

**CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA**  
**PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**

RECIBIDO  
10 JUN 1998

**LAS RIZOBACTERIAS Y ENMIENDAS ORGANICAS EN LA INDUCCION DE  
RESISTENCIA A GEMINIVIRUS EN EL CULTIVO DE TOMATE**

**POR**

**MIRZA OSIRIS CASTRO MARTIN**



Turrialba, Costa Rica  
1998

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

RECIBIDO

Turrialba, Costa Rica

**LAS RIZOBACTERIAS Y ENMIENDAS ORGANICAS EN LA INDUCCION DE  
RESISTENCIA A GEMINIVIRUS EN EL CULTIVO DE TOMATE**

**POR**

**MIRZA OSIRIS CASTRO MARTIN**

**Turrialba, Costa Rica**

**1998**

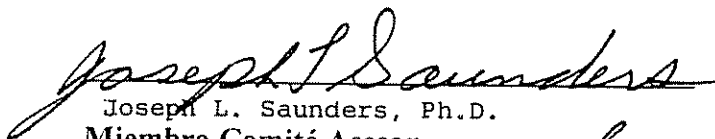
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Dirección de la Escuela de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

*MAGISTER SCIENTIAE*

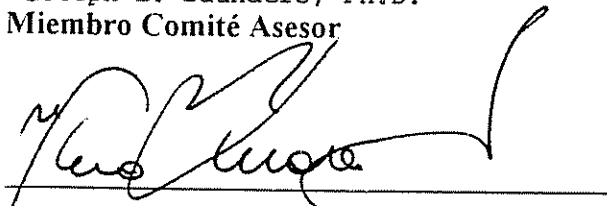
FIRMANTES:



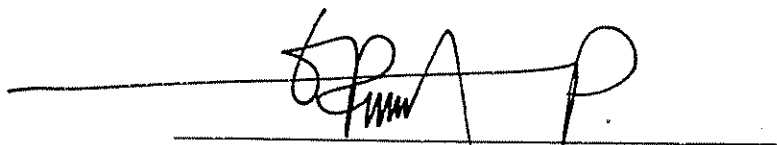
Elkin Bustamante, Ph.D.  
Profesor Consejero



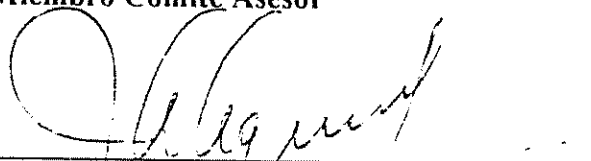
Joseph L. Saunders, Ph.D.  
Miembro Comité Asesor



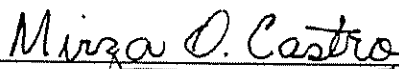
Vera Sánchez, Ph.D.  
Miembro Comité Asesor



Galileo Rivas, M.Sc.  
Miembro Comité Asesor



Juan A. Aguirre, Ph.D.  
Director y Decano de la Escuela de Postgrado



Mirza O. Castro  
Candidato

## DEDICATORIA

A mi Padres: Carlos Castro y Osiris Martín.

A mi Esposo: Manuel José Rey Figueroa.

A la razón de mi vida: Laura, Gabriela e Isabella Rey Castro.

A dos mujeres ejemplares: Luz y Mimi Figueroa.

A toda mi familia

## AGRADECIMIENTO

A Dios por hacerme saber que está conmigo en todo momento y permitirme realizar mis sueños

A todos mis compañeros de la promoción 97-98, a los de la maestría de Agricultura Ecológica; nunca les olvidaré y en especial a Frantz Smith por permitirme conocerlo.

Al Dr. Elkin Bustamante. Profesor consejero, por su asesoría y ser un verdadero maestro en sus enseñanzas.

Al M.Sc. Galileo Rivas, por su paciencia, adecuadas orientaciones y apoyo durante estos dos años de lucha.

A la Dra. Vera Sánchez, por sus recomendaciones y apoyo durante la realización del trabajo de investigación

Al Dr. Joseph Saunders por su valiosa revisión del documento y su participación dentro del comité asesor.

A la Dra. J. K. Brown de la Universidad de Arizona, por realizar la prueba de PCR para la detección de geminivirus.

A todo el personal del laboratorio de Fitopatología de MIP-CATIE por su colaboración, en especial a Arturo Gamboa y Cristian Zuñiga.

Al Señor Asdrual Chavarria, por su permanente disposición y actitud de colaboración.

Al Dr. Gilberto Paez y a Jhonny Pérez por sus orientaciones estadísticas

A mis amigas y compañeras de estudio: Liliana Rojas y Ana Mariscal

En especial a los donantes de mi beca (Holanda) por financiar mis estudios estos dos años.

CASTRO MARTIN, M.O. 1998. Las rizobacterias y enmiendas orgánicas en la inducción de resistencia a geminivirus en el cultivo del tomate.

Palabras Claves: rizobacterias, enmiendas orgánicas, Inducción, resistencia sistémica, geminivirus, *Bemisia tabaci*, tomate.

## RESUMEN

Se evaluó el efecto de cinco rizobacterias y dos enmiendas orgánicas en la promoción del crecimiento y en la inducción de resistencia sistémica contra geminivirus en plantas de tomate de dos variedades: Hayslip, susceptible al geminivirus y 8429 de resistencia intermedia.

Se estableció un diseño completamente al azar con 12 tratamientos y cinco repeticiones para cada una de las dos variedades de tomate.

Todos los tratamientos fueron inoculados con geminivirus a excepción del testigo absoluto (T12) el cual se mantuvo en invernadero; los demás tratamientos fueron evaluados en el campo semanalmente.

El geminivirus fue inoculado en las plantas por medio del vector: *Bemisia tabaci* (Gennadius) manteniendo las microjaulas con cuatro moscas blancas adultas virulíferas en cada planta por cuatro días. La detección del geminivirus en las plantas se realizó por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Las rizobacterias evaluadas en el experimento fueron dos de la colección MIP-CATIE: *Bacillus cereus* (Frankland y Frankland), *Pseudomonas cepacia* (Palleroni y Holmes) y tres aisladas de raíces de plantas de tomate colectadas en las comunidades de Guayabo (Cartago) y Grecia (Alajuela): *Bacillus sp.*, *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas sp.* Las enmiendas orgánicas utilizadas fueron: Compost y bocashi. La inoculación de las rizobacterias se hizo por medio de bacterización a la semilla.

Las variables evaluadas fueron: altura, severidad de la enfermedad y producción de biomasa. Los tratamientos con compost y bocashi más las rizobacterias resultaron ser los mayores promotores de crecimiento (altura y biomasa) en las dos variedades de tomate evaluadas.

La inducción de resistencia sistémica en las plantas de la variedad Hayslip se dio con las enmiendas orgánicas y con el tratamiento que tenía compost más la mezcla de rizobacterias. Para la variedad de resistencia intermedia 8429 se dio con los tratamientos que tenían la enmienda orgánica más la mezcla de rizobacterias, además con los tratamientos: *Bacillus cereus*, *Pseudomonas cepacia* y la mezcla de las cinco rizobacterias.

CASTRO MARTÍN, M.O. 1998 The rhizobacterias and organic amendments in the induction of resistance a geminivirus in tomato plants

Keywords: rhizobacterias, organic amendment, induction, systemic resistance, geminivirus, *Bemisia tabaci*, tomato

## SUMMARY

Five rhizobacterias and two organic amendments were evaluated for growth promotion and induced resistance against geminivirus with two cultivars of tomato.

The tomato cultivars were Hayslip, geminivirus susceptible and 8429, of moderate resistance.

It was established with twelve treatments and five repetitions in a completely random design. All treatments were inoculated with geminivirus, except for the absolute control (T12); these last grown under greenhouse conditions. All other treatments were field evaluated weekly.

Four adult virulent whiteflies were maintained in microcages on the plants for four days, used for the geminivirus transmission. Polymerase Chain Reaction (PCR) was used to detect the presence of geminivirus on inoculated tomato plants.

The treatments consisted of the application of two different rhizobacteria strains from the MIP-CATIE collection: *Bacillus cereus* (Frankland and Frankland) and *Pseudomonas cepacia* (Palleroni and Holmes) and three other rhizobacteria isolated from the roots of tomato plants collected from the field: *Bacillus* sp., *Pseudomonas fluorescens* y *Pseudomonas* sp. Two organic amendments were used: **Compost** and **Bocashi**, and the rhizobacterias were seed inoculated.

Plant height, biomass production and the disease severity of plants were evaluated. These treatments, with organic amendments and/or the application of the organic amendment plus the five rhizobacterias, promoted growth in both cultivates of tomatoes.

The systemic resistance induction of Hayslip cultivars was achieved with the organic amendments and with the treatment that the compost had plus the five rhizobacterias. For the 8429 cultivars of moderate resistance the systemic induction was achieved through the treatments that the organic amendment had plus the five rhizobacterias, in addition to the treatments: *Bacillus cereus*, *Pseudomonas cepacia* and the mixture of the five rhizobacterias

## Indice

No.	Pag.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
RESUMEN	v
SUMMARY	vi
Indice	vii
Lista de cuadros	x
Lista de figuras	xi
Lista de anexos	xii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo general	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. HIPOTESIS	3
4. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1. Descripción botánica del cultivo	4
4.2. Fenología del cultivo	4
4.3. El vector: Taxonomía, biología y ecología	5
4.4. Los geminivirus	6
4.5. Relación vector:virus:planta	8
4.6. Control biológico	9
4.6.1. Inducción de resistencia	10
4.6.2. Inducción de resistencia en <i>Lycopersicon</i>	12
4.7. Rizobacterias	13
4.8. Enmiendas orgánicas	15
5. MATERIALES Y MÉTODOS	16
5.1. Localización del experimento	16
5.2. Recolección de muestras y aislamiento de rizobacterias	16
5.3. Pruebas bioquímicas para identificar bacterias	18
5.3.1. Pruebas de KOH	18
5.3.2. Pruebas de catalasa	18



5.3.3. Prueba de oxidasa	19
5.3.4. Prueba de crecimiento anaeróbico	19
5.3.5. Prueba de fluorescencia	20
5.3.6. Prueba de Bacillus	20
5.3.7. Caracterización morfológica	20
5.4. Activación de bacterias	21
5.5. Prueba de inducción de resistencia	21
5.6. Manejo del vector	22
5.7. Inoculación de las rizobacterias	22
5.7.1. Bacterización a la semilla	23
5.8. Uso de enmiendas orgánicas	24
5.9. Transmisión del virus	25
5.10. Medidas de control durante el experimento	27
5.11. Detección del geminivirus por PCR	28
5.12. Variables de respuesta y análisis estadístico	29
5.12.1. Altura	29
5.12.2. Severidad	29
5.12.3. Producción de biomasa	30
5.12.4. Diseño experimental	30
5.12.5. Tratamientos	30
5.12.6. Modelo estadístico	31
5.12.7. Análisis estadístico	31
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>32</b>
6.1. Recolección de muestras y aislamiento de rizobacterias	32
6.2. Pruebas bioquímicas y térmicas para la identificación	32
6.3. Uso de enmiendas orgánicas	34
6.4. Promoción del crecimiento de las plantas	37
6.4.1. Altura	37
6.4.2. Producción de biomasa	40
6.5. Severidad	43
6.6. Análisis de regresión peso seco y severidad	46
6.7. Detección del geminivirus	51

7 CONCLUSIONES	52
8. RECOMENDACIONES	53
9. BIBLIOGRAFIA	54
10. ANEXOS	62

## Lista de cuadros

No.	Pag.
1. Características bioquímicas y morfológicas de las tres rizobacterias aisladas y utilizadas en el experimento. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.	34
2. Análisis de suelo y sustratos utilizados en el experimento, determinado mediante Olsen modificado. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1998.	36
3. Valores promedio de altura en plantas de tomate variedad Hayslip y 8429 según tratamientos. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.	38
4. Valores promedios de peso fresco y peso seco (g) según tratamientos en plantas de tomate variedad Hayslip y 8429. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.	41
5. Valores del área bajo la curva del progreso de la enfermedad en plantas inoculadas con geminivirus en respuesta al uso de rizobacterias y enmiendas orgánicas para dos variedades de tomate: Hayslip y 8429. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.	44

## Lista de figuras

No.		Pag.
1	Proceso de aislamiento, siembra y preservado de rizobacterias. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.	18
2	Etapas involucradas en la bacterización de la semilla (Kloepper 1993).	24
3	Proceso de transmisión del geminivirus en plantas sanas. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.	26
4	Etapas ocurridas en la prueba de PCR usada para identificar geminivirus.	29
5	Altura promedio según tratamientos en plantas de tomate de la variedad Hayslip CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.	39
6	Altura promedio según tratamientos en plantas de tomate de la variedad 8429. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.	39
7	Promedios de peso fresco y peso seco (g) según tratamientos en plantas de tomate variedad Hayslip. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.	42
8	Promedios de peso fresco y peso seco (g) según tratamientos en plantas de tomate variedad 8429. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.	42
9	Índice de severidad promedio según tratamientos en plantas de tomate variedad Hayslip. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.	45
10	Índice de severidad promedio según tratamientos en plantas de tomate variedad 8429. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.	45
11	Gráficas de regresión entre peso seco (Y) y severidad (X) en plantas de tomate variedad Hayslip y 8429 respectivamente: A, B, C y D	47-50

## Lista de anexos

No.	Pag.
1. Estructura taxonómica para la familia Geminiviridae, propuesta por Padidam <i>et al.</i> (1995).	63
2. Condiciones ambientales durante el experimento. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1998.	64
3. Preparación del Medio: Agar nutriente.	65
4. Características bioquímicas y morfológicas de rizobacterias recolectadas y aisladas de plantas de tomate. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.	66
5. Medios I y II utilizados en la prueba de crecimiento anaeróbico	67
6. Reactivos utilizados para preparar el medio B-de King.	67
7. Análisis químico del suelo y de los sustratos utilizados, previo a la siembra del experimento. CATIE, Turrialba. 1998.	68
8. Análisis químico del Compost y Bocashi previo a la mezcla con suelo.	68
9. Altura promedio en centímetros según tratamientos para las diferentes evaluaciones en plantas de tomate variedad Hayslip y 8429. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998. (a) y (b)	69
10. Valores de radiación fotosintética activa (RAFA) medida en un día soleado y nublado bajo condiciones de invernadero y campo durante el experimento. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.	70
11. Ecuaciones de regresión entre las variables peso seco (Y) y severidad (X) según tratamientos en plantas de tomate variedad Hayslip. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.	71
12. Ecuaciones de regresión entre las variables peso seco (Y) y severidad (X) según tratamientos en plantas de tomate variedad 8429. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.	71
13. Distancia genética de los geminivirus encontrados en las muestras de tomate para la variedad Hayslip y 8429 (Brown 1998).	72

# Las rizobacterias y enmiendas orgánicas en la inducción de resistencia a geminivirus en el cultivo de tomate

## 1. INTRODUCCIÓN

De la gran diversidad de hortalizas de follaje y fruto que se producen a nivel centroamericano, el tomate es el más importante, tanto por la superficie dedicada a la siembra, como por el valor de producción que puede alcanzar más de US\$ 50 millones por año; además por su alto valor nutricional, siendo una fuente importante de vitaminas y minerales. El tomate es producido en Centro América principalmente para consumo en fresco; sin embargo, en los últimos años, el uso del tomate en la industria ha aumentado, lo que ha producido un incremento en el área de siembra. La mayor parte de las 21.000 ha. cultivadas se siembran en Guatemala (9.600 ha.) y Honduras (3.500 ha.), lo que representa el 62 % del total del área sembrada en Centro América. Los principales problemas reportados en el cultivo son los insectos y las enfermedades plaga debido a ellas se registran altas pérdidas en el rendimiento. Los productores han respondido a las pérdidas en la producción debidas a las plagas con una alta inversión de recursos en su combate. En la región Centro Americana el gasto de plaguicidas para el control de insectos y enfermedades representa entre el 12% y 22% de los costos directos de producción (CATIE/MIP 1990).

Las plantaciones en América Central se establecen por dos sistemas de siembra: directa y trasplante; Costa Rica es el único país en donde está generalizada la siembra directa, en los otros países de América Central el trasplante es comúnmente utilizado. La siembra directa reduce el ciclo del cultivo en 22-30 días y disminuye las enfermedades puesto que la planta no sufre los traumatismos que provoca el trasplante, sin embargo hay que luchar con las malezas en las primeras semanas del cultivo (CATIE/MIP 1990).

En esta región la producción de tomate es perjudicada por los geminivirus transmitidos por la mosca blanca, *Bemisia tabaci* Gennadius (Homoptera: Aleyrodidae), disminuyendo los niveles de productividad y calidad del tomate, así como de otros cultivos de gran importancia económica (algodón, tabaco, frijol, chile y melón). Algunos de estos cultivos se comercializan en el ámbito local y otros son productos de exportación, por lo que las consecuencias negativas de la plaga inciden en las economías domésticas y en los ingresos de divisas (Saborío 1994).

El combate con insecticidas de *B. tabaci* como vector, no es una solución viable al problema, debido a la capacidad destructiva de dichos virus y a la gran eficiencia de ésta como vector, densidades bajas (menos de dos adultos/planta) pueden infectar todas las plantas de una parcela y a veces las pérdidas son totales. Un esquema propuesto para su control consiste en retardar la infección de las plantas, al evitar contacto entre el vector y la planta durante el periodo crítico del tomate a los geminivirus. Dado que el cultivo es más sensible durante los primeros 60 días desde la siembra, esto podría lograrse mediante prácticas agrícolas (Hilje y Cubillo 1995). Para los primeros 30 días se ha tenido éxito al establecer almácigos cubiertos con mallas finas, en recipientes que eviten el estrés del transplante (Rivas Platero *et al.* 1993, Cubillo *et al.* 1994).

Las plantas susceptibles a enfermedades pueden, (hasta cierto grado) incrementar su resistencia a patógenos sin alterar su constitución genética, como consecuencia de un estímulo externo; conocido como **resistencia inducida**. El mecanismo de defensa se desata por los cambios metabólicos que le permiten a la planta defenderse contra los patógenos de manera más eficiente y en menor tiempo (Steiner y Schonbeck 1995).

Algunos de los microorganismos epifíticos y endofíticos presentes en las plantas pueden inducir resistencia a patógenos, entre estos las bacterias que tienen la capacidad de colonizar las raíces (rizobacterias) ejercen efectos benéficos, tales como promover el crecimiento de las plantas y actuar como agentes de control biológico (Schroth y Hancock 1982). La promoción del crecimiento es un fenómeno relacionado a la inducción de resistencia; la cual tiene la ventaja de estimular mecanismos de defensa en plantas totalmente susceptibles a una enfermedad. En ciertos casos, la inducción de resistencia puede ser permanente, protegiendo así la planta durante todo su ciclo de vida. Otra ventaja es que puede ser sistémica, cuando la inducción en un sitio puede servir para otras partes de la planta (Gutiérrez 1996).

Según (Higa y Parr 1994) las enmiendas orgánicas poseen cualidades para suprimir enfermedades e inducir el crecimiento en las plantas. Su utilización, tanto como la de las rizobacterias para promover el crecimiento e inducir resistencia, podrían ofrecer una alternativa para disminuir la intensidad de aplicaciones de plaguicidas, lo que los convertiría en un componente importante en un programa de manejo integrado de plagas. Este efecto contribuiría a aliviar los efectos adversos sobre los ecosistemas, de modo que sea posible producir eficientemente, al tiempo que se conserven los recursos disponibles en el medio.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Inducir resistencia sistémica a geminivirus en dos variedades de tomate, mediante el uso de rizobacterias y enmiendas orgánicas como promotores del crecimiento y activadores de los mecanismos de defensa en las plantas.

### 2.2 Objetivos específicos

Evaluar la eficiencia de las rizobacterias y enmiendas orgánicas (Compost y Bocashi) en la inducción de resistencia en plantas de tomate

Determinar si las rizobacterias y enmiendas orgánicas influyen en ciertas variables de crecimiento como: altura de la planta, biomasa y fructificación.

## 3. HIPÓTESIS

Las rizobacterias y las enmiendas orgánicas no activan los mecanismos de defensa natural de las plantas de tomate, por lo que no le confieren resistencia contra el geminivirus, ni promueven su crecimiento.

La relación rizobacteria-enmienda orgánica no tiene ningún efecto en la inducción de resistencia en plantas de tomate



## 4. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1. Descripción botánica del cultivo

El tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) pertenece a la familia de las solanáceas y es originario de América. Posee tallos herbáceos y ramificados sus hojas son alternas, con bordes dentados y cubiertas por tricomas o pelos. La inflorescencia está compuesta por un racimo de cuatro a cinco flores amarillas, con cinco o más lóculos. El fruto es una baya dividida en dos ó más secciones conteniendo las semillas, maduro es rojo o amarillo, los hay de diferentes formas (Chamarro Lapuerta 1995).

Por su hábito de crecimiento, los cultivares de tomate se clasifican en determinados o indeterminados. Los determinados son de tipo arbustivo, de porte bajo y compacto, con inflorescencias apicales. Las etapas fenológicas del cultivo están bien definidas, y la producción del fruto se concentra en periodos relativamente cortos. Los indeterminados poseen inflorescencias laterales y su crecimiento vegetativo es constante; la floración, fructificación y cosecha se prolongan por periodos extensos (CATIE 1990).

### 4.2. Fenología del cultivo

La diversidad de microclimas en los que se cultiva el tomate hace difícil una generalización de la fenología del cultivo. Sin embargo, se pueden establecer los estadios de desarrollo y su duración para una de las condiciones comunes de las áreas tomateras de la región. La plántula de tomate se mantiene en el semillero por 20-25 días, luego del trasplante el tomate continúa en su etapa vegetativa por unos 30-35 días más y a los 50-60 días inicia la floración. La etapa reproductiva, floración y fructificación, se extiende por unos 32-40 días antes de la cosecha, la cual se inicia a los 62-75 días después de la siembra. Bajo condiciones de buena nutrición y buena sanidad del cultivo, se realizan hasta 6 o 7 cortes, según la variedad, durante un periodo de 20 -25 días. El ciclo total del cultivo desde la siembra hasta el último periodo de corte oscila entre los 82 y los 100 días (CATIE 1990).

### 4.3. El vector: Taxonomía, biología y ecología

En las regiones subtropicales, tropicales y templadas del mundo se ha incrementado la presencia y distribución de geminivirus transmitidos por la mosca blanca, (*Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) (Brown 1994).

El problema fitosanitario creado por esta especie de mosca blanca asociado con la presencia del geminivirus es muy complejo, debido a los siguientes factores: la especie tiene gran plasticidad genética; gran variación morfológica de las ninfas, la capacidad para desarrollar rápidamente resistencia a los insecticidas y existencia de varias razas o biotipos (Brown 1990). Antes de 1961 la *B. tabaci* no se conocía como una plaga en Centro América; su primera aparición como tal se registró durante el ciclo algodonero de 1961-1962 en El Salvador. En 1964 apareció en Honduras y en 1965 en Guatemala y Nicaragua (CATIE/MIP 1990).

Según Greathead (1986) *B. tabaci* tiene un amplio ámbito de hospederos, es un insecto polífago; en el plano mundial se le ha asociado con al menos 500 plantas hospedantes. Según Bonilla (1993) la relación virus-vector es del tipo persistente-circulativa; las partículas vírales pueden ser adquiridas por el insecto al alimentarse de una planta enferma, las cuales circulan en su cuerpo. Dependiendo del tipo de geminivirus y la temperatura ambiental, la mosca estará lista para transmitir el virus durante los próximos 10 días, intermitentemente. La especie alcanza poblaciones desmesuradas; en especial durante la estación seca (Hilje 1995). Al aumentar la temperatura y bajo condiciones de alta humedad relativa (provocada artificialmente por la irrigación del tomate), se presentan condiciones ideales para el crecimiento poblacional de esta plaga del tomate (Hilje *et al.* 1993).

Según Gill (1990), la mosca blanca presenta seis estados de vida: el huevo, primer estadio ninfal, dos estadios ninfales sésiles, pupa y adulto. El término ninfa puede ser usado para denotar los primeros tres estadios inmaduros y el término pupa denota el último estadio inmaduro.

Según Sánchez Pulido *et al.* (1991) los huevos son insertados por la hembra mediante un corto pedicelo, en el envés de las hojas jóvenes de la planta; de forma indiscriminada, dependiendo de la presencia o no de pelos en esas hojas. La estructura de la pupa no es constante y depende de factores extrínsecos como ser el tipo de hospedante y la época del año; en plantas como el tomate, donde sus hojas presentan pelos, pueden aparecer cerdas dorsales. Los adultos son deficientes voladores, pero pueden ser desplazados a grandes distancias por el viento, lo que puede aumentar el riesgo de dispersión de la especie.

Según Serra (1996) los criterios para reconocer los cuatro estadios ninfales son: el tamaño, la excreta de cera en el segundo y tercer estadio, y la ausencia de cera en el cuarto. Durante el cuarto estadio, la ninfa suspende su alimentación y forma una especie de cápsula (denominada pupario) donde se transformará en adulto y del cual emergerá a través de una fisura en forma de "T" invertida (Serra 1996). La hembra es más grande que el macho y tiene el abdomen abultado. Bajo ciertas condiciones, las hembras tienen la capacidad de reproducirse sin haber copulado, originando una descendencia totalmente masculina (partenogénesis arrenotóquica) (Serra 1996)

#### 4.4. Los geminivirus

Los geminivirus transmitidos por moscas blancas infectan varios cultivos agrícolas en las zonas tropicales y subtropicales, causando enfermedades vírales con consecuencias nefastas para la economía y su manejo provoca problemas al ambiente (Ramírez y Rivera-Bustamante 1996).

Entre los cultivos más afectados por infección con geminivirus están: algodón, tomate y frijol. Aunque se ha detectado en chile dulce, papaya, melón; además de una gran variedad de malezas e incluso árboles, como reservorios silvestres y probable fuente de inóculo (Ramírez 1997). Los geminivirus derivan su nombre de la partícula doble que les caracteriza (geminí = gemelos), las cuales son isométricas y aparecen en pares que miden de 20 x 30 nm y poseen una molécula doble de ADN con un peso molecular de  $0.7-0.9 \times 10^6$  (Bock 1982).

Algunas plantas silvestres pueden ser reservorios de vectores y virus de importancia agrícola. La mosca blanca *B. tabaci* se alimenta al menos de 36 especies silvestres, pertenecientes a 12 familias en Costa Rica en donde *B. tabaci* casi no se reproduce en el tomate, pero los geminivirus dañan el cultivo severamente; en cambio lo hace masivamente en el chile dulce, sin que se observen síntomas de virosis, ambos cultivos comparten el hábitat con muchas plantas silvestres que podrían actuar como reservorios de virus, incluyendo geminivirus (Arias e Hilje 1993).

Según Ramírez (1997), los geminivirus están compuestos por ácido desoxirribonucleico (ADN) y una proteína que forma la cubierta; el nombre geminí se debe a la estructura de su partícula, compuesta por dos cubiertas icosaédricas unidas por una de las caras. El genoma está constituido por una (virus monopartitos) o dos (virus bipartitos) moléculas de ADN.

Estas moléculas son circulares y tienen una sola banda o cadena; solo durante la replicación se convierten en moléculas de doble cadena. Las moléculas de los virus bipartitos, denominadas A y B tienen una constitución diferente, excepto en un fragmento de unas 200 bases nitrogenadas, llamado región común, la cual difiere entre virus. En la mayoría de los geminivirus bipartitos se requieren ambas moléculas (ADN A y B) para inducir la infección (Gilbertson *et al.* 1991).

Hasta ahora no se ha logrado transmitir ningún geminivirus a través de la semilla ni por el roce de plantas enfermas con plantas sanas en el campo. La diseminación de estos virus sucede a través de insectos. Los más importantes son los homópteros, entre los que sobresalen las moscas blancas (Aleyrodidae), saltahojas (Cicadellidae) y algunos Membracidae; en la mayoría de casos conocidos, las moscas blancas *Bemisia* y sus especies destacan como los principales vectores (Harrison 1985)

Los geminivirus característicamente tienen una gran diversidad molecular, tanto es así que diferentes geminivirus son capaces de infectar un mismo cultivo en diferentes partes del mundo. Existen por lo menos dos geminivirus diferentes que causan el mosaico dorado del frijol (BGMV); uno es el que se encuentra en Brasil (tipo I) y el otro se encuentra en América Central y el Caribe (tipo II) (Gilbertson *et al.* 1993). También en el tomate hay por lo menos dos geminivirus afectándolo: el "tomato yellow leaf curl virus" (TYLCV) y el "tomato leaf curl virus" (TLCV) (Dry *et al.* 1993).

Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), los geminivirus se dividen en tres grupos de acuerdo a su insecto vector, ámbito de hospedantes, y estructura del genoma. El subgrupo I incluye virus con genoma monopartita que son transmitidos por insectos saltahojas a plantas monocotiledóneas; el virus representante es el del Rayado del maíz (MSV). Los virus transmitidos por saltahojas a dicotiledóneas, son los del subgrupo II y el virus del Enanismo Rizado de la Remolacha (BCTV) es el representante de este subgrupo. Los virus que pertenecen al subgrupo III, tienen genomas bipartitos (ADN A y B) excepto algunos aislamientos del TYLCV y son transmitidos por moscas blancas a plantas dicotiledóneas; el virus del Mosaico Dorado del Frijol (BGMV) es el representante. El ADN-A de un geminivirus de este subgrupo, puede usarse como sonda universal en condiciones de baja astringencia para la detección de otros geminivirus del subgrupo, y el ADN-B en condiciones de alta astringencia, como sonda específica para la identificación de un geminivirus específico. El ICTV aceptó que el grupo de los geminivirus se transformara en la familia Geminiviridae que comprende los tres géneros llamados subgrupo I, II y III (Anexo 1.) (Mayo y Martelli 1993).

#### 4.5. Relación vector virus planta

La mosca blanca (*Bemisia tabaci*) transmite geminivirus en forma persistente circulativa, por lo que es extraído de una planta enferma y circula dentro del vector hasta llegar a las glándulas salivales, para poder ser transmitido (Lastra 1993). El insecto posee aparato bucal perforador-chupador y presenta metamorfosis incompleta. Todos los estadios se alimentan de la savia del hospedante, con excepción de la pupa ya que está en etapa de reposo, durante la cual no se alimenta (Byrne y Bellows 1991).

Las ninfas y adultos de *B. tabaci* producen daños directos o indirectos; los directos se presentan al extraer los nutrientes de la savia, introduciendo su estilete en la hoja y causando alteraciones en el desarrollo de la planta, lo cual disminuye los rendimientos y la calidad de los frutos (Byrne y Bellows 1991).

Al alimentarse también causan daños al reducir la tasa neta de fotosíntesis y la transpiración, lo cual produce un incremento del cierre estomático, además se reduce el contenido de clorofila y el peso de la hoja (Buntin *et al* 1993). El daño de las ninfas es mayor que el de los adultos, ya que reduce el intercambio de gases de las hojas. Además, ambos estados producen excreciones azucaradas (mielecilla) que al caer sobre las hojas sirve de sustrato para el crecimiento del hongo llamado fumagina (*Capnodium* spp), lo cual interfiere con la fotosíntesis y respiración, reduciendo los rendimientos (Byrne y Bellows 1991). Sin embargo el daño más importante es el indirecto, por medio de la transmisión de enfermedades virales, provocadas principalmente por geminivirus; dichas enfermedades pueden reducir hasta en 100% los rendimientos, si la infección se produce en los primeros 40-50 días del crecimiento de la planta (Lastra 1993).

De acuerdo a la persistencia del virus en el vector y en la habilidad de este de transmitir la enfermedad, se han caracterizado los siguientes tipos de transmisión viral: no persistente, semipersistente y persistente; esta última puede ser circulativa o propagativa (Lastra 1993). Cuando el vector mantiene su capacidad infectiva a lo largo de su vida o por un tiempo relativamente largo es del tipo persistente y cuando las partículas virales solamente circulan en el cuerpo del insecto, la transmisión se conoce como persistente circulativa. En cambio, en la transmisión persistente propagativa, las partículas virales tienen la habilidad de infectar y multiplicarse en las células del insecto vector (Uzcátegui y Lastra 1978).

La transmisión del virus por *B. tabaci* se considera como persistente circulativa (Duffus 1987). Para una transmisión eficiente de la mayoría de geminivirus lo óptimo es un periodo de alimentación-adquisición de 2-24 horas, seguido por un periodo de alimentación -inoculación de 2-3 días (Lastra 1993).

La translocación de los virus en la planta se relacionan con el tipo de tejido donde se localizan; algunos están en el floema (la mayoría de geminivirus), el parénquima o xilema. (Zaitlin y Hull 1987). Inicialmente el desplazamiento es lento, debido que se realiza de célula a célula, pero una vez ubicados en los tejidos conductores, el movimiento es más rápido, ya que viajan hacia la raíz por el xilema y ascienden a la parte aérea a través del floema (Agrios 1988). Después de ser el geminivirus inoculado en plantas sanas, se desencadena una serie de eventos que causan el síndrome o la enfermedad; en primer término, el virus pierde su cubierta proteica, luego induce a la célula a la síntesis de enzimas denominadas ADN polimerasas, que sirven para la multiplicación del virus. Una vez que el virus ha expresado su potencial genético se inicia la dispersión de célula a célula y a través de toda la planta (Agrios 1988).

#### 4.6. Control biológico

Según Cook y Baker (1983) el control biológico se define como “Reducción del inóculo de un patógeno o de su capacidad de producir enfermedad a través de la acción de uno o más organismos diferentes al ser humano”.

Los mecanismos por los cuales se da el control biológico contra las enfermedades de las plantas se encuentran dentro de cinco categorías generales: parasitismo, antibiosis, competencia, inducción de resistencia y lisis (Howell *et al.* 1995).

La inducción de resistencia se expresa cuando un organismo es capaz de activar los mecanismos de defensa de las plantas, lo que conduce a una resistencia sistémica. La respuesta se inicia por el estímulo local en el sitio de ataque, luego por transducción se extiende al resto de la planta (Leeman *et al.* 1996).

Los microorganismos “invasores primarios” son importantes en la activación de los mecanismos de defensa de las plantas, específicamente los virus. Una infección previa con virus tiene efectos sobre las infecciones subsecuentes. El uso práctico de este sistema de protección cruzada inducido por virus puede ser un medio para reducir el efecto de la infección debido a razas virulentas (Hamilton 1980).

#### 4.6.1. Inducción de resistencia

Una de las alternativas utilizadas en la protección de las plantas es el método de la inducción de resistencia. Este método está basado no en la supresión directa del patógeno como ocurre con la aplicación de plaguicidas, si no, que se basa en la estimulación de los mecanismos naturales de defensa en los tejidos de las plantas. La inducción de resistencia es frecuentemente referida como: inmunización, sensibilización, vacunación, inmunidad adquirida y algunas veces como protección cruzada. En principio todos estos términos denotan algún fenómeno que es una activación artificial de los mecanismos de defensa de las plantas en el curso de su ontogénesis. Se conocen dos tipos de inducción de resistencia: local y sistémica; la resistencia inducida local se desarrolla dentro de un área limitada de tejidos de la planta, por ejemplo en el sitio de inducción. La inducción de resistencia sistémica se desarrolla en los tejidos de la planta más allá del sitio de inducción (Ozeretskoykaya 1995).

Algunos supuestos de la inducción de resistencia discutidos por Sequeira citado por Misaghi (1982), son los siguientes:

1. - La inducción de resistencia depende de factores ambientales como luz y temperatura.
2. - La inducción de resistencia no es inmediata y requiere de un intervalo de tiempo entre la inoculación inicial y el cambio.
3. - En algunos sistemas planta-patógeno la inducción de resistencia es sistémica, esto es que se disemina a toda la planta desde el sitio de inoculación inicial.
4. - A la resistencia inducida le falta especificidad con respecto a lo que induce y al cambio.
5. - En algunos casos la protección adquirida (resistencia) no ha sido duradera, por ejemplo, la resistencia sistémica inducida por inoculaciones de TMV en variedades de tabaco que son hipersensibles al virus, dura cerca de 20 días.
6. - La persistencia de la protección sistémica inducida por hongos depende de la sobrevivencia del inóculo inicial.

Los mecanismos de la inducción de resistencia sistémica no son claros todavía, sin embargo hay reportes de experimentos que explican algunos. Los mecanismos para la inducción de resistencia sistémica (IRS) son diferentes que los de la inducción de resistencia local. La IRS al parecer está basada en una rápida e intensa respuesta de la planta a una subsecuente infección, que resulta de una rápida expresión de genes de defensa. Específicamente, el promedio e intensidad de necrosis de células de papa y la producción de fitoalexinas en respuesta a la infección con

*Phytophthora infestans* son esencialmente altas en tubérculos de papa inducidos sistémicamente por promotores biogénicos comparados con el control (Ozeretskovskaya *et al* 1986)

Uno de los mecanismos de defensa en las plantas es reportado por: Hammerschmidt y Kué (1982) en donde la lignificación de la pared celular en el pepino pudo ser un mecanismo de resistencia sistémica inducida; esto es, que la **lignificación** ocurre más rápidamente y en mayor extensión en pepinos protegidos con *Colletotrichum lagenarium* que en el control después de ser infectados con *Cladosporium cucumericum*. La inhibición de penetración fue asociada a la lignificación de la pared celular de la epidermis directamente debajo del apresorio. La germinación de la conidia y la frecuencia de penetración de *C.cucumericum* fueron similares tanto en plantas protegidas como en control, pero el desarrollo del hongo en el tejido lignificado fue marcadamente restringido.

Dentro de los mecanismos de la inducción de resistencia sistémica Loebenstein y Van Praagh encontraron que las partes bajas de las hojas de *Datura stramonium* con el virus de la necrosis del tabaco (TNV) inducían resistencia en la parte superior no inoculada de la misma hoja. Ellos aislaron de la hoja, una sustancia similar al interferón, la cual inhibía la infección viral, se determinó que era una proteína con un peso molecular menor a 30,000 Da (Oku 1994).

Los mecanismos de la inducción de resistencia contra virus son definitivamente diferentes a los de los hongos. White y Antoniw (1991) sugieren que la inducción de resistencia a virus en tabaco esta basada en dos mecanismos principales: la inhibición de la replicación del virus y la formación de Proteínas-PR. El inhibidor de la replicación del virus (IVR) parece ser una proteína que ha sido detectada en el fluido intercelular de hojas de tabaco previamente inmunizadas sistémicamente con el TMV (Spiegel *et al* 1989). El segundo mecanismo de la inducción de resistencia contra virus incorpora la producción de Proteínas-PR, las cuales están asociadas con la inducción de resistencia local y sistémica a virus en plantas de tabaco. Se ha establecido que las Proteínas-PR se acumulan más en sitios cerca de la infección del virus, precisamente en los sitios en donde la resistencia es inducida (Antoniw y White 1986).

En 1970 dos grupos de investigadores independientes (Gianinazzi *et al*; van Loon y van Kamman) reportaron la síntesis de varias proteínas que indujeron en plantas de tabaco una respuesta de hipersensibilidad al TMV. Como más proteínas fueron identificadas se propuso el nombre de Proteínas relacionadas con patogénesis (Proteínas-PR) (Antoniew 1980).



Las formas básicas de las Proteínas-PR han sido identificadas recientemente, las cuales se acumulan en las vacuólas de las plantas (Bol *et al.* 1990). Las Proteínas-PR mejor caracterizadas de plantas de tabaco infectadas con TMV, se colocan en cinco grupos basadas en tamaño, composición de aminoácidos y serología (Kauffman *et al.* 1990; van Loon *et al.* 1987).

Hay estudios que demuestran que el ácido salicílico está relacionado con la inducción de resistencia en el tabaco y otras plantas, éste actúa como un mensajero que activa los mecanismos naturales de defensa en las plantas. White (1979) reportó que el ácido acetilsalicílico (aspirina) induce resistencia a virus en tabaco, luego el ácido salicílico precursor del ácido acetilsalicílico fue encontrado en variedades de tabaco inoculadas con el TMV, con concentraciones de 50 veces más en los sitios de infección que en plantas sanas (control). Se sugiere que el ácido salicílico puede ser transportado por el floema y acumulado en hojas libres de virus; esta movilidad en combinación con la actividad de inducción sugieren que el ácido salicílico puede servir como una señal en la inducción de resistencia, además es capaz de activar las Proteínas-PR y otros mecanismos de defensa como las fitoalexinas, inhibidores de proteinasas y la lignificación de la pared celular.

#### 4.6.2. Inducción de resistencia en *Lycopersicon*

La inducción de resistencia en tomate no ha sido muy investigada, pero hay evidencias de que ocurre en estas plantas. Sule (1988) obtuvo inducción de resistencia local al marchitamiento bacterial por *Corynebacterium michiganense* en tomate, la respuesta de defensa fue inducida en plantas preinoculadas con varias razas de *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola. La multiplicación de *C. michiganense* fue restringida y la infección localizada en el tejido inducido. Sin embargo los tejidos cercanos al sitio de la inducción no fueron protegidos, siendo esta resistencia local no sistémica.

En pruebas de campo con semillas de tomate pretratadas con un promotor biogénico, aumentó la resistencia de plantas de tomate hacia: *P. infestans*, *Alternaria solani*, *Septoria lycopersici* y *Xanthomonas vesicatoria*. También se estableció inducción de resistencia hacia el nemátodo *Meloidogyne incognita*, el número de agallas fue considerablemente reducido en las raíces de las plantas inmunizadas, y la capacidad del nemátodo hembra para producir huevos dramáticamente suprimida (Ozeretskovskaya 1995).

Según Oku (1994) la protección cruzada contra el virus del mosaico del tabaco (TMV) en tomate con una raza atenuada del mismo virus a sido comercialmente exitosa en Japón, y usado en muchos países. Holmes y Oshima *et al.* obtuvieron razas suaves del TMV usando tallos de tomate inoculados con el TMV, esta raza fue llamada L<sub>11</sub>. Goto y Nemoto inocularon L<sub>11</sub> en *Nicotiana glutinosa* una especie de tabaco resistente al virus, obtuvieron una raza menos sintomática y estable del virus y la llamaron L<sub>11A</sub>. Años después Oshima *et al.* obtuvieron la raza L<sub>11A237</sub> la cual pudieron multiplicar en cultivares de tomate resistentes. Ambas razas L<sub>11A</sub> y L<sub>11A237</sub> son ampliamente usadas en Japón. Conforme a experimentos a gran escala, los tomates protegidos con estas razas atenuadas de virus tanto en invernadero como en campo, no mostraron síntomas hasta la cosecha, logrando incrementar la producción en 15-30% comparados con tomates no tratados (Oku 1994)

#### 4.7. Rizobacterias

El termino rizobacteria, se refiere a las bacterias que colonizan agresivamente las raíces, algunas de ellas han demostrado además, capacidad para promover el crecimiento de las plantas, por lo que se les conoce como “Rizobacterias Promotoras del Crecimiento en las Plantas” ó en sus siglas en inglés: **PGPR** (Weller 1988)

Las rizobacterias pueden favorecer la liberación de exudados en mas del 100% a través de reguladores de crecimiento, vitaminas, toxinas, enzimas celulolíticas u otros compuestos, o a través de la alteración de la disponibilidad de nutrientes. Las rizobacterias pueden utilizar varias fuentes simultáneamente o bien la que, según las condiciones, este más disponible (Kluepfel, 1993).

La rizosfera es la primera barrera de defensa para evitar que los patógenos ataquen a las plantas, los microorganismos que crecen en ella son ideales para usarse como agentes de control biológico. Esta por lo general se mantiene durante el crecimiento secundario de la raíz (Kluepfel 1993).

Investigaciones acerca del modo de acción de las rizobacterias han demostrado que ellas promueven el crecimiento de la planta de dos maneras; una es en forma indirecta, ya que las rizobacterias benéficas reducen la actividad de los hongos y de bacterias patogénicas del rizoplano.

Tal promoción indirecta del crecimiento puede ser considerada como control biológico, aún cuando esto no necesariamente está asociado con control de patógenos (Kloepper y Schroth 1981).

Algunas rizobacterias promueven directamente el crecimiento de la planta, por la

producción de metabolitos que estimulan el crecimiento de la planta independientemente de los microorganismos nativos del suelo; esto se debe supuestamente a que la rizobacteria, al acelerar las tasas de crecimiento, hace que las raíces escapen a la enfermedad (Kloepper *et al.* 1990).

Los efectos benéficos de las PGPR han sido documentados por algunos grupos de investigadores, que pueden resumirse así: (1) promoción directa del crecimiento de las plantas, (2) control biológico de enfermedades, y (3) inducción de resistencia contra enfermedades (Tuzun y Kloepper 1995).

Las PGPR aplicadas como tratamiento a la semilla pueden inducir resistencia sistémica en los primeros estados de desarrollo de la planta, por lo tanto más estudios son necesarios para comparar las respuestas bioquímicas de plantas inducidas por tratamiento a la semilla y a la raíz con PGPR. Varios estudios han indicado que PGPR específicas, pueden estimular la producción de compuestos bioquímicos asociados con la defensa de las plantas (Tuzun y Kloepper 1995).

Plantas con colonización a la raíz por PGPR están asociadas con una incrementada actividad de peroxidasa (Albert y Anderson 1987) y un aumento en la lignificación de tallos y hojas en frijol (Anderson y Guerra 1985). Todos estos análisis demuestran claramente que la inoculación con PGPR en tratamiento a la semilla y raíz, conlleva cambios fisiológicos sistémicos en las plantas (Tuzun y Kloepper 1995).

En un sistema de frijol, la inoculación a la semilla con una raza de *Pseudomonas fluorescens* indujo una reducción en número de lesiones foliares causadas por *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* (Alstrom 1991). En pepino, 94 razas de PGPR conocidas, fueron examinadas por su habilidad para controlar *Corbiculare* (Wei *et al.* 1991). Seis razas de PGPR aplicadas como tratamiento a la semilla, consistentemente resultaron en reducciones significativas del diámetro y número de las lesiones de antracnosis, cuando el patógeno fue aplicado 21 días después de la siembra (Kloepper *et al.* 1993).

Las interacciones de las rizobacterias no están referidas solamente a otras bacterias, si no también a otros organismos, incluyendo hongos, nemátodos, protozoarios y lombrices, por lo que sus interacciones son complejas y poco entendidas. Estas interacciones se pueden considerar tanto directas como indirectas, las primeras se refieren a competencia y depredación; mientras que las interacciones indirectas son provocadas por las modificaciones tanto químicas como físicas del

ambiente radical (Kluepfel 1993). En algunos suelos conocidos como supresivos, las interacciones entre los microorganismos del suelo originan una adversidad contra los patógenos que es especialmente efectiva, lo que conduce a un control sustancial de las enfermedades (Weller 1988).

Los resultados de ensayos de campo llevados a cabo por Wei *et al.* (1991), demostraron que la inducción de resistencia con PGPR, así como el crecimiento de las plantas fue factible en condiciones de campo. La protección se observó contra dos patógenos: *Pseudomonas syringe* pv. *lachrymans* y *Colletotrichum orbiculare*. La cual tuvo además una alta correlación con el crecimiento temprano de las plantas y el incremento en la producción.

#### 4.8. Enmiendas orgánicas

En la producción agropecuaria se pueden identificar diferentes fuentes de materia orgánica, a través de las actividades agrícolas, ganadera, doméstica y agroindustrial. Entre las principales fuentes se destacan los residuos de cosecha, residuos de maleza, los estiércoles y los residuos y subproductos de la agroindustria (Guerrero 1993).

Un material orgánico se considera abono o enmienda orgánica cuando es incorporada al suelo con el objetivo de proporcionar nutrientes a las plantas, actuar sobre características físico-químicas del suelo o como estimulante de procesos metabólicos en las plantas (Gajdos 1992).

Se define como "compost" o abono orgánico al producto estable e inofensivo sanitariamente, que resulta de la descomposición química y biológica de la materia orgánica producto de residuos urbanos, agrícolas e industriales, permitiendo su reutilización en la proximidad de la producción local (Bardos 1992). La materia orgánica es el motor que mueve todos los procesos biológicos y algunos de los procesos químicos del suelo (Coleman 1995).

La necesidad de mantener los suelos agrícolas y de eliminar o reutilizar correctamente los desechos producidos por diferentes actividades humanas nos obliga a tipificar y tratar adecuadamente estos residuos orgánicos que pueden ser usados en la agricultura como fertilizantes, enmiendas o substratos. Los abonos orgánicos aumentan la producción agrícola debido a los siguientes factores: 1) Mejoran la estructura del suelo, por lo tanto previenen la erosión; 2) actúan reteniendo agua, previniendo el estrés hídrico; 3) actúan como fertilizantes al almacenar y liberar los nutrientes en forma disponible para las plantas y 4) actúan sobre la microflora, la cual controla

enfermedades del suelo y supe a las plantas de nitrógeno del aire y formas insolubles de fósforo y potasio de las reservas del suelo (Dalzell *et al.* 1991).

El bocashi o abono fermentado, es un "compost" preparado con una variante del proceso general, mediante el cual es posible obtener el producto de la descomposición de los materiales en un periodo de dos semanas y se aplica en menores cantidades que el compost porque esta "semicrudo", se termina de procesar una vez aplicado (ANAO 1996).

## 5. MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Localización del experimento

Los experimentos se realizaron en los laboratorios e invernaderos de la Unidad de Fitoprotección del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Ubicado en Turrialba, provincia de Cartago a 602 msnm, entre los 9° 55'21" de latitud norte y 83° 39'40" de longitud oeste, con precipitación promedio anual de 2065 mm, humedad relativa de 87% y la temperatura promedio anual de 21°C, con una máxima de 26°C y una mínima de 18°C (Anexo 2).

### 5.2 Recolección de muestras y aislamiento de rizobacterias

Las muestras de raíces se recolectaron de dos zonas tomateras en Costa Rica: Guayabo provincia de Cartago y Grecia provincia de Alajuela. Se colectaron plantas que mostraban daños visibles por geminivirus y plantas con poco o ningún daño visible dentro de la misma plantación, de forma aleatoria dentro del campo de cultivo.

En Grecia se colectaron muestras de dos parcelas: la parcela número 1 era una parcela con manejo convencional y la parcela número 2 era una parcela experimental de la unidad de MIP-CATIE, la cual tenía un manejo integrado, con coberturas vivas. En ambas parcelas las plantas de tomate eran de la variedad Hayslip y estaban en etapa de floración.

Se recolectaron 12 muestras en total, 9 procedían de Grecia y 3 de Guayabo. Los materiales obtenidos se rotularon con la letra M (muestra), el número que le correspondía (1-12), la inicial P1 o P2 para indicar la parcela y luego con la palabra raíz o suelo, para indicar su procedencia.

Los aislamientos de rizobacterias se realizaron de la siguiente manera (Fig. 1): (a) Se removió la mayor cantidad de suelo posible de la raíz y se lavaron con agua destilada estéril para obtener una solución con las pequeñas partículas de suelo adheridas a la superficie de las raíces. (b) Las raíces se cortaron en trozos pequeños y se obtuvo de cada planta una muestra de 5g. La cual se colocó en un erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de agua destilada estéril, agitándose por 45 min. en un agitador.

De cada una de las dos soluciones obtenidas se tomó 1 ml y se colocó en un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril. Posteriormente se procedió a realizar las diluciones decimales hasta  $10^{-5}$ , según la técnica empleada por Leben (1961).

De las diluciones se tomaron 20  $\mu$ l y se rayaron en platos Petri con un medio nutritivo de agar nutriente (AN) para el crecimiento de bacterias (Anexo 3). Los platos Petri se colocaron en la incubadora a 26 °C para favorecer el crecimiento de las bacterias. Los aislamientos se seleccionaron con base a sus diferencias morfológicas; estas se refieren a la forma del crecimiento de la bacteria en el medio, la cual puede mostrar un crecimiento plano o en forma de pequeños abultamientos, y al color de la cepa.

Las diferentes colonias de rizobacterias fueron purificadas rayándolas repetidas veces en los platos Petri con agar nutriente hasta obtener cepas puras, luego se rayaron las mismas en platos Petri con el medio B-de King el cual es un medio específico para detectar *Pseudomonas* fluorescentes.

De las 12 muestras de raíz recolectadas se aislaron 42 rizobacterias, a las cuales se les asignó un nombre clave usando las letras MG y luego un número (1-42) para diferenciarlas entre sí (Anexo 4). Se les realizaron pruebas bioquímicas y térmicas para su posterior identificación y selección de tres de ellas para ser utilizarlas en este experimento, como inductoras de resistencia o promotoras de crecimiento.

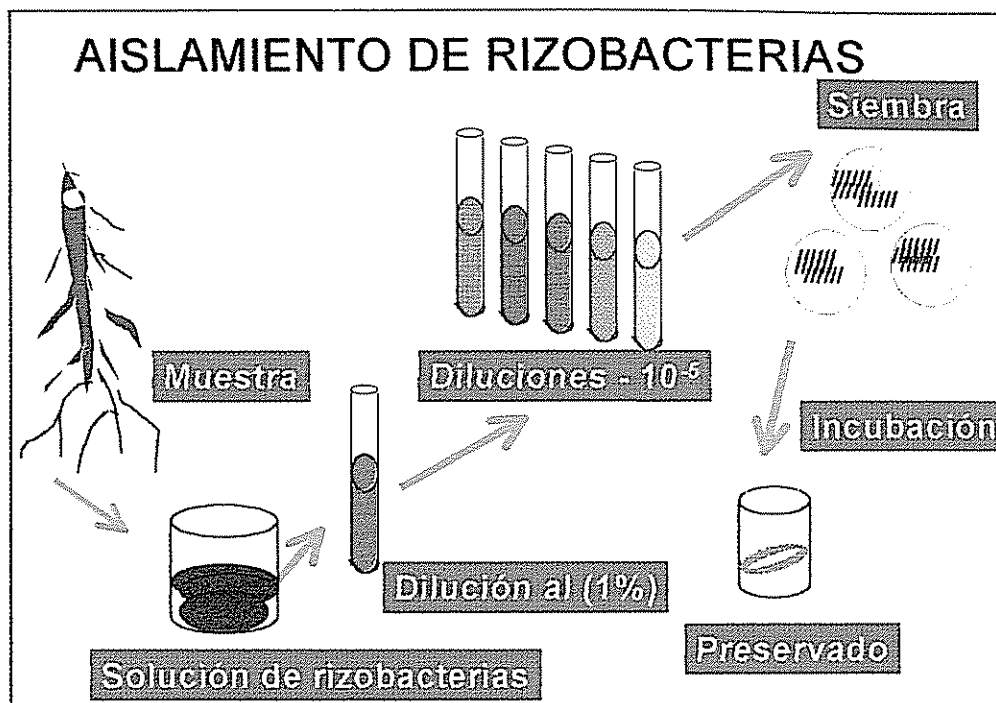


Figura 1. Proceso de aislamiento, siembra y preservado de rizobacterias. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998

### 5.3. Pruebas bioquímicas para identificación de bacterias

#### 5.3.1. Prueba de KOH

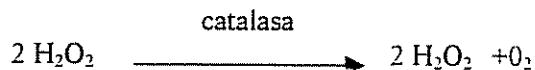
Esta prueba se basa en la resistencia de la pared celular de las bacterias gram positiva al tratamiento con una solución de hidróxido de potasio (KOH) al 3 %

Se coloca una gota de KOH al 3 % en un portaobjetos, con una asa estéril se toma una porción pequeña de masa bacteriana y se mezcla en forma rotacional con la gota de KOH. Si después de 10 segundos se aprecia una masa viscosa es indicativo de una gram negativa, si no se observa la viscosidad es señal de una gram positiva (Bustamante 1993)

#### 5.3.2. Prueba de catalasa

La catalasa es una enzima que poseen la mayoría de las bacterias aeróbicas y facultativas anaerobias. El peróxido de hidrógeno es uno de los productos finales del metabolismo oxidativo de los carbohidratos y si se acumula es letal para el microorganismo

La catalasa convierte el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en agua y oxígeno de acuerdo a la siguiente reacción:



En un portaobjetos se coloca una pequeña cantidad del cultivo bacteriano de uno a tres días de edad y se agregan unas gotas de  $H_2O_2$  al 2 %. Si se forman burbujas (efervescencia) la reacción es positiva; si no se produce efervescencia la reacción es negativa (MAG y GTZ, 1991; Antillon Guerrero *et al.* 1987).

### 5.3.3. Prueba de oxidasa

La enzima oxidasa, conocida también como Citocromo C oxidasa o Indofenol oxidasa, se encuentra en una gran variedad de seres vivos entre los que se incluyen desde bacterias hasta animales superiores. Su función es la de promover la oxidación del citocromo "C" a expensas del oxígeno molecular. En bacteriología se puede determinar su presencia al hacer reaccionar una población bacteriana con un sustrato oxidable como el Clorhidrato de tetrametil-para-fenilendiamina (reactivo) y el resultado observado es la aparición de color que va del rosado al púrpura (MAG - GTZ, 1991; Antillon-Guerrero *et al.* 1987)

La prueba se realizó sobre papel filtro el cual se embebió con el reactivo y se colocó una pequeña cantidad de cultivo bacteriano de uno a tres días de edad. La aparición de un color púrpura en un tiempo de 10 segundos indicó una reacción positiva y la no-aparición del color en el tiempo estipulado una reacción negativa (Bustamante 1993)

### 5.3.4. Prueba de crecimiento anaeróbico

Esta prueba se realizó utilizando tubos de ensayo estériles que contenían un medio específico para esta prueba, el cual está compuesto de dos partes: un medio base (Medio I) y la fuente de carbono o compuesto orgánico (Medio II) que se preparan y esterilizan por separado y se mezclan después (Anexo 5)

El Medio II se filtró con un filtro estéril de membrana, en un recipiente estéril y se agregó 0.5 ml con una pipeta esterilizada, a cada tubo de ensayo que contenía el Medio I y se mezclaron para obtener el medio completo (MAG-GTZ 1991)



Con una asa bacteriológica se inocularon las bacterias en los tubos de ensayos y se sellaron inmediatamente con una capa de parafina derretida, se dejó un tubo sin bacterias como testigo; se incubaron a 35 °C por 24 horas y hasta por 5 días. La prueba fue positiva si la solución de los tubos adquirió una coloración amarillo fuerte, resultando una coloración azul para el testigo.

#### 5.3.5. Prueba de fluorescencia

Esta prueba sirve para separar las *Pseudomonas* fluorescentes de las que no lo son, haciendo uso del medio específico B-de King (KB).

Las especies de *Pseudomonas fluorescens* se identificaron por la formación de un pigmento verde fluorescente en un medio con bajo contenido de hierro (Agarwal *et al.* 1989).

Para preparar el medio B- de King se calentó el agua y se agregaron los reactivos previamente pesados (Anexo 6), se agitaron hasta disolverlos completamente, se dejaron hervir por un minuto, luego se depositaron en frascos para autoclave, esterilizando a 121 °C por 25 minutos a 15 atmósferas de presión.

#### 5.3.6. Prueba de Bacillus

Esta prueba se realiza para separar las *Pseudomonas* de los *Bacillus*, ya que estas últimas forman esporas (endosporas) resistentes al calor (Buchanan y Gibbons 1974).

Se colocaron en baño de María a 80 °C por 10 minutos los tubos de ensayo con una solución de bacterias en agua destilada estéril. Luego de rayarlos en los platos Petri con AN, se colocaron en la incubadora, las colonias que crecieron de nuevo después del baño María generalmente son las del género *Bacillus*. La reacción positiva a la prueba se confirmó en los platos con crecimiento bacteriano en AN a las 48 h de incubación (Okumoto 1992).

#### 5.3.7. Caracterización morfológica

La forma, elevación y el tipo de borde que caracterizan el crecimiento de las colonias de bacterias son muy útiles en su clasificación. Por lo cual se hizo una descripción de la forma y el borde de las 42 bacterias aisladas (Anexo 4).

#### 5.4. Activación de bacterias.

En este experimento se usaron dos rizobacterias de la colección CATIE-MIP, anteriormente probadas en otros experimentos: *Bacillus cereus* y *Pseudomonas cepacia*.

Para activarlas fueron rayadas en platos Petri con AN, colocándose en la incubadora a 30°C por 48 horas. Luego se prepararon soluciones de las dos rizobacterias con agua destilada estéril, las cuales se calibraron con la ayuda de la cámara de contaje Petroff-Hausser a  $10^9$  unidades formadoras de colonias (ufc) por ml.

Con estas soluciones ya calibradas se inocularon las hojas de plantas de tomate sanas mantenidas en el invernadero, con la ayuda de un aspersor De Vilbiss. Después de 4 días fueron aisladas de las hojas de la siguiente manera:

Las hojas inoculadas, se recolectaron y se llevaron al laboratorio; se cortaron en pequeños trozos, se pesaron 5g de hojas y se colocaron en un erlenmeyer con 150ml de agua destilada estéril. Se agitaron durante 45 minutos; de la solución obtenida se tomó 1ml que fue colocado en un tubo de ensayo con 9ml de agua destilada estéril, procediéndose a hacer las diluciones hasta  $10^{-5}$ . De las diluciones de  $10^{-3}$  hasta  $10^{-4}$  se tomaron 20  $\mu$ l y se rayaron en platos Petri con AN y se depositaron en la incubadora.

#### 5.5. Prueba de inducción de resistencia

Se utilizaron plantas de tomate de la variedad Hayslip, por su susceptibilidad al geminivirus y por ser de uso comercial, como tomate de mesa en Centroamérica. También se utilizó la línea de tomate 8429 con resistencia intermedia, que registró bajo índice de severidad y señales leves en la detección del geminivirus en una evaluación realizada por CATIE (1998).

Se utilizaron maceteros de polietileno Polyplast No 1000 de 5kg de capacidad, el sustrato utilizado fue suelo, recolectado en la estación experimental La Montaña del CATIE; el cual fue esterilizado en los hornos durante 24 horas, se dejó airear por lo menos una semana. Se le practicaron análisis químicos después de la esterilización; lo mismo a la mezcla de suelo estéril con la enmienda orgánica de acuerdo a cada tratamiento (Anexo 7). También se realizaron análisis químicos a los dos tipos de enmiendas: Compost y Bocashi (Anexo 8).

Se sembraron de 4-5 semillas por maceteros en siembra directa y a los 15 días después de la germinación (ddg) se dejó solamente una planta la mas desarrollada y sana.

Durante esta primera etapa de crecimiento y hasta la inoculación con geminivirus, las plantas se mantuvieron en el invernadero, el riego se hizo con agua destilada; una semana después de la inoculación con geminivirus se colocaron fuera del invernadero, donde recibieron generalmente agua de lluvia, a excepción de los días sin precipitación, siendo entonces regadas con agua potable.

## 5.6. Manejo del vector

Las moscas blancas (*Bemisia tabaci*) fueron colectadas en el campo: Guayabo y Grecia en plantas que presentaban síntomas del virus, para asegurarse que fueran portadoras del virus.

Se mantuvieron en la casa de mallas a temperatura ambiente alimentándose principalmente de plantas de tomate jóvenes, que son las que prefiere el vector para su alimentación y reproducción. También dentro de la casa de mallas se mantuvieron otras plantas hospederas de *B. tabaci* como: frijol, algodón y tabaco para aumentar el numero de moscas dentro de la colonia y asegurar así la población de moscas virulíferas.

Se dispuso también de dos macrojaulas para la cría masiva de moscas blancas traídas del campo y así rejuvenecer periódicamente la colonia. Las moscas blancas se manipularon con aspiradores bucales (frascos de plástico transparentes con un tapón de hule o corcho con dos agujeros en los que se conectan dos pequeñas mangueras, una de ellas sirve para aspirar, la cual tiene un extremo cubierto con malla fina; y la otra tiene ambos extremos descubiertos para permitir el paso de la mosca que se depositará en el frasco).

Dado que los adultos son muy delicados, es fundamental no capturarlos con el aspirador mientras están succionando savia, pues podría romperse el estilete y morir, se aconseja perturbarlas un poco y luego capturarlas (G. Rivas, conversación personal.)

## 5.7. Inoculación de las rizobacterias

Las rizobacterias utilizadas en este experimento fueron: *Bacillus cereus*, *Pseudomonas cepacia*, pertenecientes a la colección del laboratorio MIP-CATIE. Estas rizobacterias en estudios

previos realizados por González *et al.* (1996) y Jiménez (1996), mostraron actividad en el control biológico. También se trabajó con tres bacterias aisladas de muestras de plantas de tomate colectadas en el campo: MG4 (*Bacillus* sp), MG10 (*P. fluorescens*) y MG15 (*Pseudomonas* sp).

Se evaluaron cinco rizobacterias y dos enmiendas orgánicas (compost y bocashi) en dos cultivares diferentes de tomate (Hayslip y 8429). Las rizobacterias fueron inoculadas solo a la semilla, debido a que en un estudio previo realizado por Jiménez (1996) ésta forma de inoculación dio los mejores resultados.

### 5.7.1. Bacterización a la semilla.

Según Kloepper (1993) el término bacterización se refiere a la inoculación de cultivos bacteriales sobre semillas ó en unidades propagadas vegetativamente. Las etapas involucradas son: sobrevivir sobre la semilla, multiplicarse y adherirse en respuesta a los exudados radicales en la superficie de la raíz, colonizar el sistema radical en desarrollo y algunas rizobacterias pueden colonizar la parte interna de la raíz y tallo (Fig. 2)

La bacterización a la semilla se realizó de acuerdo a la técnica utilizada por Zidack (comunicación personal) de la siguiente manera:

- a) Se prepara una solución de 400 mM de Sucrosa y 1.5 % de Carboxi-metil celulosa (137gr de Sucrosa y 15gr de Carboxi-metil celulosa en un litro de agua). Autoclavar la solución antes de utilizarla.
- b) Se obtienen "pellets" de las bacterias, colocándolas en tubos de ensayo con agua destilada estéril y luego centrifugando a alta velocidad.
- c) Los "pellets" de las bacterias se resuspenden en la solución de Sucrosa/Carboxi-metil celulosa.
- d) Se cubre la semilla completamente con la mezcla de la solución + bacterias
- e) Luego se ponen a secar las semillas sobre papel filtro, en un lugar con aire seco.

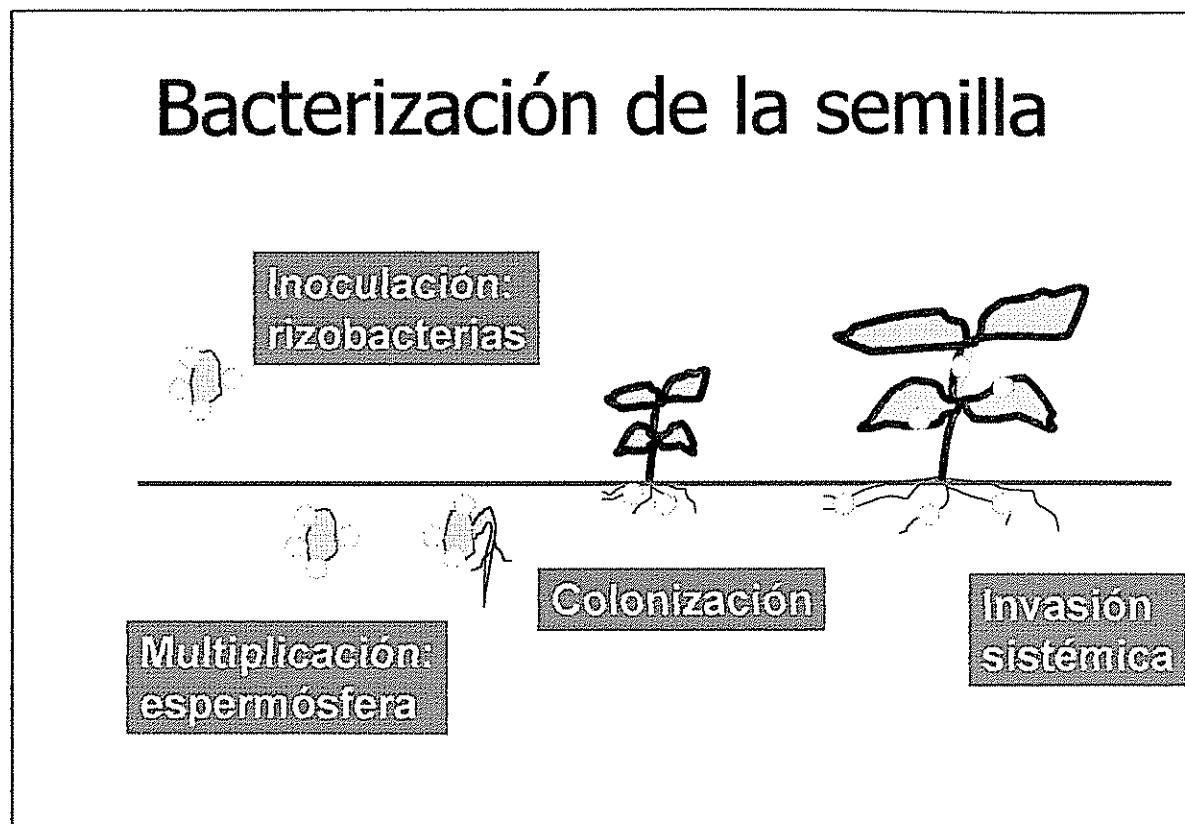


Figura 2. Etapas involucradas en la bacterización de la semilla (Kloepper 1993).

## 5.8. Uso de enmiendas orgánicas

Se usaron dos enmiendas orgánicas: compost y bocashi en los tratamientos 6 y 9; 7 y 10 respectivamente, mezclándose con suelo estéril en las siguientes proporciones:

El compost se mezcló con suelo estéril en una proporción de 4:1 (sustrato 1), mientras que el bocashi se mezcló a una proporción de 7:1 (sustrato 2). Para ambos sustratos se realizaron análisis químicos, los cuales se interpretaron y compararon con el suelo utilizado en los tratamientos que no poseían enmienda orgánica

La elaboración de ambas enmiendas se realizó de acuerdo a la metodología sugerida por La Asociación Nacional de Agricultura Orgánica (ANAO) de Costa Rica. El compost fue utilizado anteriormente por Hernández (1997) y elaborado por el Proyecto Frutas y Vegetales Tropicales (CATIE-USDA).

Los materiales y las cantidades utilizadas para la elaboración del bocashi fueron los siguientes: Un saco de suelo de montaña, un saco de gallinaza, 1/2 saco concentrado para ganado, un saco carbón en polvo, 1 saco de cascara de café, un saco de tierra, 5 Kg. de cal, 3 Kg. de roca fosfórica y 1 litro de melaza disuelta en 20 litros de agua. Para su elaboración se aplicó el siguiente procedimiento: (1) Se colocó un saco de suelo extendido sobre una superficie de cemento y luego se agregaron en capas los siguientes ingredientes: gallinaza, concentrado, carbón, cascara de café, cal, roca fosfórica y por ultimo otra capa de suelo. (2) Se mezclaron todos los ingredientes con una pala. Cuando la mezcla estuvo uniforme se le agregó la melaza hasta obtener una consistencia húmeda, sin sobrepasar el 50% de humedad. (3) Con la mezcla se hizo un montículo de aproximadamente 80 cm de alto, y se cubrió con los sacos por dos días. (4) La mezcla se revolvió diariamente, manteniendo una temperatura de 55 °C, esto se logró variando la altura del montículo; al calentarse mucho, se bajaba la altura. Si la temperatura bajaba, se procedía a aumentar la altura del montículo. (5) El proceso anterior se repitió hasta que la temperatura del bocashi alcanzó entre 25-30 °C. (6) Cuando la temperatura se estabilizó se siguió removiendo el bocashi hasta que éste se secó. El proceso tardó aproximadamente dos semanas. El bocashi se pudo utilizar inmediatamente. Toda la mezcla restante se almacenó en un lugar seco.

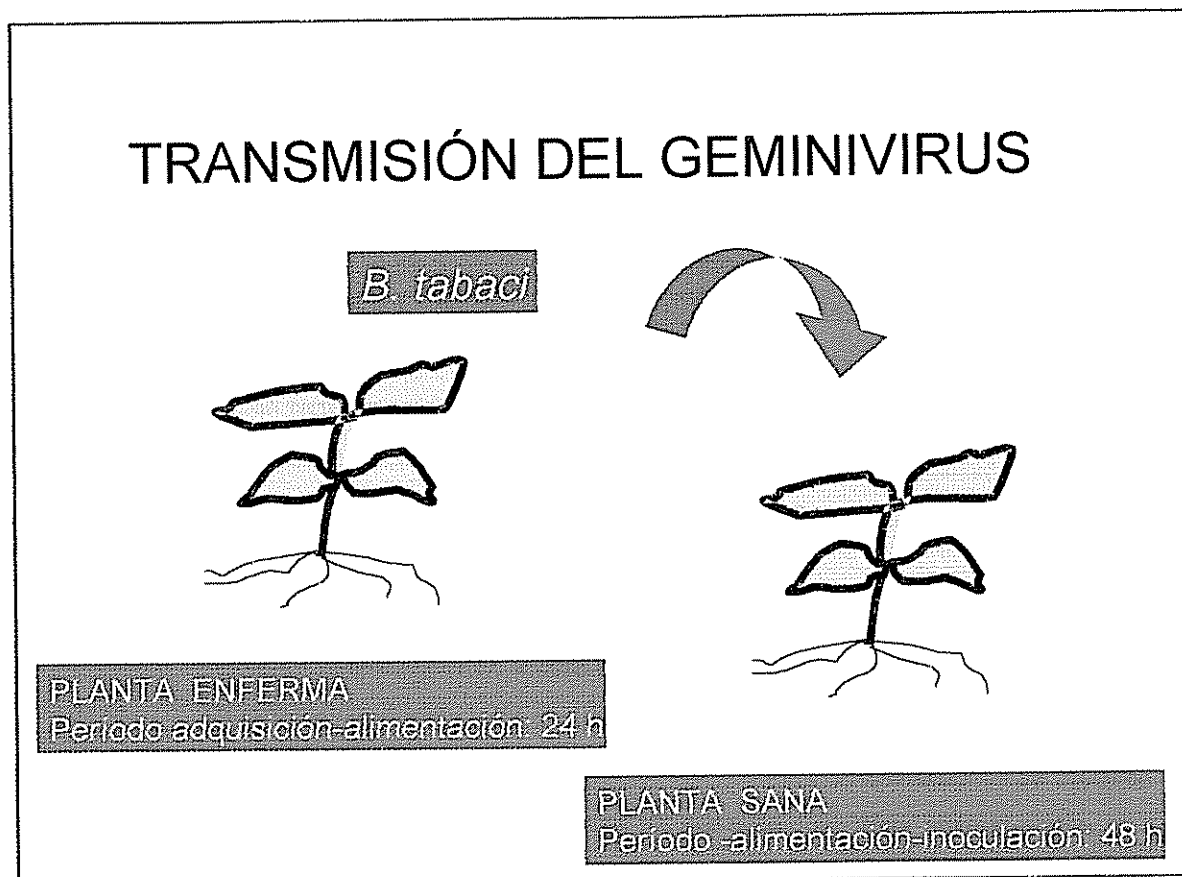
Seguidamente se realizaron análisis químicos tanto de las mezclas como de las enmiendas orgánicas (Anexo 7 y 8). Luego se procedió al llenado de los maceteros, sembrando las semillas ya bacterizadas.

### **5.9. Transmisión del virus.**

Para transmitir el geminivirus a las plantas sanas, se utilizaron 2-3 moscas blancas por planta de tomate, se colocaron en microjaulas (pequeños cilindros de plástico transparente, de dos cm de diámetro, cuyo extremo inferior esta cubierto de malla fina y su extremo superior con una lamina delgada de esponja ya que es la parte que esta en contacto con la hoja y permite su transpiración) estas microjaulas junto con las moscas se sujetan a las hojas de las plantas con soportes de alambre.

Las plantas se inocularon a los 30 días después de la germinación (ddg). Fue necesario un período de 24 h para la alimentación-adquisición del virus, aproximadamente 20 h para el período de latencia y un período de dos días para la alimentación--inoculación Fig. 3).

El testigo absoluto T12 fue el único que no se inoculó con geminivirus y se mantuvo en invernadero para evitar que se contaminara en el campo.



**Figura 3. Proceso de transmisión del geminivirus en plantas sanas. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.**

Después de la transmisión, las plantas fueron puestas fuera del invernadero y se dejó un intervalo de 15 días (45 ddd) para la observación visual de síntomas característicos del virus y estimar la severidad utilizando la escala sugerida por Rom *et al.* (1993) y modificada por Castro Martín *et al.* (1998) se evaluaron los síntomas semanalmente por 5 semanas.

La escala de Rom *et al.* (1993) y modificada por Castro Martín *et al.* (1998) se describe a continuación.

1= Leve amarillamiento de los márgenes de hojas apicales.

2= Amarillamiento de hojas apicales, color púrpura intervenal, reducción del tamaño de la hoja y leve disminución del tamaño de la planta.

- 3= Disminución del tamaño de la hoja, deformaciones foliares, manchas de color púrpura en el área foliar y enanismo de la planta
- 4= Acentuada disminución del tamaño de las hojas, mayor área foliar de color púrpura, consistencia coriacea de hojas y enanismo de la planta
- 5= Severo enanismo de la planta, necrosis foliar y tallo apical y erección de ramas axilares.

## 5.10. Medidas de control durante el experimento

A los 10 días después de la germinación de las plantas, se presentó una bacteriosis en los tratamientos T1, T2, T3, T4 y T5 de ambos cultivares: Hayslip y 8429. Para lo cual se aplicó una solución del 5 g de Nitrato de calcio por macetera en agua destilada; se hicieron tres aplicaciones las dos primeras cada siete días y la tercera a los 15 días. Observándose una gran mejoría y pronta recuperación de las plantas afectadas. Se aplicó Nitrato de calcio para compensar la deficiencia que se presentaba en el suelo utilizado, ya que la enfermedad se manifestó por la misma deficiencia.

Para el control del problema antes mencionado, a los 15 ddg se aplicó Kilol (5 ml/l) un bactericida y fungicida orgánico natural, a base de extracto de semilla de toronja, cuyo ingrediente activo es: 2.5 anhido-1-0/4- dimetil /2/2-4- (1,1,3, tetrametilbutil) fenoxo etoxy/ etil / amonio / metil/fenil/hepta 3 enitol clorido, monoéter con 3-(3 hidrox)-1,2 propanodiol. Se hicieron dos aplicaciones en un intervalo de 15 días para todos los tratamientos. Esta misma medida se tomó unas semanas antes de la cosecha de las plantas, pues se presentaron severos ataques de hongos y bacterias.

Durante la etapa de invernadero se presentaron problemas foliares con Oidium, el cual se controló manualmente cortando y eliminando las hojas afectadas.

## 5.11. Prueba de detección del Geminivirus

### 5.11.1. Reacción de la polimerasa en cadena ó PCR

La prueba de PCR consiste en la amplificación selectiva y exponencial de una región del ácido nucleico, que se añade a la reacción (Fig. 4). Esta amplificación es realizada por una enzima de ADN, la polimerasa termoestable, en presencia de oligonucleótidos que hibridan en dos zonas de cadenas antiparalelas del ADN, iniciando la polimerización y delimitando la reacción amplificada.



La reacción se somete a un ciclo de temperaturas que favorecen la separación de cadenas de ADN, la hibridación de los iniciadores y la síntesis de nuevo ADN. Este ciclo se repite entre 30 y 40 veces, para conseguir una replicación exponencial que permite obtener una cantidad de ADN visible mediante electroforesis en geles teñidos con bromuro de etidio (Saiki *et al.* 1985).

En el laboratorio del Departamento de Ciencias Agrícolas de la Universidad de Arizona se realizó un análisis PAUP (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) para observar las distancias genéticas ligadas al geminivirus presente en las muestras de tejido foliar fresco enviadas.

Según Idris y Brown (1998) la prueba de detección se realizó con el siguiente protocolo experimental:

- a) **Iniciadores o cebadores:** Fueron usados tres iniciadores específicos para amplificar la región común (CR) de la proteína de la cápsula del geminivirus: prAV1134, prAC344 y prBV1855.
- b) **Protocolo experimental:** Las reacciones del PCR se realizaron con un termociclador de ADN (Norwalk, CT) Perkin-Elmer. La mezcla de reacción (25  $\mu$ l) contenía: 0.5  $\mu$ l de ADN extraído de las hojas de tomate; 2.5-3.0 mM de  $MgCl_2$ ; tampón de extracción 1x (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, pH 8.0); 150  $\mu$ M dNTPs y 20 pmol de cada primer. La Taq ADN polimerasa fue usada de acuerdo a las especificaciones de la Perkin-Elmer.
- c) **Parámetros de amplificación:** Fueron 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por dos minutos; seguido por un minuto a 95 °C; un minuto a 58 °C ; y un minuto a 72 °C. La extensión final duró 20 minutos a 72 °C

Los productos del PCR fueron corridos con electroforesis en un gel de agarosa al 1% en el tampón: Tris-acetato-EDTA, pH 8.0. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio, lavados con agua y vistos con iluminación UV.

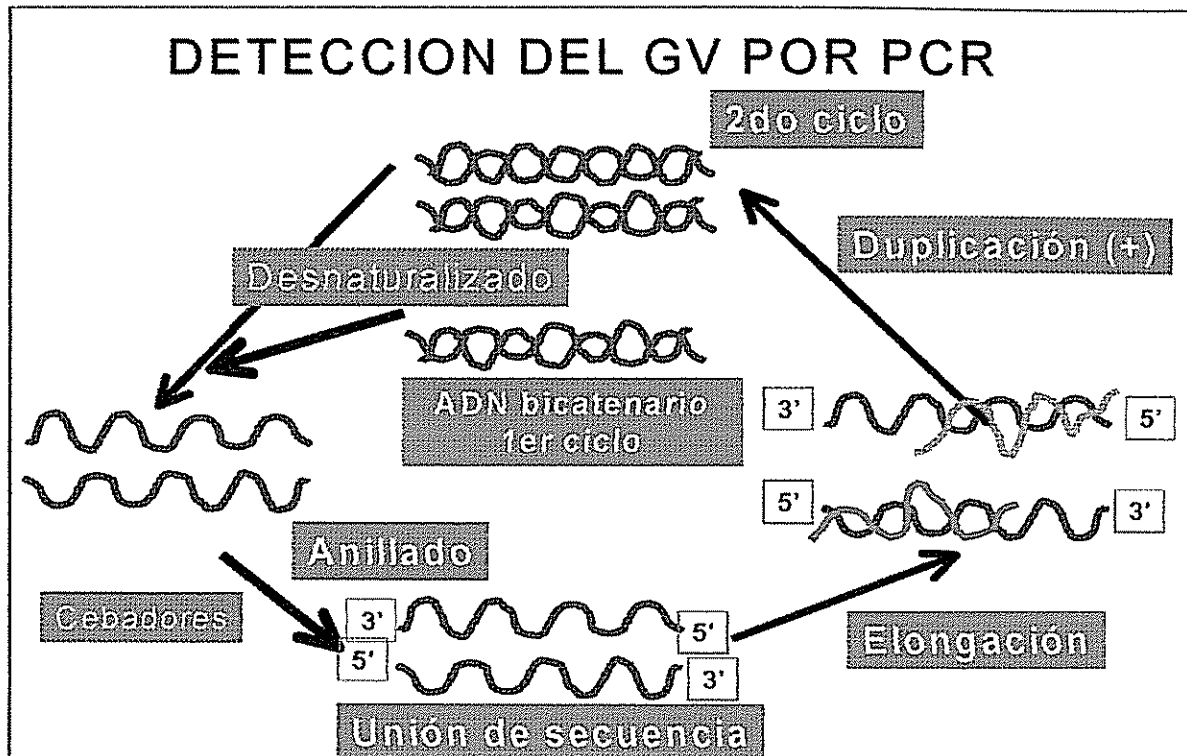


Figura 4. Etapas ocurridas en la prueba de PCR usada para identificar geminivirus.

## 5.12. Variables de respuesta y análisis estadísticos

### 5.12.1. Altura

La variable altura se midió a intervalos de 7 días, desde la base hasta la yema apical; con una cinta métrica graduada en centímetros.

### 5.12.2. Severidad

La búsqueda de síntomas visibles de la virosis se inició a los 15 días después de la inoculación con el geminivirus, las evaluaciones se hicieron cada 7 días y en horas de la tarde para observar mejor los síntomas. La escala utilizada para esta medición la cual se mencionó anteriormente (Rom *et al.* 1993), es de tipo cualitativo ya que describe los síntomas (pag. 26-27) asignando un número del 1-5.

### 5.12.3. Producción de biomasa

Para medir la biomasa se tomó el peso fresco en gramos de cada una de las plantas al momento de la cosecha, luego se depositaron en bolsas de papel y se sometieron a una temperatura de 70 °C durante cuatro días, se pesaron de nuevo para obtener el peso seco.

### 5.12.4. Diseño experimental

Se estableció un diseño completamente al azar (DCA) con 12 tratamientos y 5 repeticiones por tratamiento, para cada una de las dos variedades de tomate. La unidad experimental está constituida por cada una de las maceteras y la unidad de muestreo por cada una de las plantas.

### 5.12.5. Tratamientos

Se evaluaron 12 tratamientos para cada una de las dos variedades de tomate con 5 repeticiones, para un total de 120 unidades experimentales (maceteros con las plantas). Los tratamientos fueron los siguientes:

T1 = *Bacillus cereus*

T2 = *Pseudomonas cepacia*

T3 = MG4 (*Bacillus* sp )

T4 = MG10 (*P. fluorescens*)

T5 = MG15 (*Pseudomonas* sp )

T6 = Compost

T7 = Bocashi

T8 = T1+ T2 + T3 + T4 +T5 (sinergismo)

T9 = T8 + T6

T10 = T8 + T7

T11 = Plantas + geminivirus (testigo relativo)

T12 = Plantas + suelo estéril (testigo absoluto)

### 5.12.6. Modelo estadístico

$$X_{ij} = A + B_i + E_{ij}$$

donde:

$X_{ij}$  = Variable aleatoria observable.

A = Media general

$B_i$  = Efecto del i-esimo tratamiento

$E_{ij}$  = Error o desviación residual

i = tratamientos

j = repeticiones

### 5.12.7. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos en el experimento de las variables: altura, severidad, peso fresco y seco de las plantas se realizaron análisis de varianza y las medias de los tratamientos fueron separadas de acuerdo a la prueba de Tukey, utilizando el paquete estadístico SAS. El análisis de regresión se realizó entre las variables severidad (x) y peso seco (y) (Biomasa) para poder ver el comportamiento de los tratamientos en las variedades de tomate evaluadas: Hayslip y 8429.

A las ecuaciones de regresión cuadrática se les calculó la primera derivada, para obtener el valor de "x" el cual indica a que porcentaje de severidad la planta alcanza la mayor producción de peso seco ( $Y_{max}$ ). También se incluyen los valores del  $R^2$  para ver el ajuste de la ecuación a los datos (Cuadro 6 y 7).

Para evaluar la severidad de la enfermedad se utilizó el parámetro de Area bajo la curva del progreso de la enfermedad (ABCPE) (Rivas Platero, 1996), cuya fórmula es la siguiente:

$$ABCPE = \sum (y_i + y_{i+1}) / 2 \times dt_i$$

donde:

$y_i$  = severidad (proporción de la enfermedad) en la i-esima observación

$t_i$  = tiempo en días después de la inoculación en la i-esima observación

$\Sigma$  = sumatoria de n observaciones.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Recolección de muestras y aislamiento de rizobacterias

Las muestras se recolectaron en Grecia y Guayabo por ser zonas donde se cultiva tomate en gran escala en Costa Rica. Después de aplicar la técnica de aislamiento descrita en materiales y métodos numeral 3.3.2 se lograron purificar 42 rizobacterias a las cuales se les hicieron análisis bioquímicos y térmicos para su identificación (Anexo 4).

### 6.4. Pruebas bioquímicas y térmicas para la identificación

La primera prueba que se practicó a las rizobacterias fue la de KOH para clasificarlas en dos grupos las gram positivas y negativas; de las 42 rizobacterias aisladas 19 resultaron ser gram positivas y 23 gram negativas.

Según Buchanan y Gibbons (1974) las bacterias del género *Pseudomonas* son gram negativo, mientras que las del género *Bacillus* son gram positivo; estos dos grupos se consideran como los taxones más frecuentes de la comunidad de rizobacterias en diferentes cultivos (Lievens *et al.* 1989).

La prueba térmica para identificación de *Bacillus* mostró que este género de bacterias forma esporas resistentes al calor (Buchanan y Gibbons 1974), al practicar esta prueba a todas las bacterias las 19 rizobacterias gram positivas (*Bacillus*) crecieron de nuevo después de ser sometidas a 80 °C por 10 minutos en baño de María; mientras que las gram negativas no crecieron en el medio después de ser sometidas a calor.

Las pruebas de catalasa y oxidasa se practicaron a las 42 rizobacterias, la prueba de catalasa es siempre positiva para *Pseudomonas* y usualmente positiva en *Bacillus* (Buchanan y Gibbons 1974, Schaad 1988, Saddler *et al.* 1991).

Todas las 42 rizobacterias resultaron ser catalasa positiva. La prueba de oxidasa es usualmente positiva en *Pseudomonas* y *Bacillus* (Buchanan y Gibbons 1974, Schaad 1988, Saddler *et al.* 1991). En los resultados se encontraron 30 rizobacterias oxidasa positiva y 12 con oxidasa negativa.

Para la prueba de crecimiento anaeróbico solo siete de las 42 rizobacterias resultaron positivas, en tres de ellas la reacción se dio a las 24 horas: MG8, MG18, MG42. Mientras que en las otras cuatro la reacción ocurrió a las 48 horas: MG19, MG22, MG32, MG33. Según Saddler (1991), Buchanan y Gibbons (1974) las bacterias del género *Pseudomonas* son estrictamente aeróbicas; mientras que las del género *Bacillus* pueden ser aeróbicas o anaeróbicas facultativas.

La prueba de fluorescencia se aplicó a todas las rizobacterias del tipo *Pseudomonas*, pero solo dos de ellas mostraron fluorescencia en el medio B-de King: MG9 y MG10. La última mostró mejor fluorescencia al exponerla a luz ultravioleta.

La caracterización de la forma de crecimiento, el tipo de borde, color y elevación ayudan mucho al momento de describir e identificar bacterias, en los aislamientos la mayoría fueron blancos, sobre todo las gram positivas, mientras que las gram negativas cremosas, a excepción de las dos fluorescentes que fueron amarillas. Las características que más variaron fueron la forma de crecimiento y el tipo de borde (Anexo 4).

Tres de las rizobacterias se utilizaron en el experimento como posibles inductoras de resistencia o promotoras del crecimiento en plantas de tomate inoculadas con geminivirus: MG4, MG10 y MG15 (Cuadro 1). La MG4 presentó la prueba de KOH como gram positiva, creció en AN después de la prueba térmica, también resultó ser catalasa y oxidasa positiva, negativa en la prueba de crecimiento anaeróbico y de fluorescencia. Esta rizobacteria es peculiar pues es la única que presentó un tipo de crecimiento rizoide.

Las otras dos rizobacterias seleccionadas se clasificaron como *Pseudomonas* por ser gram negativas en la prueba de KOH, además éstas no crecieron después de la prueba térmica. La MG10 fue la que presentó fluorescencia en el medio B-de King, oxidasa y crecimiento anaeróbico negativo, su crecimiento fue en forma circular y de color amarillo.

La MG15 es del tipo catalasa y oxidasa positivo, crecimiento anaeróbico y de fluorescencia negativa, esta rizobacteria fue muy frecuente encontrarla en casi todas las muestras aisladas su crecimiento es de tipo irregular, blanco y su borde dentado.

**Cuadro 1. Características bioquímicas y morfológicas de las tres rizobacterias aisladas y utilizadas en el experimento CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1998.**

Bacteria	Gram	Catalasa	Oxidasa	C Anaeróbio	F/B-de King	Forma	Borde
MG4	+	+	+	-	-	Rizóide	Filamentoso
MG10	-	+	-	-	+	Circular	Entero
MG15	-	+	+	-	-	Irregular	Dentado

Con la ayuda de estas características se pudo clasificar a las tres rizobacterias aisladas como: MG4= *Bacillus* sp, MG10= *Pseudomonas fluorescens* y MG15= *Pseudomonas* sp; las que fueron evaluadas en el experimento.

Las otras dos rizobacterias que se utilizaron fueron: *Bacillus cereus* (A-30) y *Pseudomonas cepacia*. Ambas pertenecientes a la colección del laboratorio MIP-CATIE Y utilizadas previamente por Okumoto (1992), Rodríguez Osorno (1995), González *et al.* (1996) y Jiménez (1996). Ambas mostraron actividad en el control biológico.

### 6.3 Uso de enmiendas orgánicas

Los análisis químicos de los sustratos utilizados: suelo, sustrato 1 (suelo más compost) y sustrato 2 (suelo más bocashi) (Anexo 7) se utilizaron para realizar la interpretación, se usó el método de Olsen modificado, el cuál es el utilizado en los laboratorios de análisis de suelos del CATIE, en donde se practicaron dichos análisis. Mostraron que los valores del pH en agua con relación al nivel óptimo fueron: bajo para el suelo, óptimo para el sustrato 1 y alto para el sustrato 2. La acidez intercambiable fue óptima y el porcentaje de saturación de acidez baja en los tres sustratos, con relación al nivel óptimo.

La capacidad de intercambio de cationes efectiva (CICE) fue alta para el suelo, muy alta para el sustrato 1 y alta para el sustrato 2. La relación de bases estuvo bien para el suelo y el sustrato 1 a excepción de la relación Ca/Mg que se presentó baja en este último sustrato; el sustrato 2 presentó un valor bajo en la relación Mg/K y Ca+Mg/K (Cuadro 2).

De acuerdo al análisis de suelo: se presentó un pH de 5.1 un poco bajo con relación al nivel óptimo (5.5); sin embargo la acidez intercambiable fue óptima, el contenido de bases está muy cercana al óptimo. En cuanto a la relación de nutrientes (bases) todos los niveles están dentro del rango óptimo; en cuanto a elementos el único que presenta un nivel bajo es el calcio.

Se puede concluir que el índice de fertilidad de este suelo es aceptable y los problemas que presenta son la acidez y el calcio.

En el análisis del sustrato 1 (suelo + compost) se presentó un pH óptimo. Con un nivel de acidez intercambiable bajo, por lo cual no presenta problemas de acidez. Esto se debe probablemente a la influencia de la materia orgánica.

Como la suma de bases fue superior (11.59) al óptimo (5); el % de saturación de acidez es ínfimo. La CICE resultó alta y no presentó deficiencia en los nutrientes esenciales a excepción de la relación de bases Ca/Mg que se encontró muy cercana al nivel óptimo.

En comparación al suelo este sustrato mejoró el pH, la suma de bases y la relación Ca/Mg, y únicamente disminuyó el nivel de calcio como elemento, pero en una cantidad muy poca con relación al óptimo. Según Bertsch (1995) la absorción de Ca y Mg por las plantas no es muy alta, tampoco es esperable que lo sea el aporte de los mismos a partir de la materia orgánica.

El sustrato 2 (suelo + bocashi) aumentó el pH de 5.1 en el suelo a 5.9; probablemente porque en la elaboración del bocashi se empleó cal; esto se comprueba con el bajo nivel de acidez intercambiable (Bertsch 1995). La suma de bases y la CICE resultaron superior al óptimo, el % de saturación de acidez fue bajo al igual que la relación Mg/K y Ca+Mg/K ésta última se acercó mucho al nivel óptimo (10), y presentó valores altos de Ca, K y Mg.

Con la cantidad de materia orgánica presente en estos dos últimos sustratos se podría suponer un adecuado suplemento de N y S que pasan a formar parte de la solución del suelo (Bertsch 1995).



**Cuadro 2. Análisis de suelo y sustratos utilizados en el experimento, determinado mediante Olsen modificado (pH 8.5 y KCl 1N, para fertilidad). Los niveles se clasificaron como: Optimo (O), Alto (A), Bajo (b), Muy bajo (Mb), Bien (B), Mal (m). CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1998.**

<b>FACTOR</b>	<b>SUELO</b>	<b>SUSTRATO 1</b>	<b>SUSTRATO 2</b>	<b>NIVEL OPTIMO</b>
pH/agua	5.1 (Mb)	5.5 (O)	5.9 (A)	<b>5.5</b>
Acidez	0.5 (O)	0.24 (O)	0.21 (O)	<b>0.5</b>
Bases	4.75 (b)	11.59 (Ma)	6.67 (A)	<b>5</b>
CICE	5.25 (A)	11.38 (Ma)	6.88 (A)	<b>5</b>
% sat. Acidez	9.52 (m)	2.03 (m)	3.05 (m)	<b>10</b>
Ca/Mg	2.9 (B)	1.96 (b)	3.10 (B)	<b>2-5</b>
Mg/K	4.26 (B)	4.68 (B)	2.12 (b)	<b>2.5-15</b>
Ca+Mg/K	16.59 (B)	13.86 (B)	8.67 (b)	<b>10-40</b>
Ca/K	12.33 (B)	9.18 (B)	6.55 (B)	<b>5-25</b>
K (cmol(+)/l.)	0.27 (A)	0.78 (A)	0.69 (A)	<b>0.2</b>
Ca (cmol(+)/l.)	3.33 (b)	7.16 (A)	4.52 (A)	<b>4</b>
Mg (cmol(+)/l.)	1.15 (A)	3.65 (A)	1.46 (A)	<b>1</b>

## 6.4. Promoción del crecimiento de las plantas

Con el fin de observar el crecimiento de las plantas de acuerdo a los diferentes tratamientos en cada una de las variedades de tomate evaluadas, se tomaron lecturas semanales de la altura en centímetros desde los 30 días después de la germinación (ddg) hasta los 79 ddg.

### 6.4.1. Altura

Para esta variable se encontraron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre tratamientos para las dos variedades de tomate (Cuadro 3)

El testigo absoluto (T12) presentó la mayor altura promedio al final de las 9 semanas (Anexo 9), tanto para Hayslip (167.4 cm) como para 8429 (174.2 cm). El T12 permaneció en el invernadero (libre de geminivirus) en condiciones favorables para el crecimiento como temperatura (media 24.4 °C, máxima 28.9 °C y mínima 21.2 °C) y radiación fotosintética activa RAFA (Anexo 10) y con menor estrés por ataque de patógenos, en comparación a las condiciones de campo bajo las cuales estuvieron los demás tratamientos. Por lo cual este testigo se usó como referencia. Los tratamientos se compararon con el testigo relativo T11 (plantas con geminivirus) para tener una relación real, ya que se encontraron bajo las mismas condiciones ambientales.

El T9 (compost + las rizobacterias) presentó mayor altura promedio para las dos variedades de tomate. La variedad Hayslip presentó una altura de 90.6 cm y en la variedad 8429 de 113.8 cm. Esta diferencia de altura entre variedades se debió probablemente al hábito de crecimiento. La variedad Hayslip es de crecimiento determinado, mientras que 8429 es de crecimiento indeterminado.

Además del tratamiento con compost + las rizobacterias, otros tratamientos que alcanzaron alturas mayores al testigo (T11) son: bocashi + las rizobacterias, compost y bocashi para las dos variedades de tomate evaluadas (Fig. 5 y 6).

El testigo (T11) en la variedad 8429 alcanzó menor altura promedio al final de la evaluación (58.7 cm) que en la variedad Hayslip, en la cual alcanzó una altura de 65.6 cm; presentando tratamientos con menor altura como: *Bacillus cereus*, *Pseudomonas cepacia*, *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp. En la variedad 8429 después del testigo, los tratamientos con menor altura fueron: la mezcla de rizobacterias y el tratamiento con *Bacillus* sp. (Cuadro 3). El tratamiento con

*Bacillus* sp. (T3), seleccionado de un aislamiento de Grecia, se comportó en ambas variedades de tomate como un microorganismo que no aportó al crecimiento de la planta y su efecto se puede considerar como negativo. Los tratamientos con cepas bacteriales en forma aislada o en mezcla, fueron similares o inferiores en altura al testigo (T11); sin embargo, cuando las cepas se agregaron al compost o al bocashi el incremento en altura fue significativo en relación con las enmiendas orgánicas sin estos microorganismos.

A la semana después de la germinación se pudo apreciar la gran diferencia de crecimiento entre los tratamientos que tenían enmienda orgánica (compost ó bocashi) con los tratamientos que solo tenían el efecto de las rizobacterias (T1-T5) en ambas variedades. En éstos primeros cinco tratamientos se presentaron problemas de bacteriosis (*Xanthomonas*) a los 10 ddd y deficiencias nutricionales; por lo cual se aplicó Kilol (bactericida y fungicida) y nitrato de calcio. A los 15 días después del manejo las plantas lograron recuperarse, pero ninguna de ellas alcanzó la altura de los demás tratamientos.

**Cuadro 3. Valores promedio de altura en plantas de tomate variedad Hayslip y 8429 según tratamientos. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.**

Tratamientos	Hayslip/Altura cm	8429/Altura cm
T1= <i>B. cereus</i>	61.7 f <sup>1</sup>	62.6 ef <sup>1</sup>
T2= <i>P. cepacia</i>	63.5 ef	67.9 d
T3= <i>Bacillus</i> sp.	56.2 g	58.1 fg
T4= <i>P. fluorescens</i>	67.6 d	67.9 d
T5= <i>Pseudomonas</i> sp.	63.5 ef	66.6 de
T6= Compost	83.7 b	91.6 b
T7= Bocashi	81.8 b	79.4 c
T8=T1+T2+T3+T4+T5	61.5 f	56.9 g
T9= Compost + T8	90.7 a	113.8 a
T10= Bocashi + T8	77.7 c	92.4 b
T11= Testigo relativo	65.5 de	58.7 fg

<sup>1</sup> Medias con letras iguales no difieren significativamente entre sí por la prueba de Tukey (P≤0.05)

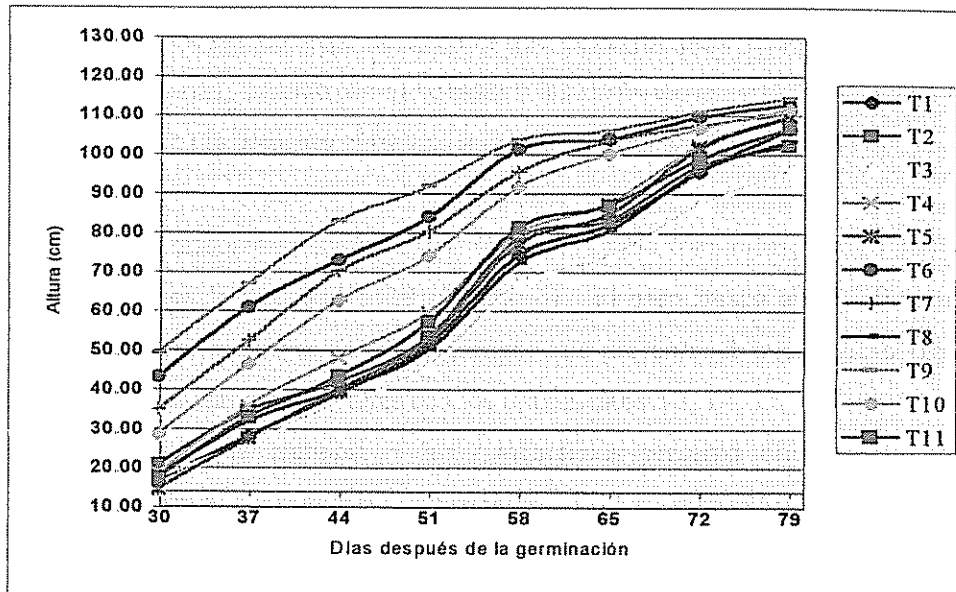


Figura 5. Altura promedio según tratamientos en plantas de tomate de la variedad Hayslip. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.

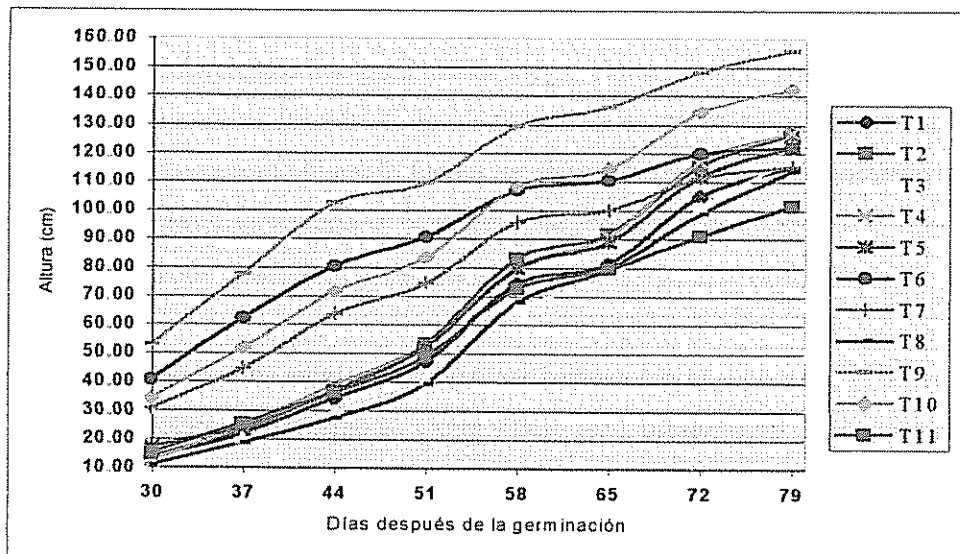


Figura 6. Altura promedio según tratamientos en plantas de tomate de la variedad 8429. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.

## B) Producción de biomasa

En la variedad Hayslip no se encontraron diferencias significativas en el peso fresco, ni en el peso seco (Cuadro 4); sin embargo se observa que el mayor peso fresco y seco lo presentó el compost + las rizobacterias, seguido por el bocashi + las rizobacterias y el bocashi solo (Fig. 7). El menor peso fresco y seco lo presentó el tratamiento con *Pseudomonas cepacia* (T2).

Se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre tratamientos tanto para peso fresco como para peso seco en la variedad 8429 (Cuadro 4). El peso fresco en el T9 (compost + las rizobacterias) fue mayor y difiere del T11 (testigo) que presentó el menor peso fresco. El T9 también presentó diferencias significativas con los tratamientos T3, T4, T6 y T7.

En el peso seco el compost + las rizobacterias presentó diferencias con todos los tratamientos excepto con el bocashi + las rizobacterias. El peso seco del tratamiento con bocashi + las rizobacterias difirió únicamente del peso seco del testigo (T11). (Cuadro 4, Fig 8). El tratamiento con *P. cepacia* presentó un peso seco que no difiere de éste último. Lo cual indica que independientemente del hábito de crecimiento de la variedad 8429, *Pseudomonas cepacia* podría ser promotora del crecimiento en plantas de resistencia intermedia.

Los mismos tratamientos que presentaron mayor altura presentaron también el mayor peso fresco y seco promedio en las dos variedades de tomate. Los tratamientos que presentaron menor crecimiento tanto en altura como biomasa fueron los tratamientos con las rizobacterias solas y en la mezcla (T8). Manteniéndose siempre el compost + las rizobacterias y bocashi + las rizobacterias como los tratamientos que alcanzaron un mayor crecimiento en las dos variables.

En estudios previos con enmiendas orgánicas como compost y bocashi, se observa que estos promueven un crecimiento rápido tanto en altura y peso seco, presentando diferencias significativas en comparación con los testigos (Hernández 1997 y Jiménez 1996).

Jiménez (1996) menciona que los tratamientos "bocashi" y "bocashi + *B. cereus*" mostraron mayor altura, mayor diámetro y mayor peso seco, en comparación a los demás tratamientos.

Cuadro 4. Valores promedios de peso fresco y peso seco (g) según tratamientos en plantas de tomate variedad Hayslip y 8429. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.

Tratamientos	Hayslip		8429	
	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Peso fresco (g)	Peso seco (g)
T1= <i>B. cereus</i>	212.3 a	41.7 a	300.7 abc	47.6 bc
T2= <i>P. cepacia</i>	192.0 a	31.6 a	317.6 abc	52.2 bc
T3= <i>Bacillus</i> sp.	203.9 a	34.2 a	287.2 bc	47.9 bc
T4= <i>P. fluorescens</i>	197.6 a	32.5 a	272.8 bc	45.2 bc
T5= <i>Pseudomonas</i> sp.	253.3 a	39.7 a	317.7 abc	54.0 bc
T6= Compost	263.9 a	43.4 a	263.9 bc	40.5 bc
T7= Bocashi	276.0 a	45.7 a	297.8 bc	51.4 bc
T8=T1+T2+T3+T4+T5	205.9 a	37.1 a	320.2 abc	52.4 bc
T9= Compost + T8	287.7 a	54.8 a	451.9 a	84.7 a
T10= Bocashi + T8	283.6 a	51.6 a	383.9 ab	65.7 ab
T11= Testigo relativo	263.9 a	46.5 a	203.2 c	37.3 c

<sup>1</sup> Medias con letras iguales no difieren significativamente entre sí por la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ )

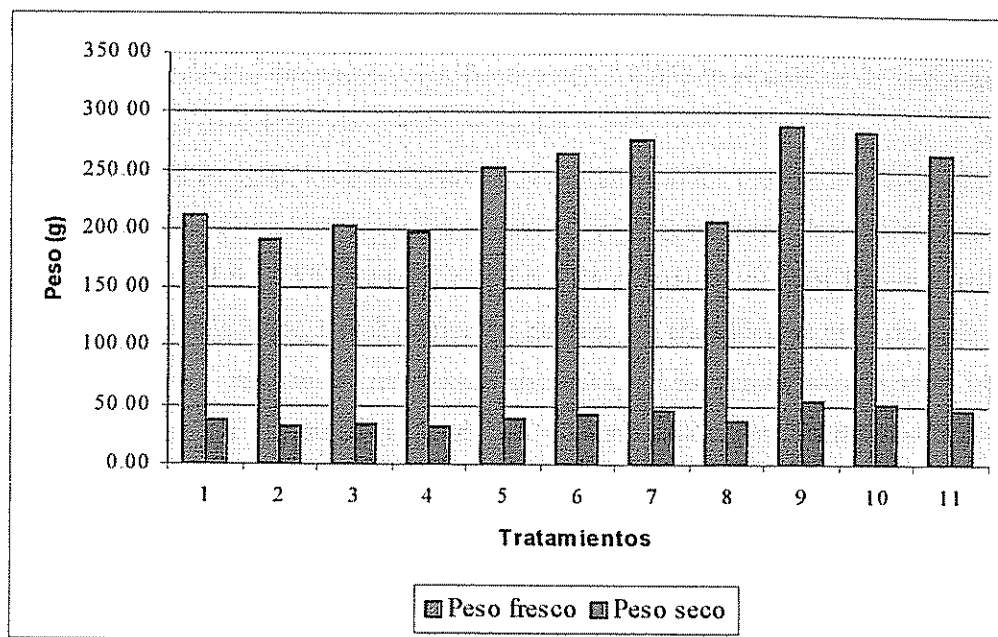


Figura 7. Promedios de peso fresco y peso seco (g) según tratamientos en plantas de tomate variedad Hayslip. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.

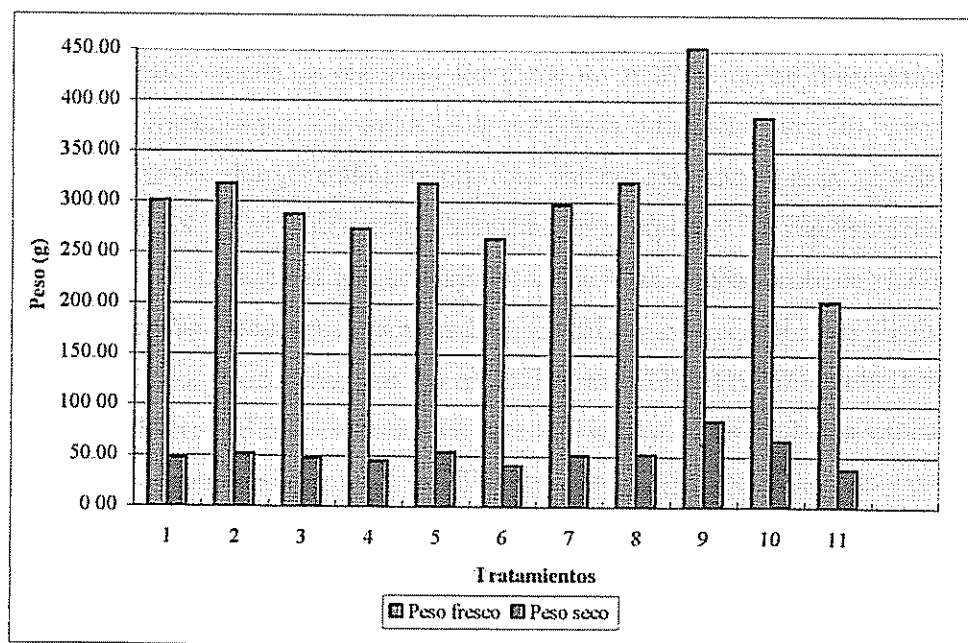


Figura 8. Promedios de Peso fresco y Peso seco (g) según tratamientos en plantas de tomate de la variedad 8429. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.

#### 6.4. Severidad

Esta variable mostró diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ ) en el análisis de varianza entre los tratamientos en las dos variedades de tomate evaluadas

En la variedad Hayslip, los tratamientos que presentaron los índices más bajos de severidad al final de la evaluación (39 ddi) fueron: **T6** (compost) y **T9** (compost + las rizobacterias) con una severidad promedio de 1.5, y **T7** (bocashi) con 1.6. En el análisis de ABCPE estos tratamientos mostraron los valores más bajos, lo que demuestra que son los tratamientos que responden mejor al ataque del geminivirus, mostrando resistencia sistémica. Los demás tratamientos presentaron severidades más altas que el testigo (T11) el cuál presentó una severidad promedio de 1.6 y un ABCPE de 43.1 (Cuadro 5 y fig 9).

En la variedad 8429, la cual es una variedad de resistencia intermedia al geminivirus (CATIE 1998) se presentaron índices de severidad más bajos que en la variedad Hayslip, susceptible al geminivirus. En ambos análisis el **compost + las rizobacterias** presenta los valores menores: **0.9** de severidad y **23.1** de ABCPE. Los tratamientos que presentaron valores de severidad menores al testigo fueron *Bacillus cereus*, *Pseudomonas cepacia*, mezcla de rizobacterias y bocashi + las rizobacterias. Los tratamientos restantes presentaron mayor severidad que el testigo (Cuadro 5 y Fig 10).

En el cuadro 5 donde se observan los datos de ABCPE no se presentaron diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo es notable la diferencia entre los valores de las dos variedades evaluadas Hayslip generalmente presentó valores más altos que la variedad 8429. Los tratamientos T1, T2, T9 y T10 lo muestran claramente; el **compost + las rizobacterias** presentó un ABCPE en 8429 de **23.1**, mientras que en Hayslip fue de **42.6**; similarmente en el *Bacillus cereus* es **33.1** vrs. **60.8**; en *Pseudomonas cepacia* es **29.1** vrs. **51.5** y en **bocashi + las rizobacterias** **28.7** vrs. **51**. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en CATIE (1998), donde la variedad 8429 presentó un ABCPE promedio de 20, mientras que en Hayslip es de 46.7 una variedad calificada como de las más susceptible al geminivirus. Sin embargo los testigos de las dos variedades tienen un ABCPE similar, lo cual indica el efecto de otros factores diferentes al virus.

Las últimas evaluaciones de los síntomas de severidad fueron difíciles de cuantificar debido que las plantas presentaban lesiones foliares causadas por otros patógenos. En la medición de esta variable pudo influir además los cambios bruscos del clima que se presentaron durante el desarrollo del experimento, las lluvias fuertes volcaban algunos maceteros, predisponiendo las plantas al



desarrollo de amarillamientos, lo cual no daba el nivel de confianza para separar los efectos del virus de aquellos climáticos o patológicos.

**Cuadro 5. Valores del área bajo la curva del progreso de la enfermedad en plantas inoculadas con geminivirus en respuesta al uso de rizobacterias y enmiendas orgánicas para dos variedades de tomate: Hayslip y 8429. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.**

Tratamientos	Hayslip	8429
T1= <i>B. cereus</i>	60.8 a <sup>1</sup>	33.1 ab <sup>1</sup>
T2= <i>P. cepacia</i>	51.5 a	29.1 ab
T3= <i>Bacillus</i> sp.	58.3 a	46.0 a
T4= <i>P. fluorescens</i>	48.6 a	52.0 a
T5= <i>Pseudomonas</i> sp.	54.2 a	51.3 a
T6= Compost	40.7 a	51.3 a
T7= Bocashi	44.1 a	47.4 a
T8=T1+T2+T3+T4+T5	59.5 a	42.0 a
T9= Compost + T8	42.6 a	23.1 ab
T10= Bocashi + T8	51.0 a	28.7 ab
T11= Testigo relativo	43.1 a	43.7 a

<sup>1</sup>Medias con letras iguales no difieren significativamente entre sí por la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Las rizobacterias *B. cereus* y *P. cepacia* en la variedad 8429 presentaron valores de ABCPE bajos 33.1 y 29.1 respectivamente. En la variedad Hayslip se presentaron valores más altos que el testigo (T11). Por lo que se supone que éstas dos rizobacterias actúan como inductoras de resistencia sistémica en plantas que presentan algún factor de resistencia intermedia al geminivirus.

En la variedad Hayslip el tratamiento que menor severidad presentó en comparación al testigo (T11) fue el compost (T6), además del compost + las rizobacterias que siempre presentó el valor de ABCPE más bajo en ambas variedades.

El tratamiento con la mezcla de las 5 rizobacterias (T8) no presentó valores más bajos que el testigo en las dos variedades evaluadas. Sin embargo en unión con el compost (T9) en la variedad 8429 disminuyó el ABCPE en casi el doble, que la presentada por el compost solo (T6), se presume que hay un efecto sinérgico de las rizobacterias en presencia de esta enmienda en la variedad de resistencia intermedia, pero no en la susceptible (Hayslip); en donde se incrementó el ABCPE del compost + las rizobacterias, en comparación al T6 (compost).

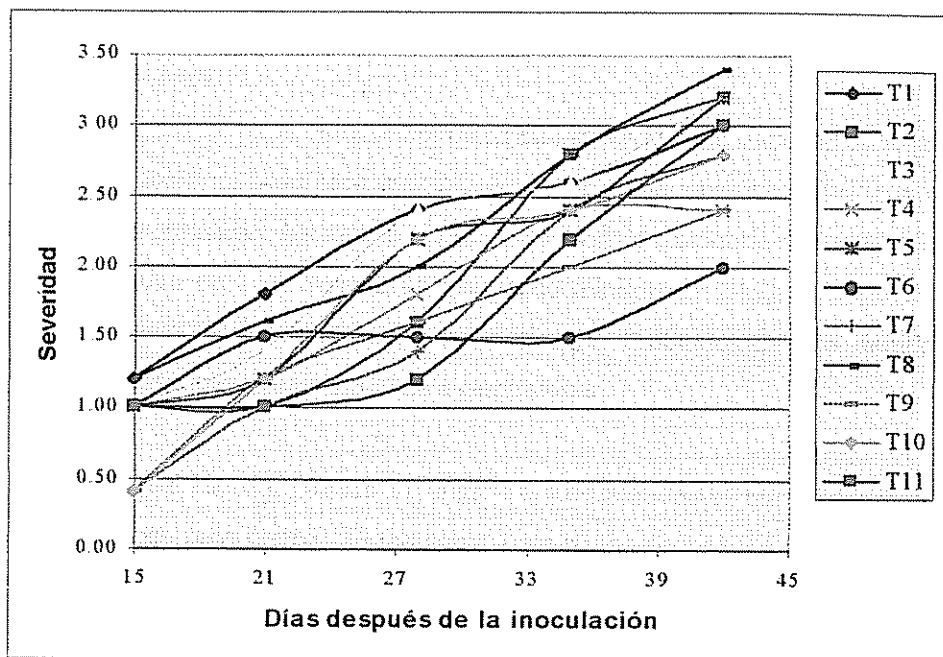


Figura 9. Índice de severidad promedio según tratamientos en plantas de tomate variedad Hayslip. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.

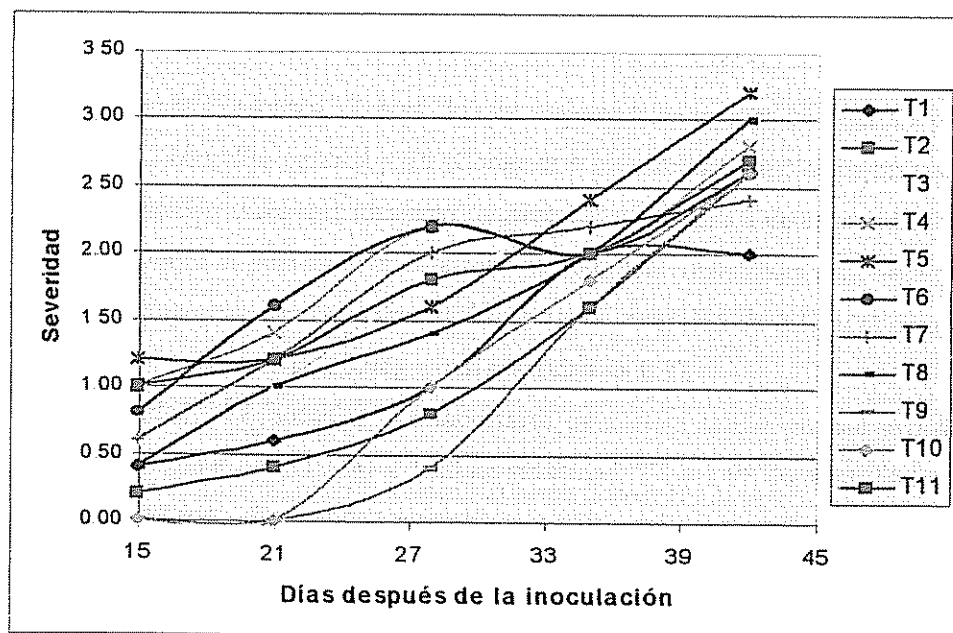


Figura 10. Índice de severidad promedio según tratamientos en plantas de tomate variedad 8429. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.

### 6.5. Análisis de regresión entre peso seco y severidad.

El análisis de regresión se realizó entre las variables severidad (x) y peso seco (y) (biomasa) para poder ver el comportamiento de cada uno de los tratamientos en las variedades de tomate evaluadas: Hayslip y 8429.

Los tratamientos tuvieron comportamientos diferentes en cada variedad de tomate, el testigo T11 en Hayslip presentó un peso seco máximo de 52.3g a una severidad de 1.7, a partir de este punto al aumentar la severidad disminuirá el peso. En 8429 la tendencia del testigo fue diferente a partir de una severidad de 1.25 alcanza un peso seco mínimo de 24.2g y luego al aumentar la severidad el peso seco también aumentara en el tiempo. Probablemente es debido a que esta variedad presenta ciertos genes de resistencia a geminivirus.

Para la variedad Hayslip (Anexo 11, Figs. 11) los tratamientos que respondieron mejor a la relación severidad-peso seco fueron: T9 (compost + las rizobacterias), T4 (*P. fluorescens*) y T8 (la mezcla de las 5 rizobacterias) en los cuales a una severidad de 1.59, 1.89 y 2.41 respectivamente, se alcanzó un peso seco máximo de 67.95, 41.52 y 54.94. Sin embargo, a partir de este punto al aumentar la severidad disminuirá el peso seco. El T6 (Compost) presentó una ecuación lineal en la cual al aumentar la severidad el peso seco tiende a aumentar. Los otros tratamientos de esta variedad (T1, T2, T3, T5, T7 y T10) se comportaron de manera similar, al aumentar la severidad disminuyeron el peso seco; lo cual era el comportamiento esperado.

Para la variedad 8429 (Anexo 12, Figs. 11) los mejores tratamientos en cuanto a producción de peso seco fueron: T1 (*Bacillus cereus*) y T9 (Compost + las rizobacterias) estos presentaron una ecuación cuadrática negativa o sea que alcanzan un peso seco máximo a determinada severidad y luego, a partir de ese punto al aumentar la severidad el peso seco disminuye. El tratamiento con *Bacillus cereus* alcanzó un peso seco máximo de 69.4g a una severidad de 1.13 y el compost + las rizobacterias un peso seco máximo de 90.08g a una severidad de 0.92.

El T2 (*P. cepacia*) y T7 (bocashi) se comportaron de manera similar en esta variedad, el T2 alcanzó un peso seco mínimo de (51.31g) a 1.26 de severidad, T7 a 1.98 de severidad alcanzó un peso seco mínimo de 49.54g. En ambos tratamientos a partir del punto mínimo en peso seco, al aumentar la severidad también logran aumentar su peso seco. Los otros tratamientos de esta variedad (T3, T4, T5, T6, T8 y T10) al aumentar la severidad disminuyen el peso seco.

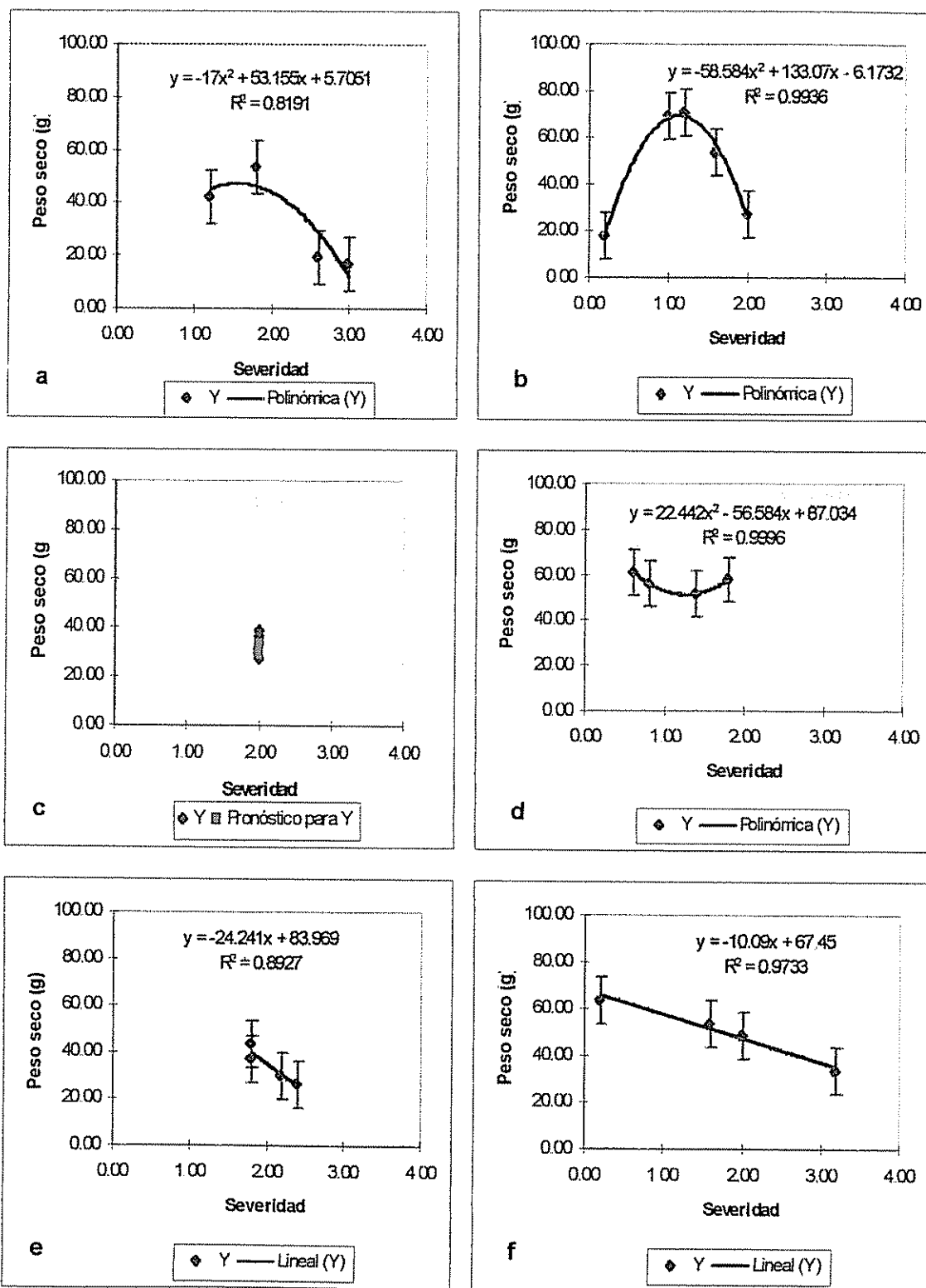


Figura 11A. Gráficas de regresión entre peso seco (Y) y severidad (X) en plantas de tomate variedad Hayslip y 8429 respectivamente: (a, b) T1, (c, d) T2 y (e, f) T3.

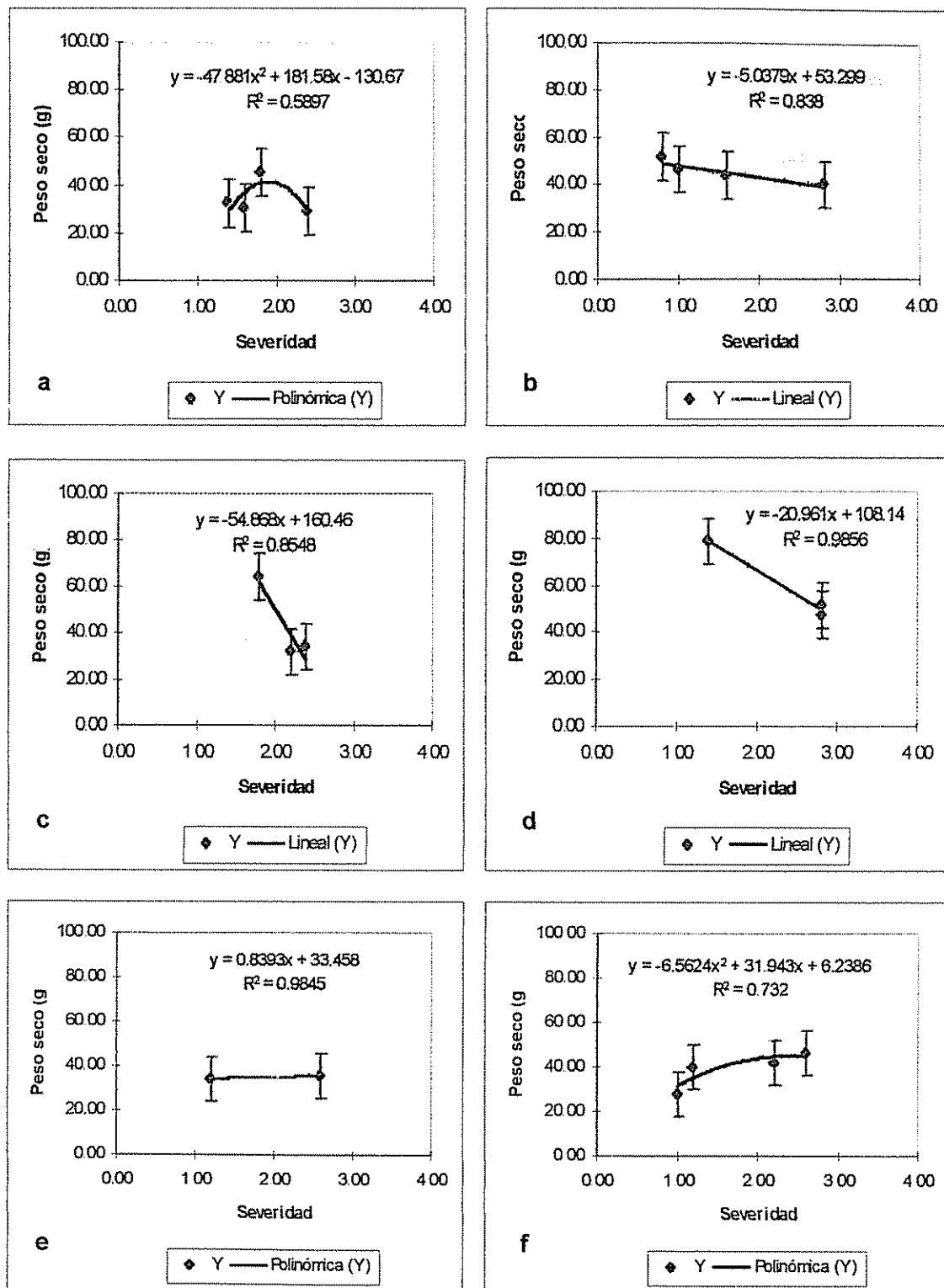


Figura 11B. Gráficas de regresión entre peso seco (Y) y severidad (X) en plantas de tomate variedad Hayslip y 8429 respectivamente: (a, b) T4, (c, d) T5 y (e, f) T6.

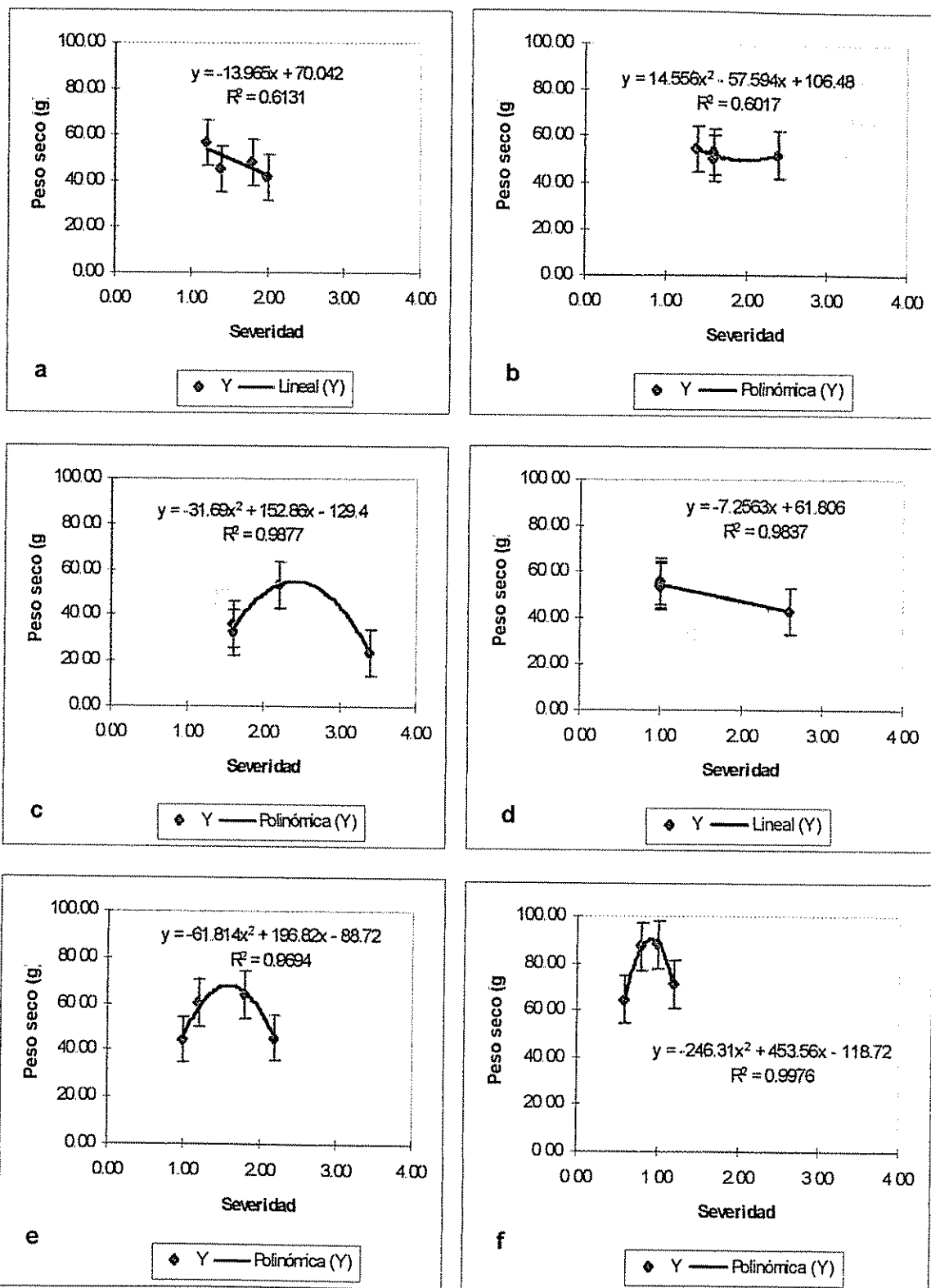


Figura 11C. Gráficas de regresión entre peso seco (Y) y severidad (X) en plantas de tomate variedad Hayslip y 8429 respectivamente: (a, b) T7, (c, d) T8 y (e, f) T9.

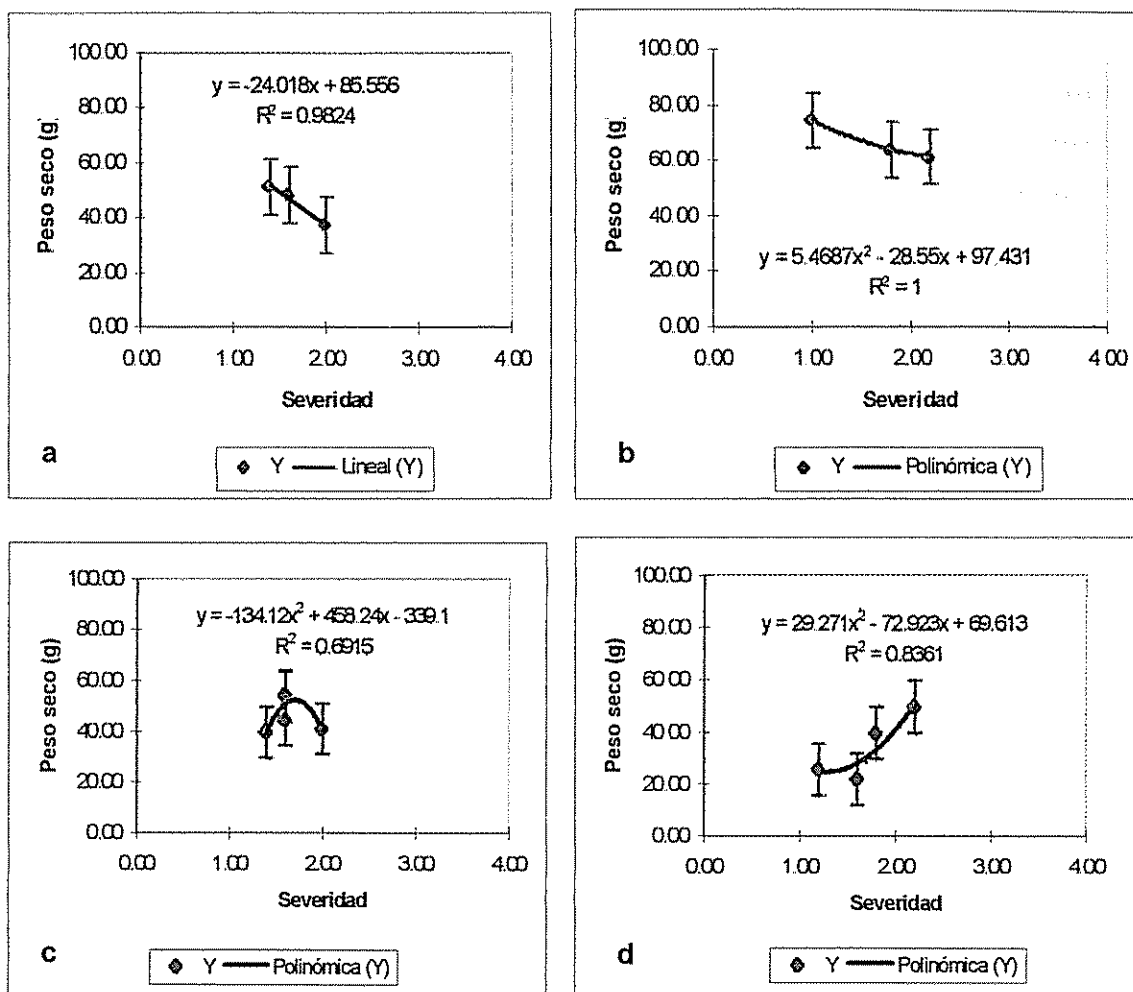


Figura 11D. Gráficas de regresión entre peso seco (Y) y severidad (X) en plantas de tomate variedad Hayslip y 8429 respectivamente: (a, b) T10 y (c, d) T11.

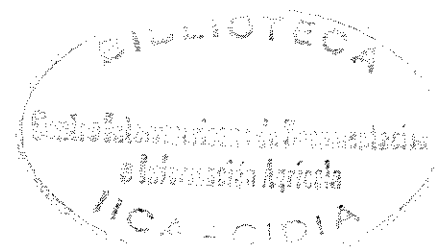
## 6.6. Detección del geminivirus por PCR

Los resultados de las muestras con la prueba del PCR fueron positivos. Con el análisis del PAUP se determinó que el geminivirus encontrado en las muestras de tomate en estudio está estrechamente relacionado con el geminivirus STLCV (Sinaloa tomato leaf curl virus); lo que confirma la presencia de geminivirus en el experimento

Estos resultados son coincidentes con los obtenidos por Idris y Brown (1998). El STLCV es un geminivirus reportado por primera vez en Sinaloa, México en 1989 infectando plantas de tomate y chile. Esto contrastó con lo esperado, pues se creía que los geminivirus presentes en las muestras estarían mayormente relacionados al ToYMV (Tomato Yellow mosaic virus), reportado en Costa Rica

Los síntomas del STLCV en plantas de tomate infectadas son: amarillamiento y deformación foliar, entrenudos cortos y coloración púrpura en la parte abaxial de la hoja. Este último síntoma es muy similar al asociado con la acumulación de antocianinas debido a deficiencias de fósforo.

La descripción de estos síntomas en plantas de tomate infectadas con el STLCV es muy similar a la observada en las plantas de tomate evaluadas en este experimento. Los resultados obtenidos hacen presumir de la existencia de geminivirus muy similares al virus descrito en Sinaloa; ya que la distancia genética encontrada para el virus presente en las muestras es cercana a este virus (Anexo 13).





## 7. CONCLUSIONES

1. El testigo absoluto T12 alcanzó la mayor altura en comparación con los demás tratamientos, por las condiciones óptimas dentro del invernadero, tanto de clima como de un ambiente libre de patógenos.
2. El compost y el bocashi mejoraron las condiciones de acidez, modificando el pH del suelo utilizado en el experimento
3. Las rizobacterias por sí solas o en mezcla no mostraron ser promotoras de crecimiento en las plantas, en las dos variedades de tomate.
4. Los tratamientos con compost y bocashi mas las rizobacterias (T9 y T10) resultaron ser los mayores promotores de crecimiento en las plantas de tomate (altura y biomasa) en las dos variedades evaluadas: Hayslip y 8429.
5. La inducción de resistencia sistémica en las plantas de la variedad Hayslip se dio con las enmiendas orgánicas (compost y bocashi) y el T9 (compost más la mezcla de las cinco rizobacterias). Para la variedad de resistencia intermedia 8429 de dio con el T9, T10 (enmiendas más la mezcla de las rizobacterias), T1 (*B. Cereus*), T2 (*P. cepacia*) y T8 (mezcla de las 5 rizobacterias).
6. El método de transmisión del geminivirus fue efectivo en todos los tratamientos.
7. Durante la época del experimento se presentaron factores ambientales y patológicos que se expresaron en las plantas con síntomas similares a los producidos por el virus, alterando la medición de severidad.

## 8. RECOMENDACIONES

1. Seleccionar otras rizobacterias con características de promoción de crecimiento en las plantas (PGPR).
2. Para la preparación de las enmiendas orgánicas compost y bocashi, se deben utilizar materiales disponibles en la zona de trabajo para contribuir con el reciclaje y disminuir los costos de producción.
3. Seleccionar el suelo a utilizar conociendo previamente sus características físicas y químicas para evitarse problemas de deficiencias en las plantas.
4. Realizar una prueba de detección del virus a las moscas blancas antes de inocular las plantas.
5. Llevar el experimento hasta etapa de fructificación para poder medir producción.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- AGARWAL, P.; NIEVES, C.; MATHUR, S. 1989. Seed-borne diseases and seed health testing of rice. Copenhagen, Denmark, CAB/CMI. Phytopatological Papers no 30, Tech. Bull 3. 106 p
- AGRIOS, G.N. 1988. Fitopatología. 5ª ed. Editorial Limusa, México. 756 p.
- ANTILLON, F.; GAMBOA, M.; MORA, J. Y RODRIGUEZ, E. 1981. Bacteriología diagnóstica: Tinciones, medios de cultivo, pruebas para identificación. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 113-150 p.
- ANTONIW, J.F.; RITTER, C.E.; PIERPOINT, W.S.; VAN LOON, L.C. 1980. Comparison of three pathogenesis-related proteins from plants of two cultivars of tobacco infected with TMV. *Journal of General Virology* 47:79-87.
- ANTONIW, J.F.; WHITE, R.F. 1986. Changes with time in the distribution of virus and Pr-protein around single local lesions of TMV infected tobacco. *Plant Molecular Biology* 6:145-149
- ARIAS, R.; HILJE, L. 1993. Uso del frijol como cultivo trampa y de un aceite agrícola para disminuir la incidencia de virosis transmitida por *Bemisia tabaci* (Gennadius) en el tomate. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 27:27-34
- BARDOS, R. 1992. Composting studies using separated fraction of urban waste from the byker reclamation plant, NewCastel, United Kingdom. *Acta Horticulturae* 302: 51-62
- BERTSCH, F. 1995. Fertilidad de los suelos y su manejo. San José, Costa. Rica. Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo. 157 p.
- BOL, J.F.; LINTHORST, H.J.; CORNELISSEN, B.J. 1990. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annual Review Phytopathology* 28:113-138
- BONILLA, F. 1993. Periodo de adquisición, latencia y transmisión de geminivirus en tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) en Costa Rica. Tesis Lic. Agron. UCR. Turrialba, Costa Rica. 89 p.

- BROWN, J.K. 1994. Current status of *Bemisia tabaci* as a plant pest and virus vector in agroecosystems worldwide. *FAO Plant Protection Bulletin* 42(1-2):3-32.
- BROWN, J.K. 1990. An update on the whitefly-transmitted geminiviruses in the Americas and the Caribbean Basin. *FAO Plant Protection Bulletin* 39(1):5-11.
- BUCHANNAN, R.; GIBBONS, E. 1974. *Bergey's manual for determinative bacteriology*. 8 ed Williams and Wilkins Co. Baltimore, USA. 1246 p.
- BUNTIN, G.D.; GILBERTZ, D.A.; OETTING, R.D. 1993. Chlorophyll loss and gas exchanges in tomato leaves after feeding injury by *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). *Journal Economic Entomology* 86(2):517-522.
- BUSTAMANTE, E. 1993. Diagnóstico de enfermedades bacteriales. Practica No. 5. Curso de Metodología de Diagnóstico de plagas. Escuela de posgrado, CATIE. 8 p.
- BYRNE, D.; BELLOWS, T.S. 1991. Whitefly biology. *Annual Rev. Entomology* 36:431-457.
- CASTRO MARTÍN, M.O.; RIVAS, G.G.; CHAVARRIA, A. 1988. Respuesta sintomática del ToYMV en tomate con diferentes niveles de sombra. (inédito).
- CATIE. 1990. Guía para el manejo integrado de plagas del cultivo del tomate. Turrialba, Costa Rica. CATIE, Serie Técnica. Informe Técnico No. 151. 138 p.
- CATIE. 1998. Informe final del proyecto frutas y vegetales tropicales. USDA-CATIE (en prensa).
- CHAMARRO LAPUERTA, J. 1995. Anatomía y fisiología de la planta. In *El cultivo del tomate*. Nuez F. ed. Ediciones Mundi-Prensa. España. p 45-91.
- COOK, R.J.; BAKER, K.F. 1983. The nature and practice of biological of plant pathogens. American Phytopathological Society. 589 p.

- CUBILLO, D ; CHACÓN, A.; HILJE, L. 1994. Producción de plántulas de tomate sin geminivirus transmitidos por la mosca blanca (*Bemisia tabaci*). Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 34:23-27.
- COLEMAN, E. 1995. Compost in The New Organic Grower. White River Junction, Vermont, USA. Chelsea Greer. 340 pp.
- DALZELL, H.W.; BIDDLESTONE, A.J.; GRAY, K.; THURAIRAJAN, K. 1991. Manejo del suelo: Producción y uso del compost en ambientes tropicales y sub - tropicales. Boletín de Suelos de la FAO 56. Roma Italia. 178 pp.
- DRY, Y.B.; RIGDEN, J.E.; KRAKE, L.R.; MULLINEAUX, P.M.; REZAIAN, M.A. 1993. Nucleotide sequence and genome organization of tomato leaf curl geminivirus. Journal of General Virology 74:147-151.
- GAJDOS, R. 1992. The use of organic waste materials as organic fertilizers-recycling of plant nutrients. Acta Horticulturae 302:325-331.
- GILL, R.J. 1990. Whiteflies: Their bionomics, pest status and management. D. Gerling. New Castle, UK. Atheneum. 348 pp.
- GILBERTSON, R.L.; ROJAS, M.R.; RUSSELL, D.R.; MAXWELL, D.P. 1991. Use of the asymmetric polymerase chain reaction and DNA sequencing to determine genetic variability of bean golden mosaic geminivirus in the Dominican Republic. Journal of General Virology 72:2843-2848.
- GONZÁLEZ, R.; BUSTAMANTE, E.; SHANNON, P.; OKUMOTO, S.; LEANDRO, G. 1996. Evaluación de microorganismos quitinolíticos antagonistas a *Micosphaerella fijiensis* en casa de mallas y campo. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 40:12-16.
- GUTIÉRREZ, F.A. 1996. Estudio de factores en la inducción de resistencia a *Micosphaerella fijiensis* y promoción de crecimiento en plantas de banano. Tesis M Sc; CATIE, Turrialba, Costa Rica. 91 p.

- GUERRERO, J. 1993. Abonos orgánicos, tecnología para el manejo ecológico de suelos. Lima, Peru, Red de acción en Alternativas al uso de Agroquímicos (RAAA). 90 p.
- GREATHEAD, A.H. 1986. Host plantas. In. *Bemisia tabaci* -A literature survey. M.J.W. Cock. ed. CAB Intl. Inst. Biol. Control. Silwood Park. UK. p. 17-26.
- HAMMERSCHMIDT, R.; KUÉ, J. 1982. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. *Physiology Plant Pathol* 20,61.
- HELLER, W.I.; GESSLER, C. 1986. Induced systemic resistance in tomato plants against *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 116:323-328
- HERNANDEZ, L. 1997. Control Biológico de la marchitez bacterial en tomate con el uso de enmiendas orgánicas. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE 77 p.
- HIGA, T.; PARR, J. 1994. Beneficial and Effective Microorganisms for a Sustainable Agriculture and Enviroment. International Nature Farming Research Center. Atami, Japan. 16 p.
- HILJE, L. 1993. Las moscas blancas en Costa Rica in Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe. L Hilje y O. Arboleda. Serie técnica. Informe técnico 205. CATIE. 66 pp.
- IDRIS, A. M.; BROWN, J. K. 1988. Sinaloa Tomato Leaf Curl Geminivirus: Biological and Molecular Evidence for a New Subgroup III Virus. *Virology* 88(7):648-657.
- JIMÉNEZ, J.I. 1996. Evaluación de inductores de resistencia a geminivirus y promotores del crecimiento en el cultivo del tomate. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE 74 p.
- KAUFFMANN, S.; LEGRAND, M.; FRITIG, B. 1990. Isolation and characterization of six pathogenesis-related (PR) proteins of Samsun NN tobacco. *Plant Molecular Biology* 14: 381-390.

- KLOEPPER, J.W. 1993. Plant Growth-Promoting Rhizobacteria as Biological Control Agents. In F. Blaine Metting ed. Soil Microbial Ecology Applications in Agricultural and Environmental Management. Marcel Dekker, Inc. p 255-274.
- KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N.; MILLER, T.D. 1990. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology*. 70:1078-1082.
- KLOEPPER, J.W.; SCHROTH, M.N. 1981. Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathology*. 71:642-644.
- KLUEPFEL, D. 1993. The behavior and tracking of bacteria in the rhizosphere. *Ann. Rev. Phytopathology*. 31:441-472.
- LASTRA, R. 1993. Los Geminivirus: Un grupo de fitovirus con características especiales in las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe. L. Hilje y O Arboleda eds. CATIE, Turrialba, Costa Rica. Serie técnica- Informe Técnico No 205 p 16-19.
- LEBEN, C. 1961. Microorganism in cucumber seedlings. *Phytopathology* 51: 553-557.
- LEEMAN, M.; OUDEN, F.; VAN PELT, J.; DIRKX, P.; STEIJL, H.; BAKER, H.; SCHIPPERS, B. 1996. Iron availability affects induction of systemic resistance to fusarium wilt of radish by *Pseudomonas fluorescens*. *Phytopathology* 86(2):149-155.
- LIEVENS, K.; VAN RIJSBERGEN, R.; LEYNS, F.; LAMBERT, B.; TENNING, P.; SWINGS, J.; HENK, J.; JOOS, P. 1989. Dominant rhizosphere bacteria as a source for antifungal agents. *Pesticide Science*, 27(2):141-154.
- LIU, L.; KLOEPPER, J.W.; TUZUN, S. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology* 85:1064-1068.

- MAYO, M.A.; MARTELLI, G.P. 1993. New families and genera of plant viruses. *Archives of Virology* 133:496-498.
- MAG-GTZ. 1991. Identificación taxonómica de bacterias patógenas a plantas. Informe Técnico MFP5-Tax. San José (Escazú), Costa Rica. 46 p.
- MISAGHI, I. J. 1982. *Physiology and biochemistry of plant-pathogen interactions*. New York, Plenum Press. 230 p.
- OKU, H. 1994. Systemic induced resistance as a tool for disease control. *In* Plant pathogenesis and disease control. Boca Raton, Florida, CRC Press. p. 143-157.
- OKUMOTO, S. 1992. Efecto de enmiendas sobre bacterias antagonicas a *Alternaria solani* en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 114 p.
- OZERETSKOVSKAYA, O.L. 1995. Induces resistance in the solanaceae. *In* Induced resistance to disease in plants. Hammerschmidt, R. y J. Kuc eds. p. 31-62.
- PANDEY, M.; WILCOXSON, R. 1970. The effect of light and physiologic races on *Leptosphaerulina* leaf spot of alfalfa and selection for resistance. *Phytopathology*. 64(10):1456-1465.
- RIVAS-PLATERO, G.G. 1996. Descripción matemática de epidemias. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 40: 35-39.
- RODRIGUEZ OSORNO, L.A. 1995. Antagonismo endofítico de microorganismos a *Mycosphaerella fijiensis* del platano y *Alternaria solani* del tomate. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, Catie. 75 p.
- ROM, M.; ANTIGNUS, Y.; GIDONI, D.; PILOWSKY, M.; COHEN, S. 1993. Accumulation of tomato yellow leaf curl virus DNA in tolerant and susceptible tomato lines. *Plant Disease* 77: 253-257.

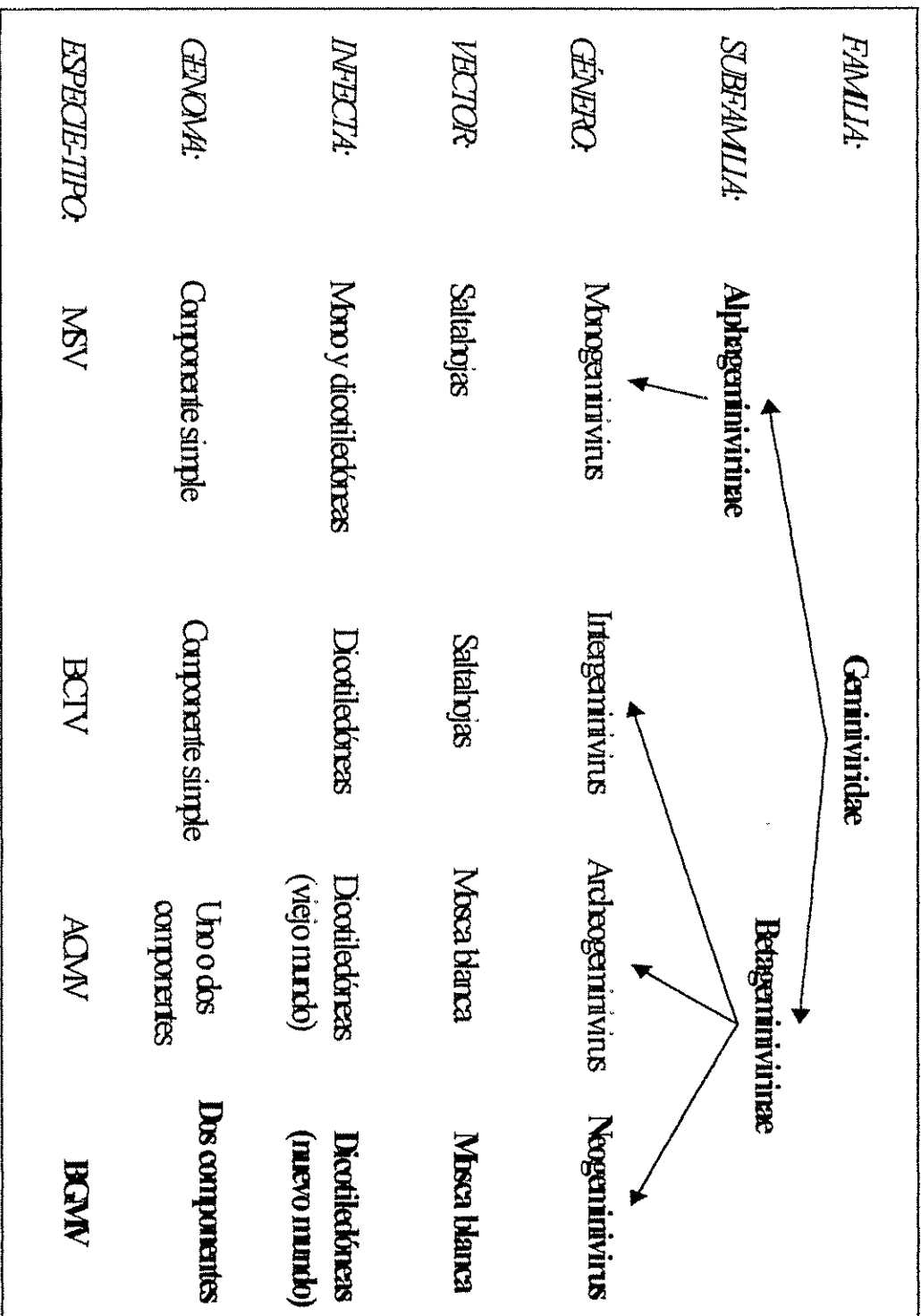


- SABORÍO, M.M. 1994. Control fitogenético del complejo mosca blanca-virus. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 34: 36-40.
- SADDLER, G.; KOLKOWSKI, J.; O'GRADY, E. 1991. Special course on plant pathogenic bacteria (inédito).
- SAIKI, R.K.; SCHARF, S.J.; FALOONA, F.; MULLIS, K.B.; HORN, G.T.; ERLICH, H.A.; ARNHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of B-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:13-35.
- SCHAAD, N.W. 1988. *Laboratory Guide for Identification of Plant pathogenic Bacteria*. 2 ed. St.Paul, Minnesota, The American Phytopathological Society. 159 p.
- SCHROTH, M.N.; HANCOCK, J.G. 1982. Disease suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science* 216:1376-1381.
- SERRA, C.A. 1996. Biología de moscas blancas. *In Metodologías para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus*. L. Hilje (Ed). Materiales de enseñanza/CATIE 37: 133 p.
- SPLEGEL, S.; GERA, A.; SALOMON, R.; AHL, P.; HARLAP, S.; LOEBENSTEIN, G. 1989. Recovery of an inhibitor of virus replication from the intercellular fluid of hypersensitive tobacco infected with tobacco mosaic virus and from induced-resistant tissue. *Phytopathology* 79:258-267.
- STEINER, U.; SCHONBECK, F. 1995. Induced resistance in monocots. *In Induced resistance to disease in plants*. Hammerschmidt, R.; Kuc, J. eds. Kluwer Academic Publishers Netherlands. 63-85 p.
- SULE, S. 1988. Induced resistance in tomato against *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense* by prior inoculation with *Pseudomonas syringae* pathovars. *Phytopathology* 122: 343-350.

- USCATEGUI, R.; LASTRA, R. 1978. Transmission and physical properties of the causal agent of mosaic yellow tomato. *American Phytopathological Society* 68:985-988
- VAN LOON, L. C.; VAN KAMMEN, A. 1970. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. 'Samsun' and 'Samsun NN' II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology* 40:199-211.
- WEI, G.; KLOPPER, J.; TUZUN S. 1996. Induced systemic resistance to cucumber diseases and increased plant growth by plant growth-promoting rhizobacteria under field conditions. *Phytopathology* 86:221-224
- WELLER, D. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathology*. 26:379-407.
- WHITE, R.F. 1979. Acetylsalicylic acid (aspirin) induces resistance to tobacco mosaic virus in tobacco. *Virology* 99: 410-412
- WHITE, R.F.; ANTONIW J.F. 1991. Virus induced resistance responses in plants. *Plant Sciences* 9: 443-455.
- ZAITTIN, M.; HULL, R. 1987. Plant virus-host interactions *Annual Rev. Plant Physiology* 38: 291-301.

## 10. ANEXOS

Anexo 1. Estructura taxonómica para la familia geminiviridae, propuesta por Padidam *et al.* (1995).



Anexo 2. Condiciones ambientales durante el experimento. CATTLE, Turrialba, Costa Rica. 1998

Dia	Radiación Solar (Mj/m <sup>2</sup> )			Temperatura media (°C).		Humedad relativa (%)		
	Junio	Julio	Agosto	Junio	Julio	Junio	Julio	Agosto
1		21.88	13.14	22.6	24.5	93.7	92.7	93.6
2		10.58	9.92	21.8	22.8	94.8	97.2	95.1
3		5.61	10.81	21.2	21.3	96.8	98.0	96.5
4		7.15	11.53	22.0	20.5	95.0	98.2	95.0
5		9.39	8.85	22.0	21.0	96.9	97.1	96.9
6		19.08	12.83	21.8	22.7	93.3	93.3	95.3
7		11.39	18.33	21.7	21.8	96.6	96.6	94.3
8		17.30	8.45	21.5	21.9	94.8	96.3	94.8
9		10.85	13.23	21.3	22.1	96.8	95.3	95.5
10		17.19	14.99	23.5	21.8	95.0	95.5	91.5
11		5.85	17.10	23.0	22.1	98.4	95.1	91.4
12		13.62	17.04	20.4	22.7	95.6	94.4	92.2
13		4.70	13.59	20.4	22.3	97.9	94.8	98.2
14		15.83	20.62	21.2	23.0	94.6	92.4	94.1
15		13.90	20.54	21.2	22.9	96.8	93.1	96.2
16		10.08	15.67	21.0	22.0	94.9	96.0	95.9
17		15.20	13.15	22.7	21.7	93.3	92.7	92.4
18		15.85	12.69	22.7	21.5	92.8	95.4	93.0
19		14.30	15.45	23.0	22.0	96.7	94.0	93.1
20		10.57	16.07	22.6	22.2	96.7	92.5	94.6
21		17.99	16.12	22.4	23.0	94.0	92.8	93.0
22		11.15	22.60	23.3	22.9	95.2	91.3	89.3
23		16.03	21.38	23.5	22.8	94.8	93.3	93.1
24		23.49	22.75	22.8	23.2	92.8	93.7	93.7
25		9.18	10.38	22.0	23.2	94.6	96.2	96.2
26		22.49	16.76	23.1	23.1	93.7	94.0	94.0
27		10.45	18.53	22.9	22.9	95.6	95.3	95.3
28		9.33	11.51	22.6	20.8	96.3	96.7	96.7
29		20.39	16.61	23.0	21.9	94.2	93.5	93.5
30		25.22	21.10	24.3	23.9	93.6	92.6	92.6
31			8.06	22.0	22.0		97.4	97.4

### Anexo 3. Preparación del Medio Agar nutriente.

- 1) Pesar 23g de agar nutriente y 5g de Bacto agar.
- 2) Calentar en la estufa un litro de agua destilada en un erlenmeyer de 1,500ml.
- 3) Agregar los ingredientes del numeral (1) y agitar, hasta que hierva.
- 4) Dejar hervir por 5 min. hasta que se disuelvan los ingredientes.
- 5) Esterilizar en el autoclave a 121 °C durante 25 minutos a 15 atmósferas de presión.

El contenido de la formula por litro de agua es el siguiente:

- 1) Gelatina digerida por enzimas pancreáticas..... 5.0g
- 2) Extracto de carne bovina..... 3.0g
- 3) Agar..... 15.0g
- 4) pH final ..... 6.8 ± 0.2

**Anexo 4. Características bioquímicas y morfológicas de rizobacterias recolectadas y aisladas de plantas de tomate. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.**

Bacterias	Muestra	Gram	Catalasa	Oxidasa	AnG <sup>1</sup>	Fl/BK <sup>2</sup>	Forma	Borde
MG1	M8P2 raíz	+	+	+	-	-	Irregular	Dentado
MG2	M7P2 suelo	+	+	+	-	-	Irregular	Dentado
MG3	M10P1 raíz	-	+	+	-	-	Irregular	Dentado
MG4	M2Gu raíz	+	+	+	-	-	Rizoide	Filamentoso
MG5	M2Gu raíz	-	+	-	-	-	Puntiforme	Lobulado
MG6	M7P2 raíz	+	+	+	-	-	Irregular	Dentado
MG7	M7P2 raíz	-	+	+	-	-	Irregular	Dentado
MG8	M9P1 suelo	-	+	+	+	-	Puntiforme	Dentado
MG9	M5P2 raíz	-	+	+	-	+	Irregular	Lobulado
MG10	M12P1 suelo	-	+	-	-	+	Circular	Entero
MG11	M7P2 raíz	-	+	+	-	-	Irregular	Ondulado
MG12	M3Gu raíz	+	+	+	-	-	Irregular	Filamentoso
MG13	M9P1 raíz	+	+	+	-	-	Irregular	Dentado
MG14	M4P2 raíz	+	+	+	-	-	Circular	Ondulado
MG15	M5P2 suelo	-	+	+	-	-	Irregular	Dentado
MG16	M2Gu raíz	+	+	+	-	-	Irregular	Dentado
MG17	M2Gu raíz	+	+	+	-	-	Irregular	Dentado
MG18	M3Gu raíz	+	+	-	+	-	Puntiforme	Ondulado
MG19	M11P1 raíz	-	+	-	(+)	-	Puntiforme	Entero
MG20	M6P2 suelo	-	+	+	-	-	Irregular	Ondulado
MG21	M6P2suelo	-	+	+	-	-	Irregular	Ondulado
MG22	M12P1 suelo	-	+	-	(+)	-	Puntiforme	Ondulado
MG23	M10P1 raíz	-	+	-	-	-	Puntiforme	Entero
MG24	M6P2 raíz	-	+	+	-	-	Irregular	Lobulado
MG25	M3Gu suelo	+	+	+	-	-	Irregular	Encrespado
MG26	M2Gu suelo	+	+	+	-	-	Irregular	Ondulado
MG27	M2Gu raíz	+	+	+	-	-	Irregular	Filamentoso
MG28	M3Gu raíz	+	+	+	-	-	Irregular	Dentado
MG29	M6P2 raíz	+	+	+	-	-	Irregular	Dentado
MG30	M8P2 raíz	+	+	+	-	-	Irregular	Dentado
MG31	M5P2 suelo	-	+	+	-	-	Irregular	Ondulado
MG32	M7P2 suelo	-	+	+	(+)	-	Irregular	Ondulado
MG33	M5P2 raíz	-	+	-	(+)	-	Puntiforme	Ondulado
MG34	M12P1 suelo	-	+	+	-	-	Irregular	Ondulado
MG35	M7P2 raíz	-	+	+	-	-	Irregular	Ondulado
MG36	M7P2 suelo	+	+	-	-	-	Irregular	Ondulado
MG37	M1Gu raíz	-	+	+	-	-	Irregular	Entero
MG38	M1Gu suelo	-	+	-	-	-	Irregular	Entero
MG39	M1Gu raíz	-	+	+	-	-	Irregular	Ondulado
MG40	M1Gu raíz	+	+	-	-	-	Irregular	Lobulado
MG41	M1Gu raíz	+	+	-	-	-	Puntiforme	Lobulado
MG42	M1Gu raíz	-	+	-	+	-	Irregular	Dentado

<sup>1</sup> Crecimiento anaeróbico

<sup>2</sup> Fluorescencia en medio B-de King

### Anexo 5. Medios I y II utilizados en la prueba de crecimiento anaeróbico.

El Medio I contiene lo siguiente:

Peptona .....	2.0 g
NaCl .....	5.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.3 g
Azul de bromotimol al 1% .....	3.0 ml
Agua destilada .....	1000 ml

El azul de bromotimol se prepara al 1% de la siguiente manera:

Azul de bromotimol (Nr.3026, Merck).....	0.1 g
NaOH 0.1N .....	8.0 ml
Disolver y agregar agua destilada.....	2.0 ml

Se ajusta a un pH de 7.1 y se vierten 5 ml en tubos de ensayo, los cuales se tapan con una mota de algodón, luego cubrirlos con papel aluminio y se esterilizan en el autoclave.

Medio II: Medio con fuente de carbono u otros compuestos orgánicos, en este caso la fuente de carbono usada fue sucrosa.

Fuente de carbono .....	10 g
Agua destilada .....	100 ml

### Anexo 6. Reactivos utilizados para preparar el medio B-de King.

Reactivos	Peso
Peptona No 3	20.0 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *3H <sub>2</sub> O	1.5 g
MgSO <sub>4</sub> * 7H <sub>2</sub> O	1.5 g
Glicerol	15 g
Agar	18 g
Agua	1000 cc



**Anexo 7. Análisis químico del suelo y de los sustratos utilizados, previo a la siembra del experimento. CATIE, Turrialba. 1998.**

Muestra	P (mg/l)	K (cmol/l)	Ca (cmol/l)	Mg (cmol/l)	Cu (mg/l)	Zn (mg/l)	Mn (mg/l)	pH (en agua)
Suelo	10.94	0.27	3.33	1.15	16.98	12.25	360.4	5.1
Sustrato I	241.5	0.78	7.16	3.65	12.79	34.98	555.6	5.5
Sustrato II	61.66	0.69	4.52	1.46	16.4	26.74	480.5	5.9

Sustrato I = Suelo + Compost (4:1)

Sustrato II = Suelo + Bocashi (7:1)

**Anexo 8. Análisis químico del Compost y Bocashi previo a la mezcla con suelo.**

Muestra	P (%)	K (%)	Ca (%)	Mg (%)	Cu (mg/l)	Zn (mg/l)	Mn (mg/l)
Compost	2.52	0.65	7.04	0.75	121.18	634.46	1148.58
Bocashi	2.27	0.58	7.25	0.35	117.93	153.98	1012.44

Anexo 9. (a) Altura promedio en centímetros según tratamientos para las diferentes evaluaciones en plantas de tomate variedad Hayslip. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.

TRAT.	30ddg	37ddg	44ddg	51ddg	58ddg	65ddg	72ddg	79ddg
T1	16.6	28.0	39.0	51.4	74.3	82.2	95.6	106.6
T2	20.8	34.4	42.0	53.4	78.6	83.3	97.0	102.2
T3	17.4	26.4	36.2	46.0	67.0	73.6	87.0	95.4
T4	18.5	35.6	48.0	59.6	79.8	87.5	102.2	109.8
T5	14.5	27.6	39.9	52.9	77.2	84.8	101.6	109.6
T6	43.1	60.8	72.9	84.0	101.2	103.88	109.5	112.7
T7	34.9	52.3	70.2	80.3	95.6	103.5	107.4	110.4
T8	18.0	31.7	39.8	50.2	72.4	80.6	96.0	103.4
T9	49.2	66.8	83.0	91.7	103.6	106.0	110.8	114.2
T10	28.4	46.3	62.6	74.1	91.6	100.2	106.6	111.6
T11	17.2	32.8	43.4	57.2	81.3	87.0	98.8	106.6
T12	18.6	32.1	56.1	84.3	120.4	138.0	159.4	167.4

Anexo 9. (b) Altura promedio en centímetros según tratamientos para las diferentes evaluaciones en plantas de tomate variedad 8429. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.

TRAT.	30ddg	37ddg	44ddg	51ddg	58ddg	65ddg	72ddg	79ddg
T1	12.7	21.8	34.1	47.0	74.4	81.4	105.0	115.4
T2	13.5	23.0	36.6	53.2	83.0	91.8	115.6	126.8
T3	12.4	20.1	29.5	40.8	65.5	77.2	101.4	118.0
T4	12.1	24.3	38.6	52.8	79.8	91.0	117.2	127.2
T5	16.8	24.3	36.6	52.3	79.8	89.0	111.8	122.4
T6	40.4	62.1	80.3	90.6	107.0	110.6	120.0	122.0
T7	30.4	44.4	63.5	74.3	95.8	100.0	111.4	115.4
T8	10.6	18.4	27.2	39.4	67.8	79.6	98.8	113.8
T9	52.6	77.4	102.2	109.2	129.2	136.0	148.2	155.6
T10	33.8	51.5	71.3	83.4	108.3	114.36	134.4	142.2
T11	14.6	25.3	36.0	48.7	72.6	79.6	91.0	101.6
T12	17.8	30.7	54.0	82.4	120.2	136.1	165.8	174.2

**Anexo 10. Valores de radiación fotosintética activa (RAFA) medida en un día soleado y nublado bajo condiciones de invernadero y campo durante el experimento. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.**

Hora del día	RAFA ( $\mu\text{M m}^{-2} \text{s}^{-1}$ )			
	Invernadero		Campo	
	soleado	nublado	soleado	nublado
8:00	190	59	1152	344
12:00	289	115	1773	661
4:00	36	26	238	162

**Anexo 11. Ecuaciones de regresión entre las variables peso seco (Y) y severidad (X) según tratamientos en plantas de tomate variedad Hayslip. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.**

Tratamientos	Ecuación	R <sup>2</sup>	Valor de X	Valor de Y
T1= B. cereus	Y= -17x <sup>2</sup> +53.15x+5.705	0.82	1.60	47.20
T2= P. cepacia	No presentó regresión			
T3= Bacillus sp.	Y= -24.241x+83969	0.89	-	-
T4= P. fluorescens	Y= -47.88x <sup>2</sup> +182.58x-130.67	0.59	1.89	41.52
T5= Pseudomonas sp.	Y= -54.868x+160.46	0.85	-	-
T6= Compost	Y= 0.8393x+33.458	0.98	-	-
T7= Bocashi	Y= -13.965x+70.042	0.61	-	-
T8=T1+T2+T3+T4+T5	Y= -31.69x <sup>2</sup> +152.86x-129.4	0.99	2.41	54.94
T9= Compost + T8	Y= -61.814x <sup>2</sup> +196.82x-88.72	0.97	1.59	67.95
T10= Bocashi + T8	Y= -24.018x+85.556	0.98	-	-
T11= Testigo relativo	Y= -134.12x <sup>2</sup> +458.24x-339.1	0.69	1.70	52.30

**Anexo 12. Ecuaciones de regresión entre las variables peso seco (Y) y severidad (X) según tratamientos en plantas de tomate variedad 8429. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 1998.**

Tratamientos	Ecuación	R <sup>2</sup>	Valor de X	Valor de Y
T1= B. cereus	Y= -58.584x <sup>2</sup> +133.07x-6.173	0.99	1.13	69.40
T2= P. cepacia	Y= 22.442x <sup>2</sup> -56.584x+87.03	0.99	1.26	51.31
T3= Bacillus sp.	Y= -10.09x+67.45	0.97	-	-
T4= P. fluorescens	Y= -5.0379x+53.299	0.84	-	-
T5= Pseudomonas sp.	Y= -20.961x+108.14	0.98	-	-
T6= Compost	Y= -6.5624x <sup>2</sup> +31.943x+6.2386	0.73	2.43	45.12
T7= Bocashi	Y= 14.556x <sup>2</sup> -57.594x+106.48	0.60	1.98	49.54
T8=T1+T2+T3+T4+T5	Y= -7.2563x+61.806	0.98	-	-
T9= Compost + T8	Y= -246.31x <sup>2</sup> +453.56x-118.72	0.99	0.92	90.08
T10= Bocashi + T8	Y= 5.468x <sup>2</sup> -28.55x+97.431	1.00	2.60	60.17
T11= Testigo relativo	Y= 29.271x <sup>2</sup> -72.923x+62.613	0.84	1.25	24.20

Anexo 13. Distancia genética de los geminivirus encontrados en las muestras de tomate para la variedad Hayslip y 8429, comparados con: squash leaf curl virus strain E (SLCV-E), sinaloa tomato leaf curl virus (STLCV), tomato golden mosaic virus (TGMV) Y tomato mottle virus (ToMoV) (Brown 1998).

