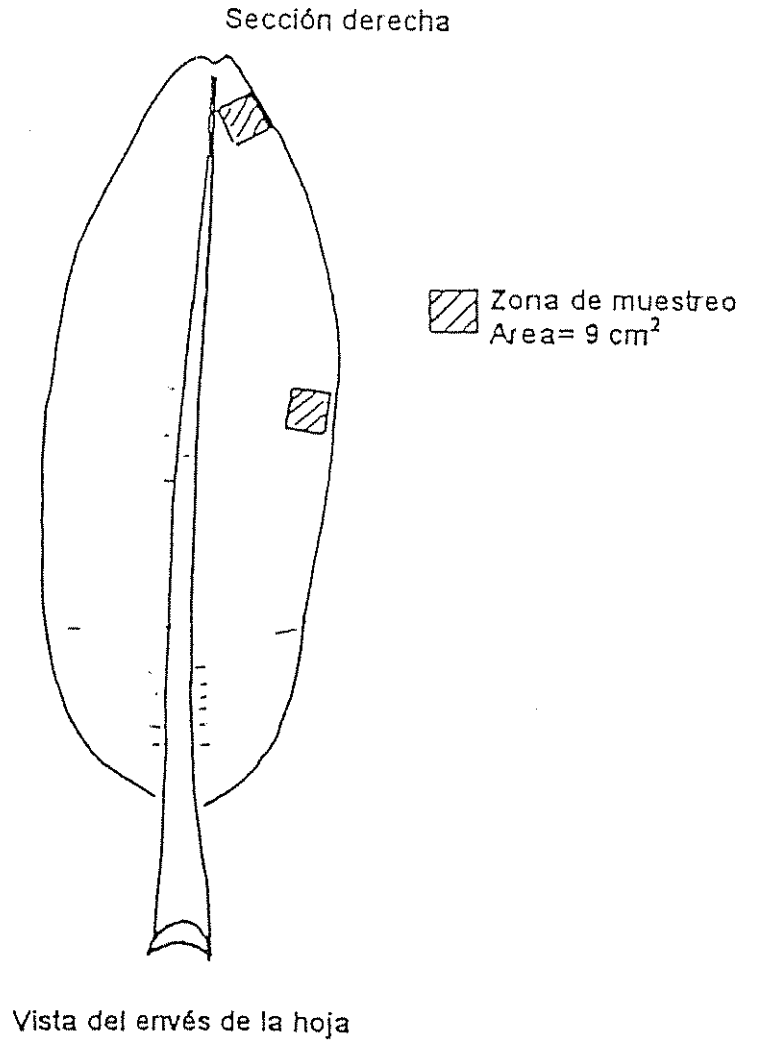
ANEXO 2 Diagrama de la escala de Brun para determinar la emisión foliar.

Estados de candela de acuerdo a la Escala de Brun (1963). Citado por Marín y Romero, 1992



Conteo de hojas para la obtención de la emisión foliar.

-ANEXO 3 Diagrama de muestreo de las hojas de banano para determinar el porcentaje de área infectada con sigatoka negra.



ANEXO 4 CARACTERÍSTICAS QUÍMICAS DE LOS SUSTRATOS UTILIZADOS EN EL ESTUDIO

SUSTRATO	%					mg/kg		
	Ca	Mg	K	P	N	Cu	Mn	Zn
BAGAZO	0.42	0.14	0.62	0.05	0.51	12.6	82.2	10.2
CACHAZA	3.31	0.73	0.18	1.04	1.10	113.6	1220	165.9
BROZA	1.40	0.42	0.10	0.12	2.98	67.3	450.9	48.9