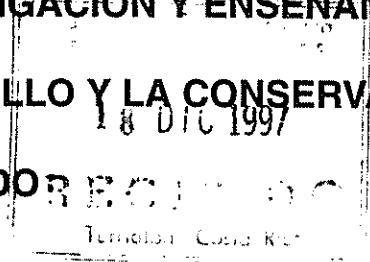


CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION

ESCUELA DE POSTGRADO



**CONTROL BIOLÓGICO DE LA MARCHITEZ BACTERIAL EN
TOMATE CON EL USO DE ENMIENDAS ORGÁNICAS**

POR

LIVIA RAFAELA HERNANDEZ GARBOZA



Turrialba, Costa Rica
1997

**CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE
INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
ESCUELA DE POSTGRADO**

Biblioteca Central
CARTON - IICA - CATIE

18 DIC 1997

RECIBIDO

Turrialba, Costa Rica

**CONTROL BIOLÓGICO DE LA MARCHITEZ BACTERIAL EN
TOMATE CON EL USO DE ENMIENDAS ORGÁNICAS**



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

MAGISTER SCIENTIAE

Por

LIVIA RAFAELA HERNANDEZ GARBOZA

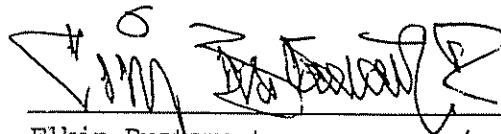
Turrialba, Costa Rica

1997

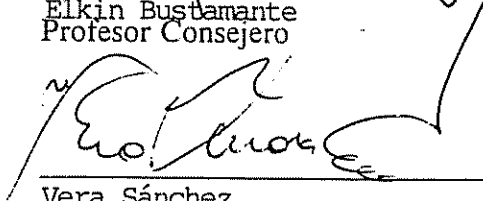
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Jefatura del Area de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

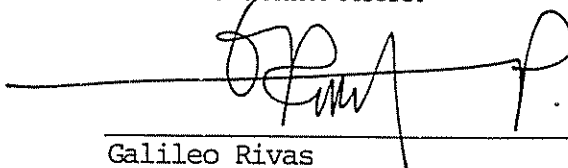
FIRMANTES:



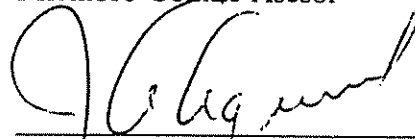
Elkin Bustamante
Profesor Consejero



Vera Sánchez
Miembro Comité Asesor



Galileo Rivas
Miembro Comité Asesor



Juan A. Aguirre
Jefe. Area de Postgrado



Markku Kanninen
Director, Programa de Enseñanza



Livia Hernández Garboza
Candidato

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por darme la vida, por permitirme conocer a la persona más importante de mi vida, Carlos Ruiz, y por darme la oportunidad de vivir y conocer la gente linda de Costa Rica.

A mis padres, María y Luis, y hermanos, que los llevo siempre en mi mente.

A todos mis compañeros de la Biblioteca Conmemorativa Orton, por su colaboración y amistad durante los años de estadía en este centro de enseñanza.

A todos mis compañeros de especialidad del MIP, Erick, Jaime, Juan J., Juan V., Juan C., y Vladimir, ya que para mi cada uno representó experiencias diferentes en el área de estudio.

A todo el personal del Laboratorio de Diagnóstico del MIP, Arturo Gamboa, Mario Cervantes, Ing. Agr. Cristian Zuñiga, Seydi Salas y Ghisselle Alvarado, por la colaboración desinteresada prestada en todo momento.

A todos los miembros del comité de tesis, M. Sc. Galileo Rivas, Dr. Elkin Bustamante y Dr. Vera Sánchez por su ayuda y recomendaciones para la culminación del trabajo.

Al Dr. Joseph Saunders y Dr. Francisco Jiménez por sus recomendaciones y excelentes profesionales.

A la Escuela de Postgrado por la oportunidad de estudio y al gobierno británico por el financiamiento del mismo.

Al CATIE, ya que representó una experiencia inolvidable en mi vida.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág (s)
AGRADECIMIENTOS	iii
INDICE DE CUADROS	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
RESUMEN, SUMMARY	ix
1.INTRODUCCIÓN	1
2. Experimento 1: Evaluación de enmiendas orgánicas por la supersión de la marchitez bacterial	3
2.1.Revisión de literatura.	
2.1.1 La marchitez bacterial causada por <i>Pseudomonas solanacearum</i>	3
2.1.1.1 Agente causal de la marchitez bacterial, hospedantes y distribución geográfica	3
2.1.1.2 Síntomas y epidemiología de la marchitez bacterial	5
2.1.1.3 Métodos de control de la marchitez bacterial	6
2.1.2 La materia orgánica en la producción de cultivos	7
2.1.2.1 Consideraciones generales	7
2.1.2.2 Proceso de descomposición natural de la materia orgánica	8
2.1.2.3 Los abonos orgánicos en la agricultura	8
2.1.2.4.Descomposición controlada de la materia orgánica: compost o abonos orgánico fermentado	9
2.1.3 Control biológico de patógenos	11
2.1.3.1 Concepto y estrategias de control biológico	11
2.1.3.2 Los abonos orgánicos como herramientas de control biológico	12
2.2.Materiales y métodos.	
2.2.1 Ubicación de los experimentos	14
2.2.2 Enmiendas orgánicas utilizadas	14
2.2.3 Desinfestación del suelo	16
2.2.4 Análisis fisico-químico de los sustratos utilizados	16
2.2.5 Material vegetal evaluado y manejo del cultivo	16
2.2.6 Preparación del inóculo e inoculación de <i>P. solanacearum</i>	17
2.2.7 Procedimiento experimental y tratamientos	17
2.2.8 Variables evaluadas, análisis estadístico diseño experimental	18

2.3.Resultados y discusión.	
2.3.1.Contenido de nutrientes en la mezcla de suelo	21
2.3.2.Efecto de enmiendas orgánicas sobre las variables de crecimiento	23
2.3.3.Contenido de nutrientes en el tejido foliar	29
2.3.4.Efecto de enmiendas orgánicas sobre la severidad de la marchitez bacterial	31

3.Experimento 2: Antagonismo de rizobacterias a *Pseudomonas solanacearum*.

3.1.Revisión de literatura	
3.1.1.Microorganismos del suelo y la rizosfera	38
3.1.2. Uso de organismos antagonistas para controlar patógenos de plantas	39
3.1.3. Control biológico de <i>P. solanacearum</i> con el uso de antagonistas	40
3.1.4. Abonos orgánicos fermentados como fuentes de microorganismos benéficos	41
3.2.Materiales y métodos	
3.2.1.Preparación del extracto de la rizosfera	43
3.2.2.Prueba de antagonismo del extracto de la rizosfera a <i>P. solanacearum</i>	43
3.2.3. Aislamiento de microorganismos de la rizosfera	44
3.2.4.Determinación de bacterias de la rizosfera como antagonistas <i>in vitro</i> a <i>P. solanacearum</i>	44
3.2.4.1. Procedimiento y tratamientos	45
3.2.4.2. Diseño experimental	46
3.2.5. Aislamiento e identificación de bacterias provenientes de la rizosfera	46
3.3.Resultados y discusión	
3.3.1. Antagonismo del extracto de la rizosfera a <i>P. solanacearum</i>	48
3.3.2.Efecto de bacterias de la rizosfera como antagonistas a <i>P. solanacearum</i>	48
3.3.3. Identificación de rizobacterias probadas como antagonistas <i>in vitro</i>	51

4.Experimento 3. Supervivencia de *Pseudomonas solanacearum* en el suelo.

4.1.Revisión de literatura	
4.1.1. Suelos infestados con <i>Pseudomonas solanacearum</i>	54
4.1.2.Prácticas para reducción de inóculo de <i>P. solanacearum</i> en el suelo	55
4.2.Materiales y métodos	
4.2.1.Procedimiento experimental	57
4.2.2. Tratamientos y variable evaluada	57

	Pág (s)
4.2.3. Diseño experimental y análisis de los resultados	58
4.3. Resultados y discusión	
4.3.1. Supervivencia de <i>P. solanacearum</i> en el suelo con el uso de abonos orgánicos	59
5. CONCLUSIONES	63
6. RECOMENDACIONES	64
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
8. ANEXOS	75

INDICE DE CUADROS

	Pág (s)
Cuadro 1. Resultados del análisis físico-químico de los sustratos preparados con la mezcla de suelo estéril y las enmiendas orgánicas	21
Cuadro 2. Variación de la relación de bases del análisis de suelo en los tratamientos con aplicación de abonos orgánicos	22
Cuadro 3. Valores promedio de Area bajo la curva de progreso de altura (ABCPA) de plantas de tomate y significancia para los tratamientos que presentaron abonos orgánicos en pruebas bajo casa de mallas, CATIE, Turrialba	23
Cuadro 4. Valores promedio de Area bajo la curva de progreso de diámetro (ABCPD) de plantas de tomate expuestas a nueve tratamientos a base de sustratos orgánicos bajo condiciones de casa de mallas, CATIE, Turrialba	24
Cuadro 5. Valores promedio de peso seco de la parte aérea de plantas de tomate de acuerdo a su crecimiento en diferentes tratamientos con sustratos orgánicos bajo condiciones de casa de mallas, CATIE, Turrialba	26
Cuadro 6. Valores promedio del contenido de humedad en plantas de tomate sometidas al inóculo de <i>P. solanacearum</i> en tratamientos a base de sustratos orgánicos en casa de mallas, CATIE, Turrialba	28
Cuadro 7. Contenido de nutrimentos en el tejido foliar de plantas de tomate sometidas al inóculo de <i>P. solanacearum</i> tratadas con enmiendas orgánicas en casa de mallas, CATIE, Turrialba	30
Cuadro 8. Valores del Area bajo la curva de progreso de la marchitez bacterial en plantas de tomate en invernadero inoculadas con <i>P. solanacearum</i> en respuesta al uso de enmiendas orgánicas en el suelo, CATIE, Turrialba	32
Cuadro 9. Correlaciones entre la severidad de la marchitez bacterial y las variables de crecimiento de plantas de tomate desarrolladas en suelo con aplicación de enmiendas orgánicas, bajo condiciones de casa de mallas, CATIE, Turrialba	35
Cuadro 10. Frecuencia de aparición de zonas de inhibición (en porcentaje) del crecimiento de <i>P. solanacearum</i> en pruebas de laboratorio	48
Cuadro 11. Identificación de bacterias aisladas de la rizosfera de tomate con el uso de diferentes composts probadas como antagonistas a <i>P. solanacearum</i>	51
Cuadro 12. Población de <i>P. solanacearum</i> en el suelo inoculado artificialmente en invernadero tratado con enmiendas orgánicas, a los 30, 60 y 90 días después de la inoculación, CATIE, Turrialba	60

INDICE DE FIGURAS

	Pág (s)
Figura 1. Altura del tallo de plantas de tomate en respuesta al uso de enmiendas orgánicas, 15, 30, 45 y 60 días después de la emergencia del cultivo bajo condiciones de casa de mallas, CATIE, Turrialba	24
Figura 2. Diámetro del tallo de plantas de tomate expuestas a nueve sustratos Orgánicos, 15, 30, 45 y 60 días después de la emergencia bajo condiciones de casa de mallas, CATIE, Turrialba	25
Figura 3. Peso seco de la parte aérea de plantas de tomate en respuesta a nueve tratamientos con base en enmiendas orgánicas e inoculadas con <i>P. solanacearum</i> y mantenidas en condiciones de casa de mallas, CATIE, Turrialba	27
Figura 4. Contenido de humedad de la parte aérea de plantas de tomate en respuesta a nueve tratamientos de sustratos orgánicos con inoculación de <i>P. solanacearum</i> y mantenidas bajo condiciones de casa de mallas, CATIE, Turrialba	28
Figura 5. Comportamiento de la severidad de la marchitez bacterial en plantas de tomate tratadas con enmiendas orgánicas al suelo, 9, 14, 20, 30 y 40 días después de inoculadas con <i>P. solanacearum</i> y en condiciones de invernadero	32
Figura 6. Reducción del crecimiento in vitro de <i>P. solanacearum</i> en presencia de bacterias de la rizosfera de plantas de tomate crecidas en sustratos orgánicos	50
Figura 7. Efecto de sustratos orgánicos sobre la población de <i>P. solanacearum</i> , 30, 60 y 90 días después de inoculada en el suelo en invernadero, CATIE, Turrialba	59

HERNANDEZ GARBOZA, L.R. 1997. Control biológico de la marchitez bacterial en tomate con el uso de enmiendas orgánicas. Tesis M.Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Palabras claves: marchitez bacterial, control biológico, bacterias antagonistas, abono orgánico, *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas* fluorescentes, *Bacillus spp.*, tomate, Costa Rica.

RESUMEN

Se estudió la marchitez bacterial causada por *Pseudomonas solanacearum*, una de las enfermedades más importantes a nivel mundial. Las enmiendas orgánicas fueron evaluadas por su efecto sobre la severidad de la enfermedad, la producción de antagonistas en la rizosfera de tomate y la fluctuación poblacional de *P. solanacearum* en el suelo. La broza de café, cachaza y tres tipos de composts se utilizaron como enmiendas orgánicas mezcladas con suelo. En condiciones de casa de mallas, fueron sembradas plantas de tomate en las mezclas de suelo. La severidad de la enfermedad se redujo con el uso de compost. Las rizobacterias provenientes de compost presentaron propiedades antagonistas bajo condiciones de laboratorio. La población de *P. solanacearum* fue reducida en ausencia del hospedante con el uso de broza de café y dos tipos de compost. El mejor efecto en el control de la enfermedad se observó al usar materia orgánica en forma de abonos orgánicos fermentados en comparación al uso de sustratos como broza de café y cachaza.

HERNANDEZ GARBOZA, L.R. 1997. Biological control of tomato bacterial wilt with organic amendments. Thesis M.Sc., CATIE, Turrialba, Costa Rica.

Key word: bacterial wilt, biological control, antagonistic bacteria, organic amendment, *Pseudomonas solanacearum*, *Pseudomonas* fluorescent, *Bacillus spp.*, tomato, Costa Rica

SUMMARY

The bacterial wilt, a plant disease caused by *Pseudomonas solanacearum*, has long been recognised as one of the main problems in production in the world. The effect of organic amendment over disease severity, presence of antagonistic bacteria on tomato rizosphere and the survival of *P. solanacearum* in soil, were evaluate. Coffee pulp, sugar cane filter cake and three composts were the amendment tested. The tomato bacterial wilt severity was decreased under screen house conditions with compost use. Bacterial isolates from compost showed antagonistic ability in laboratory test. The survival in soil of *P. solanacearum*, without the susceptible host, was reduced with coffee pulp and compost use. Composts were better for control the tomato bacterial wilt than coffee pulp or sugar cane filter cake as organic amendments.

1. INTRODUCCION

La marchitez bacterial causada por *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith, es una de las más destructivas enfermedades bacterianas de las plantas, con importancia económica, ya que afecta muchos cultivos (tomate, papa, tabaco, musaceas, etc.) y es endémica de países de zonas tropicales y subtropicales (Persley 1986, Opeña y Tschanz 1987, Hayward 1991, Trigalet *et al.* 1994).

Uno de los cultivos de más amplia distribución en los sistemas agrícolas y en diferentes regiones a nivel mundial, lo constituye el tomate, y este muchas veces se ve afectado por el ataque de la enfermedad en suelos afectados por *P. solanacearum*, disminuyendo su producción.

Las prácticas de manejo propuestas en diferentes condiciones han tenido poco éxito, dado que la biología de la bacteria no está bien definido (Sequeira 1994). El control químico, ha sido una alternativa poco viable para pequeños productores de muchos países. Se ha encontrado dificultad en obtener cultivares resistentes bajo condiciones de alta temperatura y humedad (Hayward 1991, Grimault *et al.* 1994). El control biológico de la enfermedad muestra un gran potencial, ya que se han aislado antagonistas a *P. solanacearum* (Kempe y Sequeira 1983) de diferentes fuentes (suelos supresivos y rizosfera de ciertas plantas), así mismo como el uso de razas avirulentas del patógeno constituye una alternativa (Trigalet *et al.* 1994).

Todas las variantes que presenta el manejo eficaz de la enfermedad y la dificultad de conocer a ciencia cierta el comportamiento de la bacteria, el potencial que representa el control biológico de la bacteria constituye una de las alternativas más apropiadas para lograr su control.

Una de las herramientas del control biológico que puede contribuir en el manejo de *P. solanacearum* es el uso de abonos orgánicos, los cuales favorecen el crecimiento y la

biodiversidad de microorganismos existentes en la rizosfera de las plantas, ayudando a disminuir las poblaciones del patógeno en el suelo.

Dada la importancia que presenta la marchitez bacterial en varios cultivos y la necesidad de métodos de control, que incluyan sanidad y rotación del cultivo, selección de materiales libres de plagas, los objetivos principales del presente estudio fueron determinar la supresión de la marchitez bacterial en el cultivo de tomate, evaluar la presencia de bacterias antagonistas en la rizosfera de las plantas, y medir la supervivencia de las poblaciones de *P. solanacearum* con el uso de enmiendas orgánicas.

2. EXPERIMENTO 1: EVALUACIÓN DE ENMIENDAS ORGÁNICAS POR SUPRESION DE LA MARCHITEZ BACTERIAL

2.1. REVISION DE LITERATURA

2.1.1. La marchitez bacterial producida por *Pseudomonas solanacearum*

2.1.1.1. Agente causal, hospedantes y distribución geográfica

La marchitez bacterial causada por *Pseudomonas solanacearum*, es una de las más destructivas enfermedades bacterianas de los cultivos (Kelman 1953, Opeña y Tschanz 1987). En regiones húmedas de zonas tropicales y subtropicales constituye un problema serio (Kelman 1985). La bacteria, gram negativa, presenta forma de bastón con dimensiones de 0,5 a 1 x 1,5 a 4 μm , y se desplaza por medio de uno a varios flagelos polares. Muchas de las especies del género *Pseudomonas* son habitantes del suelo, de ambientes marinos y de agua dulce (Agrios 1996).

Las razas de *P. solanacearum* difieren en el ámbito de hospedantes, en la distribución geográfica, en la patogenicidad, en relaciones epidemiológicas y en propiedades fisiológicas (Buddenhangen y Kelman 1964, Palleroni y Doudoroff 1971, Seal y Elphinstone 1994).

La marchitez bacterial es causada por diferentes razas, de acuerdo con el rango de hospedantes (Buddenhangen *et al* 1962, He *et al* 1983) o por biovares, en función de la habilidad que presentan ciertos grupos de metabolizar disacaridos específicos y hexoalcoholes (Hayward 1991). En tomate, las razas 1 y 3 de *P. solanacearum* son las responsables de producir la enfermedad (CATIE 1990, Hayward 1991, Bustamante 1994b) y constituye una de las principales limitantes en las siembras comerciales de este cultivo. En banano y plátano, la raza 2 de este patógeno produce la enfermedad conocida como "moko" (Sequeira 1958).

La enfermedad causa severas pérdidas en cultivos como tomate, papa y berenjena, además afecta otros de importancia económica como el banano (Persley 1986). Con la excepción de *Agrobacterium tumefaciens*, causante de la agalla de corona en muchas dicotiledóneas, ningún patógeno hospeda tantas especies diferentes de plantas como *P. solanacearum* (Hayward 1994), ya que presenta una amplia gama de cultivos hospedantes.

El agente causal de la marchitez bacterial se ha aislado de leguminosas, de especies como *Vigna sinensis*, en la India y Filipinas, *Phaseolus vulgaris* en Sri Lanka, Malasia y Uganda. En plántulas de fresa en semillero, la bacteria ha sido diagnosticada en Japón y Taiwan (Hayward 1994). Un caso curioso es la presencia del patógeno en Japón y China en el cultivo de fresa, más no se presenta al sureste de Estados Unidos, donde son sembradas grandes extensiones de esta fruta (Hayward 1991).

Se ha podido encontrar también en Indonesia otra enfermedad en el cultivo de banano producida por otro patógeno del mismo género (Eden-Green y Sastraatmadja 1990). Razas nativas de *P. solanacearum* se han encontrado en Australia causando marchitez bacterial en plantas ornamentales del género *Heliconia*.

Se ha indicado la existencia de ciertas anomalías en la ocurrencia de la marchitez bacterial en ciertos hospedantes (Hayward 1994). Por ejemplo, la enfermedad en *Ipomoea batata*, se ha reportado en algunas regiones de China, mientras que este cultivo se siembra en otros países donde la enfermedad es endémica sin causar problemas a este. Se conoce la incidencia de la enfermedad en Indonesia, hospedando plantas de yuca *Manihot esculenta* Crantz, mientras que no causa problemas a este cultivo en otros países. En eucalipto fue reportada en Brasil, China, y Australia. También, *P. solanacearum* se ha presentado en frutales como *Annona spp.* y *Anacardium occidentale* L.; y en oleaginosas como *Arachis hypogea* L., en zonas donde la bacteria no es endémica, mientras que no se encuentra presente en estos mismos cultivos en áreas donde la marchitez bacterial es un típico problema.

La razón de estas diferencias no está bien definida, se presume que ciertas razas patogénicas a estos hospedantes han evolucionado en ciertas partes del mundo.

2.1.1.2. Síntomas y epidemiología de la marchitez bacterial

Los síntomas de la marchitez bacterial en las solanáceas aparecen como una marchitez repentina. En el cultivo de tomate, las plantas infectadas jóvenes mueren con rapidez (iniciando en promedio en el estado de 5 a 8 hojas). Las plantas adultas pueden presentar inicialmente un debilitamiento y manchado de sus hojas, caída de éstas o marchitamiento solo de un lado y atrofia antes de que se mueran completamente. Muchas veces, el tomate presenta desarrollo excesivo de raíces adventicias, el tejido vascular de tallo y raíz se observa oscurecido y cuando se coloca la parte basal del tallo en un recipiente transparente con agua se observa un exudado bacteriano blanquecino (Bustamante 1994b).

Cuando las plantas se marchitan es posible observar en torno a los haces vasculares agrupamiento de células bacterianas, las cuales son responsables de la pudrición de raíces (Agrios 1996, Bustamante 1994b). La presencia de condiciones climáticas favorables y daños causados durante las prácticas de cultivo crean puertas de entrada al patógeno.

Tanto los factores bióticos como los abióticos son importantes para determinar el grado de severidad de la marchitamiento bacterial. Las plantas expresan enfermedad donde las condiciones de temperatura, humedad, tipo de suelo y potencial de inóculo sean favorables para su expresión.

El factor más importante que afecta la interacción hospedante-patógeno y la supervivencia de la bacteria en el suelo es la temperatura (Prior *et al.* 1996). Un ámbito de temperatura ambiental de 30 a 35°C permite el incremento de la enfermedad en hospedantes como tomate (Mew y Ho 1977, Hayward 1991). Los cultivos que se desarrollan en clima frío

presentan síntomas más leves (French *et al.* 1972), aunque hay razas dentro del grupo de *P. solanacearum* adaptadas a las temperaturas bajas (Persley 1986).

La humedad constante del suelo, por lluvia o riego favorece el desarrollo de la enfermedad (Kelman 1953). El tipo de suelo influye en la persistencia o no de la bacteria, se considera que algunos suelos son conductivos y otros supresivos a la marchitez bacterial (McCarter 1976, Hayward 1991). Es necesario investigar aquellos suelos en los cuales la bacteria no ocurre o donde es inoculada y no sobrevive por largo tiempo.

Las poblaciones de nematodos también pueden incrementar la severidad de la enfermedad sobre algunos hospedantes (Hayward 1991).

2.1.1.3. Métodos de control de la marchitez bacterial

El uso de cultivares resistentes para el control de la marchitez bacterial ha tenido éxito en algunos cultivos como tabaco. En tomate, se han desarrollado muchos cultivares con cierto nivel de resistencia, pero se ha tenido dificultad en la obtención de cultivares con resistencia estable bajo condiciones de alta temperatura y humedad (Hayward 1991, Grimault *et al.* 1994). En el cultivo de papa, este tipo de control es de valor práctico negativo, ya que cultivares dados como resistentes pueden no ser muy atacados y serán perfectos vehículos de diseminación de la bacteria (Drummond 1984).

El manejo de la enfermedad con prácticas agronómicas es considerado errático, dado que la bacteria persiste fácilmente en el suelo y en la rizosfera por largo tiempo, además que la presencia del patógeno en el suelo mismo es impredecible (McCarter 1976, Nesmith *et al.* 1983). En Centroamérica para disminuir el efecto de la enfermedad se recomienda la rotación de cultivos o uso de cultivares resistentes, para el caso de tomate industrial (CATIE 1990).

Los suelos considerados como supresivos al crecimiento de *P. solanacearum*, ya que presentan microorganismos antagónicos al desarrollo de la bacteria, pueden ser detectados con el uso de plantas indicadoras; y constituyen una opción valiosa para el caso de la papa (French 1979), medida que puede ser adaptada al cultivo de tomate. En Costa Rica se presentan suelos en los que *P. solanacearum* no se manifiesta por esta condición de supresividad (Cartin y Wang 1996).

2.1.2. La materia orgánica en la producción de cultivos

2.1.2.1. Consideraciones generales

La materia orgánica (MO) está constituida por todo tipo de residuo orgánico (vegetal o animal) producto de la incorporación de nutrimentos inorgánicos en moléculas orgánicas complejas (Guerrero 1993).

Cuando la MO no ha completado un proceso de descomposición que libera nuevamente los nutrimentos inmovilizados en las moléculas orgánicas, se considera que se encuentra en estado fresco o crudo. En esta condición, la presencia de compuestos secundarios o intermedios de la descomposición limitan su aprovechamiento. La MO madura o en completa descomposición (procesos de humificación y mineralización), se presenta como la mejor forma para su utilización, ya que los elementos minerales contenidos en el material están disponibles en forma soluble (Flaig 1975).

Como norma general, ya que la MO se encuentra constituida por residuos vegetales y/o animales en el suelo, se puede decir que el estiércol es más fácil de descomponer que el detrito vegetal, puesto que el primero se encuentra en un estado más avanzado de descomposición y no presentan constituyentes orgánicos importantes de los tejidos vegetales como la lignina y la celulosa, que retardan el proceso de descomposición (Mueller-Saemann y Kotschi 1994).

Hablar de un tipo de materia orgánica es casi imposible, dado que la naturaleza de su origen y la composición de los materiales orgánicos son muy diferente entre sí, lo cual tiene sus efectos en los procesos de descomposición del material. Haciendo complicado su aprovechamiento con fines agropecuarios, de manera uniforme.

2.1.2.2. Proceso de descomposición natural de la materia orgánica

La descomposición de la MO constituye un elemento clave del ciclaje de nutrientes, y por lo tanto, de la sostenibilidad de los ecosistemas terrestres (Begon *et al.* 1986).

El proceso de descomposición de la MO puede ser resumido en dos fases: la humificación y la mineralización, que llevan a la transformación de la MO en elementos minerales solubles (Guerrero 1993).

En estos procesos participan grupos de agentes denominados desintegradores (hongos, bacterias, etc.) y detritívoros (lombrices). Los primeros, están constituidos por una diversidad de microorganismos que en sucesión aprovechan moléculas orgánicas simples y luego descomponen los materiales estructurales. La participación de los detritívoros consiste en fragmentar los tejidos y aumentar la superficie de contacto para que actúen los desintegradores. La descomposición de la MO en forma natural es un proceso lento, asociado con una serie de factores ambientales (humedad, temperatura, radiación, etc.) que definen la estructura de las comunidades naturales conocidas (Finegan 1995).

2.1.2.3. Los abonos orgánicos en la agricultura

En la producción agropecuaria se pueden identificar diferentes fuentes de MO, a través de las actividades agrícola, ganadera, doméstica y agroindustrial. Entre las principales fuentes,

destacan los residuos de cosechas, residuos de malezas, los estiércoles y los residuos y subproductos de la agroindustria (Guerrero 1993).

Un material orgánico se considera abono o enmienda orgánica cuando es incorporado al suelo con el objetivo de proporcionar nutrientes a las plantas, actuar sobre características físico-químicas del suelo ó como estimulante de procesos metabólicos en las plantas (Gajdos 1992, Guerrero 1993).

Dentro de la categoría de abono orgánico se consideran diferentes materiales orgánicos, identificados de acuerdo a su origen o forma de utilización. Este es el caso de los estiércoles, los abonos verdes, rastrojos de cultivos, turba, aguas residuales, mulch y los composts (Guerrero 1993).

En Costa Rica, otros materiales orgánicos muy utilizados en la agricultura como abonos, lo constituyen la broza de café (epicarpio o cubierta del fruto junto con mesocarpio o tejido blando), el bagazo (residuo del tallo de la caña de azúcar que queda al extraer los azúcares), y la cachaza (residuo que se produce durante la extracción del azúcar), materiales estos que son residuos de la agroindustria (Ramírez 1983, Suárez de Castro 1983).

2.1.2.4. Descomposición controlada de la materia orgánica: compost ó abono orgánico fermentado

Los composts o abonos orgánicos fermentados son definidos como el producto de la descomposición de la mezcla de residuos orgánicos, bajo condiciones controladas (Gajdos 1992, Guerrero 1993, Mueller-Saemann y Kotschi 1994, Hoitink *et al.* 1997), y cuyo producto es lo suficientemente estable para ser almacenado y se puede aplicar al suelo sin provocar efectos negativos en este (Haug 1980).

El producto de la descomposición puede ser obtenido por procesos de predominio aeróbico, como es el caso del método Indore (en la cual se ponen en interacción residuos vegetales, una fuente de microorganismos como estiércol y algunos residuos como cal, cáscaras de huevo, etc., y agua) y el tipo bokashi, entre otros; o por vía anaeróbica, como el bioabono obtenido de los biodigestores (Guerrero 1993, CIPAV-FAO 1995, Luque 1995).

Se identifican cuatro fases en la obtención de composts aeróbicos: 1) fase lenta con incremento de respiración celular de los tejidos vegetales, 2) aumento progresivo de temperatura por multiplicación de microorganismos mesofílicos aerobios (20-45°C), 3) predominio de microorganismos termofílicos (60-70°C) que degradan compuestos estructurales, y 4) finalmente el curado o maduración, cuando disminuyen la tasa de descomposición, la generación de calor y la temperatura (Hoitink *et al.* 1997).

Aunque existen diferentes grupos de materiales orgánicos que pueden ser utilizados como sustratos para el compostaje, así como la existencia de más de 20 métodos diferentes para obtenerlo (Poincelot 1975, Pereira-Neto y Stentiford 1992, Hoitink *et al.* 1997), las principales condiciones que debe reunir la mezcla a realizar se resumen en:

a) Relación Carbono/Nitrógeno (C/N): relación inicial de 30-35/1 para obtener una relación final de 16-18/1.

b) Contenido de humedad: debe mantenerse entre 50 y 60% durante el proceso de compostaje, con un ámbito óptimo entre 40 y 50% cuando se inicia el curado o maduración.

c) Temperatura: debe ser regulada una vez que se alcanza la fase termofílica de 60-70 °C, nivel que debe mantenerse para lograr una descomposición uniforme del material. Se recomiendan valores finales de 40 °C en la fase de curación.

d) pH: debe tender hacia la neutralidad durante el proceso, con valores finales en un ámbito de 7 a 8 (Parr y Wilson 1980, Gajdos 1992, Mueller-Saemann y Kotschi 1994).

La fase crítica del proceso es la que ocurre entre 60 y 70°C, que requiere prácticas de aireación y estabilización de la temperatura, con el objetivo de liberar al producto final de patógenos y semillas de malezas, y disminuir la pérdida de microorganismos benéficos (Hoitink *et al.* 1997).

Durante la etapa de curación, ocurre la recolonización del compost por los microorganismos mesofílicos (Hoitink *et al.* 1997). Esta fase es clave para obtener la mayor población de organismos antagonistas (bacterias, levaduras, hongos y actinomicetes) que puedan limitar el establecimiento de poblaciones patogénicas.

A diferencia de los procesos de descomposición natural de la MO, en los composts se prioriza la participación de microorganismos, logrando acelerar el proceso con la selección de los materiales y control de los factores físicos (humedad, temperatura, aireación, etc.).

2.1.3. Control biológico de patógenos

2.1.3.1. Concepto y estrategias del control biológico

Para la definición de control biológico ha sido difícil conseguir consenso entre los investigadores; refiriéndose al control biológico de patógenos, se puede decir que: “es la reducción de la cantidad de inóculo de un patógeno o de su actividad productora de enfermedad, a través de uno o más organismos diferentes al hombre” (Baker 1985), incluyendo el mismo hospedante (Baker 1987).

El interés principal del control biológico se ha dirigido a patógenos que causan enfermedades en el sistema radical de las plantas, en especial a hongos residentes del suelo (Bustamante 1994a). Otros organismos, como el caso de bacterias que sobreviven en el suelo merecen atención de ser controladas por esta vía.

Los suelos supresivos pueden ser una alternativa a desarrollar que debemos estudiar para manejar los patógenos que sobreviven en el suelo, ya que la actividad de éstos en el suelo es mínima a diferencia que en los suelos conductivos, donde este tipo de microorganismos tienen ventajas para atacar las especies de cultivos (Chet y Baker 1980).

2.1.3.2. Los abonos orgánicos como herramientas de control biológico

La biodiversidad de microorganismos benéficos en el suelo debe ser conservada. La materia orgánica facilita que los organismos existentes en el suelo conformen un equilibrio entre los patógenos y sus enemigos naturales.

Los abonos orgánicos mejoran la estructura, previenen la erosión del suelo, aumentan la retención de humedad y ayudan a prevenir el estrés hídrico de las plantas. Aunado a esto, liberan nutrimentos al suelo y ayudan al desarrollo y crecimiento de la microflora, la cual puede ayudar a controlar enfermedades en los cultivos (Palti 1981, Vandevivere y Ramírez 1995).

Cuando se piensa en materia orgánica, se ha enfocado especial atención a los abonos orgánicos fermentados. Estos presentan una variabilidad en su composición, dada la diferencia que existe entre los materiales usados y el sitio donde se quiera hacer su fabricación. La calidad de los compost debe ser consistente para que su empleo resulte exitoso en el control biológico de enfermedades de cultivos hortícolas principalmente. La tasa de respiración es uno de los procedimientos que se pueden emplear para verificar su estabilidad (Hoitink *et al.* 1997).

Es necesario dirigir de una manera uniforme el uso de los abonos orgánicos fermentados a nivel de campo, ya que los agricultores deben conocer las proporciones de los materiales utilizados, así como la época de aplicación. El uso de materia orgánica, además de contribuir con las características físicas y nutricionales del suelo, facilita el desarrollo y crecimiento de microorganismos, los cuales pueden suprimir la propagación de patógenos en el suelo (Baker 1987, Vandevivere y Ramírez 1995). Esto reafirma que los compost deben ser preparados y

estabilizados adecuadamente, para lograr el nivel de descomposición necesario para que el control biológico sea factible.

Como ejemplo, desde principios de los años setenta, los composts han sido utilizado como sustituto de la turba, y se han usado en el control de enfermedades causadas por patógenos de suelo (Hoiting *et al.* 1991, Zhang *et al.* 1996). Se ha observado que la relación entre los microorganismos del suelo y el parasitismo de hongos pueden explicar el control de enfermedades por efecto del uso de composts (Lumsden *et al.* 1983, Chen *et al.* 1988).

Desde un punto de vista amplio, existen dos mecanismos para el control biológico de patógenos, el general y el específico. Los procesos involucrados se basan en la competencia, la antibiosis, el hiperparasitismo y la inducción de resistencia sistémica adquirida en la planta huésped (Zhang *et al.* 1996, Hoitink *et al.* 1997). Se puede distinguir el general del específico, en que el primero incluye procesos que pueden afectar a un amplio espectro de organismos y el específico solo utiliza procesos que tienen efecto sobre unos pocos o un solo patógeno. Por ejemplo *Phytophthora spp.* y *Pythium spp.* son suprimidos mediante supresión general (Chen *et al.* 1988, Madelbaum y Hadar 1990, Hoitink *et al.* 1997) y *Rhizoctonia solani* mediante supresión específica (Hoitink *et al.* 1991).

2.2. MATERIALES Y METODOS

La primera etapa de los experimentos se realizó en un período de tres meses, manteniendo las plantas bajo condiciones de casa de mallas. El objetivo de este primer experimento fue seleccionar aquellos tratamientos que permitieran un mejor desarrollo de las plantas y un menor grado de severidad de la marchitez bacterial, por la interpretación de las variables evaluadas.

2.2.1. Ubicación de los experimentos

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, temperatura y humedad relativa promedio anual de 2065 mm, 21,7°C y 87%, respectivamente.

2.2.2. Enmiendas orgánicas utilizadas

Los materiales utilizados como enmiendas orgánicas fueron: broza de café, cachaza, bokashi, compost tipo 1, compost tipo 2, y una mezcla de los tres primeros (broza de café + cachaza, broza de café + bokashi, cachaza + bokashi, broza de café + cachaza + bokashi). Estas se mezclaron con suelo desinfectado en una proporción en base a volumen de 1:4.

Los tratamientos se dividieron en tres grupos, aquellos donde se utilizaron los sustratos solos, que correspondieron al suelo estéril mezclado con la broza de café y con la cachaza, sin ningún otro material orgánico. Aquellos donde se mezcló suelo estéril con el bokashi o con los dos tipos de compost, se identificaron como abonos orgánicos fermentados. Mientras los

tratamientos donde se combinaron broza de café, cachaza y bokashi fueron definidos como mezclas.

La broza de café y la cachaza se obtuvieron de los beneficios de café e ingenios de caña de azúcar cercanos al centro de investigación. El bokashi se preparó de acuerdo con las recomendaciones del Proyecto de Extensión en Agricultura Orgánica (UCR-INA-JOCV) (Anexo 1). Los composts fueron suministrados por el Proyecto Frutas y Vegetales Tropicales (CATIE-USDA).

La broza o pulpa de café es el epicarpio o cubierta roja del fruto de café junto con casi la totalidad del mesocarpio o tejido blando, hialino, que rodea al endocarpio (pergamino) (Suárez de Castro 1983). Este producto se desprende del grano en la fase inicial del beneficio y corresponde aproximadamente al 43% del peso fresco del fruto de café. Una estimación de la composición química de la broza (74-78% de humedad) corresponde con: materia orgánica 90-92%, nitrógeno total (N_2) 1,4 -1,9%, fósforo total P_2O_5 0,3-0,35%, potasio (K_2O) 3,5-3,7%.

La cachaza es uno de los residuos del proceso de extracción del azúcar de la caña. Este subproducto contiene un promedio de materia orgánica de 81,7% y algunos elementos nutritivos como N, P, K, Mg y S. Del procesamiento de cada tonelada de caña se obtienen de 20 a 30 kg de cachaza. En Costa Rica es poca su utilización como abono orgánico (Ramírez 1983).

El bokashi 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 período de dos semanas (Shuichi Okumoto, 1996, PAO-JOCV/UCR, Estación Fabio Baudrit, Alajuela, com. pers.).

2.2.3. Desinfestación del suelo

El suelo utilizado fue obtenido del Banco de germoplasma (CABIRIA) del CATIE. El suelo fue desinfestado con dazomet (40 g/m^2), dejando actuar el producto durante 17 días.

2.2.4. Análisis físico-químico de los sustratos utilizados

El suelo mezclado con cada una de las enmiendas orgánicas, donde se sembraron las plantas se analizó en el Laboratorio de Análisis de Fertilidad de Suelos, Tejido Vegetal y Aguas del CATIE. Se determinó el contenido de N, P, K, Ca, Mg, Na, Cu, Zn, Mn, pH, materia orgánica (MO), textura (text) y capacidad de intercambio catiónico (CIC) presentes en los mismos.

2.2.5. Material vegetal evaluado y manejo del cultivo

Se utilizó la variedad de tomate Hayslip, por la susceptibilidad a *P. solanacearum*, y por su uso común como tomate de mesa en Costa Rica y en la región centroamericana. La variedad tiene características de hábito de crecimiento determinado, tamaño mediano y resistente a enfermedades producidas por *Verticillium*, *Fusarium* (razas 1 y 2), *Alternaria* y *Stemphyllium* (CATIE 1992).

En la mezcla de suelo con la materia orgánica preparada dos semanas previas y colocada en macetas de polietileno Polyplast no. 1000 de 5 kg de capacidad, se sembraron 3 semillas por punto. Se seleccionaron dos plántulas por maceta para la evaluación de las variables.

Las plantas se fertilizaron 15 días después de la emergencia (dde) con Bayfolan (N-P-K)

(2 mL.L⁻¹). El suelo se mantuvo a capacidad de campo, lo cual requirió hacer el riego a intervalos de dos o tres días.

2.2.6. Preparación del inóculo e inoculación de *P. solanacearum*

El inóculo de *P. solanacearum* se obtuvo de plantas de tomate con síntomas típicos de marchitez bacterial en condiciones de campo. Se cortó la parte basal del tallo de las plantas enfermas, previo lavado con agua y jabón. Secciones de tallo cortadas entre 2 y 3 cm de longitud se desinfectaron con hipoclorito de sodio (HClO) al 5% por 3 min y se lavaron con agua destilada estéril (Castaño 1994). Se hicieron cortes longitudinales del tejido y se introdujeron en agua destilada estéril durante 45 min. Obtenido el flujo bacteriano, se hicieron diluciones hasta 10⁻⁵ que se sembraron en medio cloruro de tetrazolio (TZC) (Kelman 1954), para la identificación de las colonias de *P. solanacearum* (Grimault y Prior 1993).

Las colonias típicas de *P. solanacearum* seleccionadas (Kelman 1954, Lelliott y Stead 1987) fueron purificadas y mantenidas en viales con agar nutritivo (AN) inclinado y aceite mineral estéril. También se dejaron las cepas seleccionadas en agua destilada estéril a 21°C (Kelman y Person 1961). Estas cepas se reprodujeron en TZC a 28°C, 48 h antes de hacer la inoculación en las plantas.

2.2.7. Procedimiento experimental y tratamientos

Las plantas de 45 días de sembradas (dds) o 40 días después de la emergencia (dde) se inocularon con 25 mL de una suspensión (10⁸ ufc.mL⁻¹), preparada con la mezcla de cepas de *P. solanacearum* provenientes de las localidades de Guayabo y Alajuela. Se utilizó el método de absorción por el hospedante con corte de raíz (French y Hebert 1982, Grimault y Prior 1993, Grimault *et al.* 1994).

Los tratamientos estuvieron constituidos por las diferentes mezclas de las enmiendas orgánicas indicadas en el numeral 2.2.2., con suelo estéril, más un testigo absoluto, que consistió de suelo sin enmendar. Estos se identificaron de la siguiente forma:

SE: suelo estéril (testigo);

SEBr: suelo estéril + broza de café;

SECh: suelo estéril + cachaza;

SEBk: suelo estéril + bokashi;

SEC1: suelo estéril + compost 1;

SEC2: suelo estéril + compost 2;

SEBrCh: suelo estéril + broza de café + cachaza;

SEBrBk: suelo estéril + broza de café + bokashi;

SEChBk: suelo estéril + cachaza + bokashi y

SEBrChBk: suelo estéril + broza de café + cachaza + bokashi.

2.2.8. Variables evaluadas, análisis estadístico y diseño experimental

Se midieron variables de crecimiento como altura de la planta y diámetro del tallo. La altura se midió en centímetros desde la base hasta el ápice principal del tallo, mientras que el diámetro se obtuvo en milímetros con ayuda de un vernier, a 15 cm por encima del cuello de las plantas. Estas evaluaciones se realizaron semanalmente, 15 días después de la siembra y hasta el momento que las plantas alcanzaron los 80 días de edad.

Se registraron los valores de temperatura y humedad relativa en el sitio donde fueron sembradas las plantas (casa de mallas), los días posteriores a la inoculación del patógeno (Anexo 2).

Una vez inoculadas las plantas de cada tratamiento, se mantuvieron bajo observación hasta la aparición de síntomas de marchitez bacterial. A partir de la primera manifestación de

enfermedad, las evaluaciones de severidad se efectuaron diariamente durante 40 días consecutivos, utilizando la escala de Kempe y Sequeira (1983), donde los grados de severidad de la enfermedad fueron:

- 0: planta sin síntomas;
- 1: 0-25% en promedio de la planta con marchitez;
- 2: 25-50% de planta marchita;
- 3: 50-75% de planta marchita y
- 4: del 75 al 100% de la planta con marchitez bacterial.

También se determinó el peso seco y el contenido de humedad de la parte aérea de la planta, además del análisis de tejido foliar de las plantas en cada tratamiento al final de la prueba, transcurrido un tiempo de 80 días después de la siembra y se realizó.

Los resultados fueron procesados asumiendo que la severidad era un continuo, se calculó el área bajo la curva de progreso de cada una de las variables (ABCP) para cada uno de los tratamientos durante el período de estudio. Se consideró lo descrito por Shaner y Finney (1977), para las variables de acuerdo con la ecuación:

$$ABCPE = \text{SUM} [(Y_{i+1} + Y_i) / 2] [(t_{i+1} - t_i)]$$

donde: SUM = sumatoria de n observaciones
 Y_i = severidad de la enfermedad en la iésima observación
 t_i = tiempo (días) después de la inoculación en la iésima observación

El ABCP de cada variable es un método de integración trapezoidal que ayuda a determinar la cantidad de enfermedad acumulada durante el tiempo del estudio, permitiendo mejor información de la respuesta de los tratamientos estudiados.

Las variables se analizaron con la prueba de Bonferroni, la cual permite una comparación para establecer criterios de selección entre los tratamientos.

Se seleccionaron para las pruebas posteriores las mejores enmiendas orgánicas por su efecto supresivo (menor severidad) a la marchitez bacterial y buen desarrollo de las plantas.

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado (DCA), con diez tratamientos y cinco repeticiones por tratamiento. La unidad experimental estuvo constituida por cada una de las macetas, y la unidad de muestreo fueron cada una de las plantas.

2.3. RESULTADOS Y DISCUSION

2.3.1. Contenido de nutrimentos en la mezcla de suelo

El análisis de suelo indicó que todas las enmiendas orgánicas le aportaron nutrimentos al suelo, con excepción del Cu que su contenido fue menor en todos los tratamiento con enmienda orgánica y el Mn en algunos casos disminuyó sus valores con relación al suelo testigo sin enmendar (Cuadro 1).

Cuadro 1. Resultados del análisis físico-químico de los sustratos preparados con la mezcla de suelo estéril y las enmiendas orgánicas.

Mezclas ¹	pH	M.O.	N	P	Ca	Mg	K	Na	Cu	Zn	Mn	Text.
		%	%	mg/kg	cmol(+)/kg			mg/kg				
SE	5,8	5,72	0,26	15,7	10,3	2,9	0,6	0,2	24,8	7,7	4,3	A
SEBr	5,4	11,16	0,52	21,2	16,4	3,6	0,6	0,2	21,1	10,6	3,8	FA
SECh	7,2	11,20	0,45	21,8	23,4	3,6	1,0	0,2	17,5	9,3	6,0	FA
SEBk	7,5	7,64	0,38	121,8	22,5	4,6	2,6	0,6	16,8	10,6	4,6	FA
SEC1	6,2	16,40	0,76	233,4	27,5	9,4	1,6	0,5	14,5	25,1	3,3	FA
SEC2	6,2	10,49	0,49	375,5	21,8	8,1	2,1	0,2	19,5	28,1	3,3	FA
SEBrBk	6,7	9,57	0,40	81,2	23,7	4,7	1,8	0,4	17,2	10,6	3,1	FA
SEBrCh	6,5	9,04	0,39	18,5	21,8	3,6	0,8	0,2	20,1	9,3	3,0	FA
SEChBk	7,3	9,19	0,40	68,3	23,3	4,1	2,0	0,4	17,8	10,6	4,4	FA
SEBrChBk	6,7	8,61	0,40	60,2	20,9	3,9	1,4	0,3	18,5	10,2	3,6	FA

¹SE: suelo estéril (testigo); SEBr: suelo estéril + broza; SECh: suelo estéril + cachaza; SEBk: suelo estéril + bokashi; SEC1: suelo estéril + compost 1; SEC2: suelo estéril + compost 2; SEBrBk: suelo estéril + broza + bokashi; SEBrCh: suelo estéril + broza + cachaza; SEBrChBk: suelo estéril + broza + cachaza + bokashi; A: arcillosos; FA: franco-arcilloso

El tratamiento SEC1 fue el que mayor aporte presentó en MO, N, Ca y Mg. Esta característica puede ser debida a la presencia de gallinaza, la cual es uno de los componentes presentes en el compost 1, dado que la gallinaza presenta altos contenidos de N y Ca (Guerrero 1993).

El compost tipo bokashi seguido por el sustrato cachaza le aportaron el menor contenido de N al suelo. El incremento en el contenido de P del suelo con los tratamientos SEBk, SEC1 y SEC2 fue considerable, llegando a superar el contenido del suelo testigo en más de 10 veces. Los aportes de Na y Zn fueron superiores cuando se aplicó Bokashi y compost 1, y los dos compost, respectivamente.

El contenido de Ca, Mg, K y Zn se incrementó en los tratamientos dentro de los ámbitos óptimos de nutrimentos en el suelo (Bertsh 1995), con valores más altos para el Mg, K, Zn en los tratamientos SEC1 y SEC2.

También la relación de bases se mantuvo dentro del ámbito recomendado en suelos, con la excepción de SEBr y SEBrCh para la relación Ca/K (Cuadro 2). El tratamiento SEBk fue el que presentó los menores valores de las relaciones Ca/K, Mg/K y Ca+Mg/K. Los tratamientos con compost tipo 1 y 2 presentaron la relación menor en cuanto a Ca/Mg.

Cuadro 2. Variación de la relación de bases del análisis de suelo en los tratamientos con aplicación de abonos orgánicos.

Tratamiento	Ca/Mg	Ca/K	Mg/K	Ca+Mg/K
Suelo estéril (SE)	4,5	17,1	4,8	22,0
SE + broza	4,5	27,3	6,0	20,0
SE + cachaza	6,5	23,4	3,6	27,0
SE + bokashi	4,8	8,6	1,7	10,4
SE + compost 1	2,9	17,1	5,8	23,0
SE + compost 2	2,6	10,3	3,8	14,2
SE + Broza + Bokashi	5,0	13,1	2,6	15,7
SE + Broza + Cachaza	6,0	27,5	4,5	31,7
SE + Cachaza + Bokashi	5,6	11,6	2,0	13,7
SE + Broza + Cachaza + Bokashi	5,3	14,9	2,7	17,7
Recomendado ²	2,0-5,0	5,0-25,0	2,5-15,0	10,0-40,0

²Tomado de Bertsh, F. 1995. La fertilidad de suelos y su manejo. Testigo: suelo estéril.

Una de las consideraciones atribuidas a los abonos orgánicos es el aporte de nutrimentos al suelo (Cuervo y Rivas 1997, Hoitink 1997). En este experimento se confirman una vez más estas afirmaciones, presentándose mayor contenido de nutrimentos en las mezclas de suelo con abonos orgánicos fermentados.

2.3.2. Efecto de enmiendas orgánicas sobre las variables de crecimiento

La variable altura de planta no presentó diferencias estadísticas ($p \leq 0,05$) entre tratamientos (Cuadro 3). El mayor valor promedio de área bajo la curva de progreso de altura (ABCPA) se obtuvo con SEC2 y el menor se observó en el tratamiento con el sustrato SEBrBkCh. A lo largo del período de evaluación, se comportaron en promedio mejor que el testigo los tratamientos SEBk, SEC1, SEC2 y SEBrBk (Figura 1)

Cuadro 3. Valores promedios de Area bajo la curva de progreso de altura (ABCPA) de plantas de tomate y significancia para los tratamientos que presentaron abonos orgánicos en pruebas bajo casa de mallas, CATIE, Turrialba.

Tratamiento	ABCPA
Suelo estéril (SE)	4903,4 ab ¹
SE + broza	4844,0 ab
SE + cachaza	4662,0 ab
SE + bokashi	5035,7 ab
SE + compost 1	4919,2 ab
SE + compost 2	5127,4 a
SE + Broza + Bokashi	5082,5 ab
SE + Broza + Cachaza	4601,4 ab
SE + Cachaza + Bokashi	4792,9 ab
SE + Broza + Cachaza + Bokashi	4494,4 b

¹Medias con letras iguales no difieren significativamente entre sí por la prueba de Bonferroni ($p \leq 0,05$). Testigo: suelo estéril.

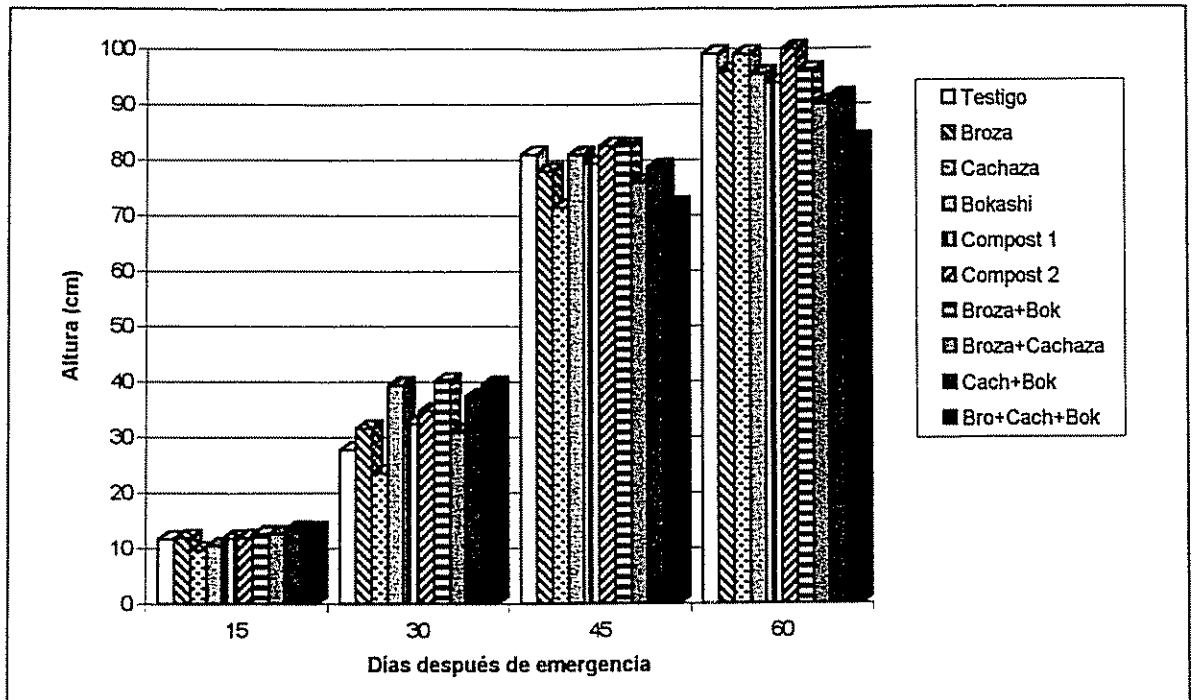


Figura 1. Altura del tallo de plantas de tomate en respuesta al uso de enmiendas orgánicas, 15, 30, 45 y 60 días después de la emergencia del cultivo bajo condiciones de casa de mallas, CATIE, Turrialba.

Cuadro 4. Valores promedio de Area bajo la curva de progreso de diámetro (ABCPD) de plantas de tomate expuestas a nueve tratamientos a base de sustratos orgánicos bajo condiciones de casa de mallas, CATIE, Turrialba.

Tratamiento	ABCPD
Suelo estéril (SE)	443,1 de ¹
SE + broza	470,1 cd
SE + cachaza	401,7 e
SE + bokashi	525,9 a
SE + compost 1	492,4 abcd
SE + compost 2	508,7 abc
SE + Broza + Bokashi	500,7 abc
SE + Broza + Cachaza	472,3 bcd
SE + Cachaza + Bokashi	520,8 ab
SE + Broza + Cachaza + Bokashi	529,9 a

¹Medias con letras iguales no difieren significativamente entre sí por la prueba de Bonferroni ($p \leq 0,05$).

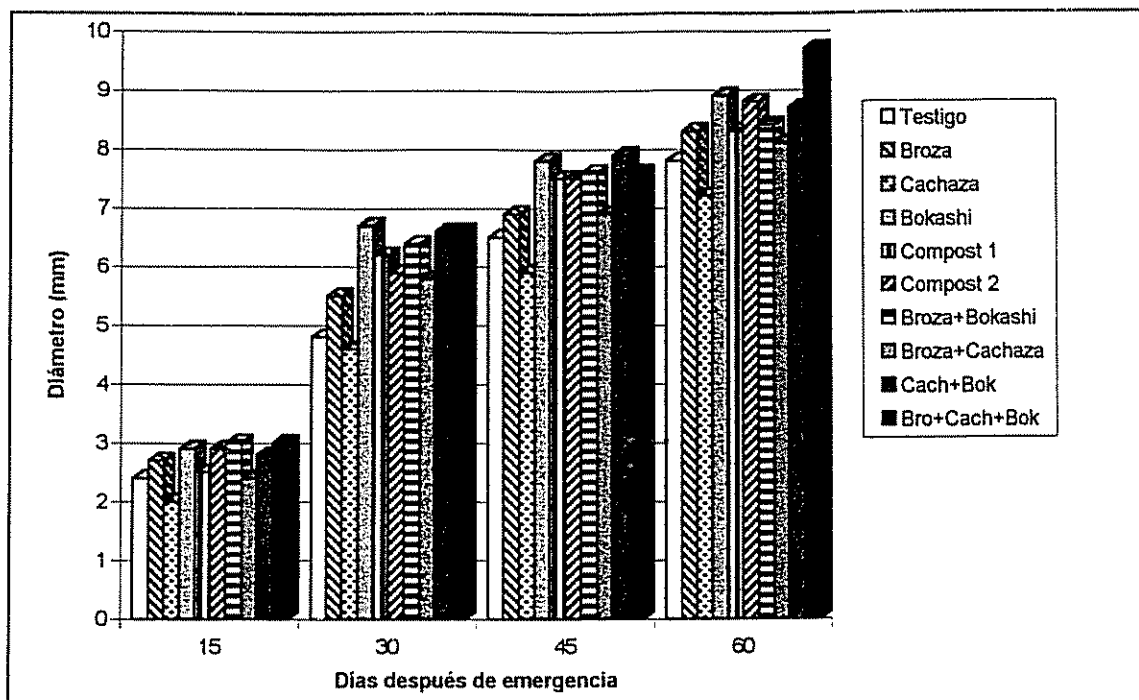


Figura 2. Diámetro de tallo de plantas de tomate expuestas a nueve sustratos orgánicos, 15, 30, 45 y 60 días después de la emergencia, bajo condiciones de casa de mallas, CATIE, Turrialba.

Al comparar los tratamientos, la mejor respuesta para la variable diámetro se obtuvo con los tratamientos que incluyeron composts (tipo bokashi y tipo 2) en relación al testigo. Esta diferencia fue estadísticamente significativa al 5% (Cuadro 4 y Figura 2). Los sustratos broza y cachaza fueron estadísticamente diferentes entre sí y el sustrato broza presentó un mejor comportamiento que la cachaza, pero fue igual al testigo. Los tratamientos que incluyeron compost tipo 1 y 2 no fueron estadísticamente diferentes entre ellos.

Comparando los tratamientos con compost (bokashi, compost 1 y 2) con los sustratos aplicados solos (broza y cachaza) se observó diferencias entre aquellos y la cachaza, mientras la broza solo presentó diferencias con el bokashi. Los tratamientos que presentaron bokashi solo o en combinación no presentaron diferencias significativas entre sí. El mayor diámetro correspondió al tratamiento con la mezcla SEBrBkCh y el menor al sustrato SECh.

Los valores promedio de peso seco fueron mayores en comparación al testigo en los tratamientos que presentaron composts 1 y 2, bokashi solo y en combinación con broza (Cuadro 5 y Figura 3). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas al 5%. Al igual que para la variable diámetro, la broza y la cachaza fueron diferentes estadísticamente para la variable peso seco, siendo la broza superior a la cachaza, pero igual al testigo.

Los mayores valores promedio de peso seco lo presentaron los tratamientos con abonos fermentados (bokashi y compost) y el menor al tratamiento con cachaza. Al comparar los primeros, SEC1 y SEC2 no tuvieron diferencias entre sí, pero si hubo diferencias estadísticas entre los tratamientos SEC1 y el SEBk.

Al comparar los sustratos solos (broza y cachaza) con los abonos fermentados se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre estos dos grupos de tratamientos.

Cuadro 5. Valores promedio de peso seco de la parte aérea de las plantas de tomate de acuerdo a su crecimiento en diferentes tratamientos con sustratos orgánicos bajo condiciones de casa de mallas, CATIE, Turrialba.

Tratamiento	Peso seco (g)
Suelo estéril (SE)	44,1 efg ¹
SE + broza	68,8 cde
SE + cachaza	26,2 g
SE + bokashi	103,8 bc
SE + compost 1	151,3 a
SE + compost 2	135,5 ab
SE + Broza + Bokashi	89,7 cd
SE + Broza + Cachaza	30,7 fg
SE + Cachaza + Bokashi	64,2 def
SE + Broza + Cachaza + Bokashi	80,2 cde

¹Medias con letras iguales no difieren significativamente entre sí por la prueba de Bonferroni ($p \leq 0,05$).

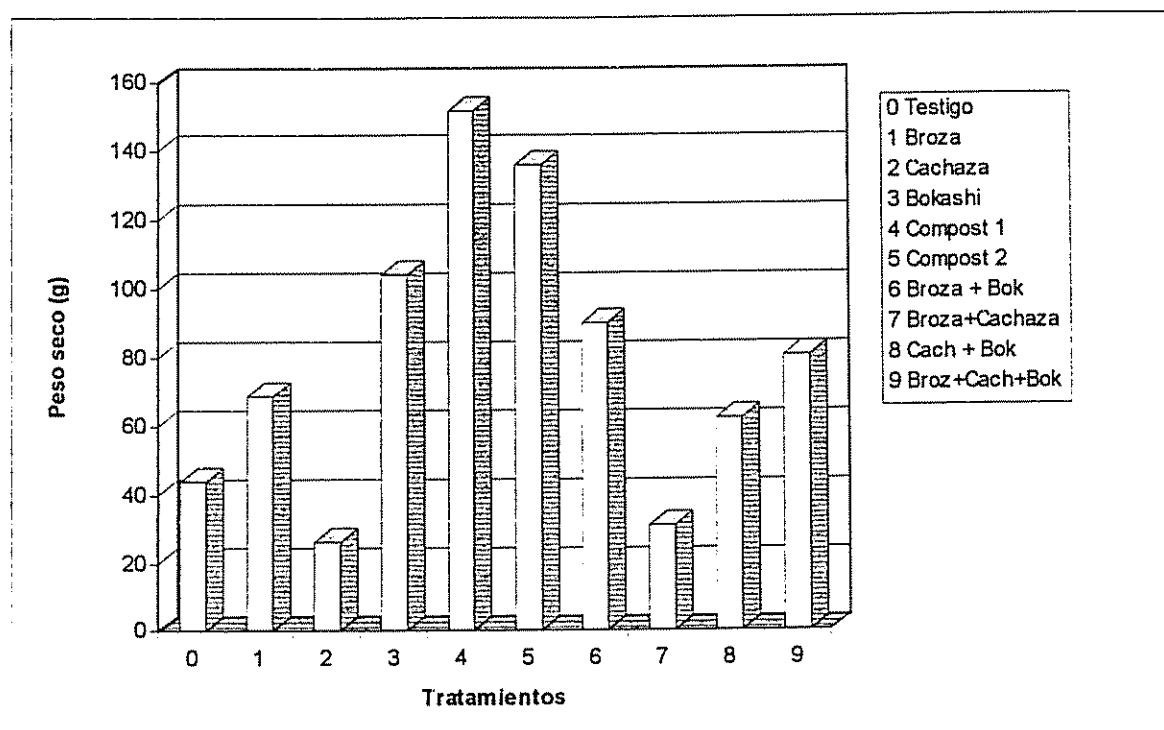


Figura 3. Peso seco de la parte aérea de plantas de tomate en respuesta a nueve tratamientos con base en enmiendas orgánicas inoculadas con *P. solanacearum* y mantenidas en condiciones de casa de mallas, CATIE, Turrialba.

Los valores más bajos en contenido de humedad lo presentaron los tratamientos con abono orgánico fermentado (Figura 4). Dentro de este grupo, contenido de humedad del compost 2 fue estadísticamente diferente al testigo (Cuadro 6). Los sustratos broza y cachaza no mostraron diferencias estadísticas entre sí. Los abonos fermentados no obtuvieron diferencias significativas al compararlos entre sí. No se observó ninguna diferencia estadística en los tratamientos que presentaron bokashi, ni en los que llevaron broza en su composición.

Cuadro 6. Valores promedio del contenido de humedad en plantas de tomate sometidas al inóculo de *P. solanacearum* en tratamientos a base de sustratos orgánicos, en casa de mallas, CATIE, Turrialba.

Tratamiento	Contenido de humedad
Suelo estéril (SE)	75,2 abc ¹
SE + broza	76,0 abc
SE + cachaza	79,9 a
SE + bokashi	71,5 cd
SE + compost 1	72,7 bcd
SE + compost 2	69,9 d
SE + Broza + Bokashi	76,5 abc
SE + Broza + Cachaza	77,6 ab
SE + Cachaza + Bokashi	76,5 abc
SE + Broza + Cachaza + Bokashi	74,2 bcd

¹Medias con letras iguales no difieren significativamente entre sí por la prueba de Bonferroni ($p \leq 0,05$).

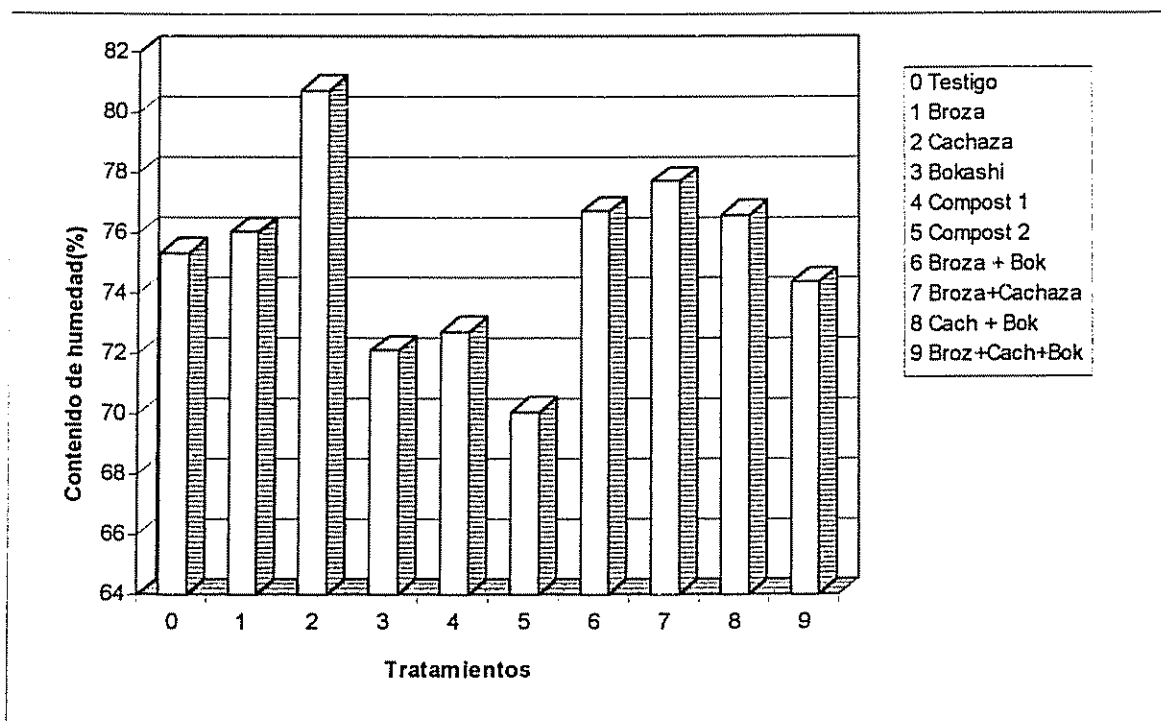


Figura 4. Contenido de humedad de la parte aérea de plantas de tomate en respuesta a nueve tratamientos de sustratos orgánicos con inoculación de *P. solanacearum* y mantenidas bajo condiciones de casa de mallas, CATIE, Turrialba.

Las respuestas en la variable altura de planta del cultivo de tomate no mostraron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, cuando se usó enmienda orgánica mezclada con suelo en comparación al uso de suelo sin enmendar. Este comportamiento en la altura de las plantas es común de observar en los “invernaderos” donde se realizó el experimento. Las plantas se hacen muy altas en busca de luz, y quizás esta sea la razón por la cual no se observó diferencias al medir esta variable.

Los mejores valores de diámetro y peso seco se encontraron cuando se aplicaron al suelo los abonos fermentados (bokashi y composts). Estas materias orgánicas presentaron buenos contenidos nutricionales en comparación a los demás tratamientos, especialmente en los elementos N, P, K, Ca y Mg, a excepción del N en el tratamiento con bokashi.

En condiciones de suelos centroamericanos se considera que el N y el P son los elementos con los cuales se obtiene una mayor respuesta de crecimiento en el cultivo de tomate (CATIE 1990). Sin embargo, en este ensayo el efecto en la respuesta del diámetro y el peso seco puede estar más relacionado con un balance general del contenido de nutrimentos que con el incremento de algún elemento en particular.

2.3.3. Contenido de nutrimentos en el tejido foliar

El análisis foliar demuestra el aprovechamiento de los nutrientes presentes en el suelo por parte de las plantas en presencia del patógeno.

P. solanacearum en la planta interfiere en la absorción y translocación de los nutrimentos suplidos y absorbidos por la planta, y en la producción de materia seca (Cavalcante *et al.* 1996). El patógeno puede causar desbalance nutricional en las plantas por utilización de los nutrimentos para su propio desarrollo o por la inducción de síntesis de otras sustancias por parte de las plantas.

El contenido de nutrimentos en el follaje de las plantas inoculadas con *P. solanacearum* fue igual o superior al testigo en los tratamientos con enmiendas orgánicas, para los elementos P, Ca, Mg y Zn (Cuadro 7). Los tratamientos que presentaron compost tipo 1 y 2 mostraron los mayores contenidos de estos elementos, además de N.

Cuadro 7. Contenido de nutrimentos en el tejido foliar de plantas de tomate sometidas al inóculo de *Pseudomonas solanacearum* tratadas con enmiendas orgánicas, en casa de mallas, CATIE, Turrialba.

Tratamiento	Ca	Mg	K	P	N	Cu	Mn	Zn
	%					mg/kg		
Suelo estéril (SE)	0,9	0,3	2,0	0,2	1,6	12,4	127,5	28,6
SE + broza	2,1	0,7	1,4	0,2	1,9	16,5	138,6	38,8
SE + cachaza	2,1	0,5	2,8	0,2	1,8	14,5	100,2	40,1
SE + bokashi	2,1	0,4	2,9	0,3	1,4	10,3	97,8	37,0
SE + compost 1	2,8	1,0	2,4	0,5	2,0	12,4	127,5	58,1
SE + compost 2	2,6	0,8	2,7	0,4	2,0	12,4	69,3	50,6
SE+Broza+Bokashi	1,6	0,4	1,6	0,2	2,0	10,3	78,0	28,6
SE+Broza+Cachaza	1,6	0,4	2,6	0,3	1,4	14,5	73,0	38,3
SE+Cachaza+Bok	2,1	0,4	2,9	0,3	1,3	10,3	53,2	32,6
SE+Broza+Cach+Bok	1,5	0,3	1,9	0,3	1,5	10,3	81,7	34,0

SE: testigo.

Muchos de los elementos minerales requeridos en el crecimiento de las plantas se han reportado, tanto para el incremento o reducción de la severidad de algunas enfermedades (Huber 1981, Palti 1981). Por ejemplo, la presencia de adecuadas concentraciones de K y Ca ha tenido éxito en la disminución de *P. solanacearum* en el cultivo de tomate. El K puede ayudar en la reducción de la marchitez bacterial, dado que este elemento interviene entre otras funciones, en la síntesis de proteínas y en translocación y movimiento de agua en las plantas (Huber 1981).

En este experimento los tratamientos que presentaron el más alto contenido de K y Ca, presentaron los menores valores de severidad de la marchitez bacterial. Es posible que

la presencia de estos elementos en concentraciones adecuadas hayan contribuido a esta respuesta.

El contenido de Ca en el testigo fue menor al 1%, y la deficiencia de este elemento en las plantas es considerada como un factor predisponente a la marchitez bacterial (Tanaka y Noda 1973). El Ca estimula la síntesis de proteínas en las plantas y participa en la composición de las paredes celulares del hospedante, dando una mayor resistencia al ataque de patógenos (Palti 1981).

El contenido de N, K, Cu y Mn en algunos tratamientos fue más bajo que en el testigo (suelo sin enmendar). Los tratamientos que incluyeron al compost tipo bokashi presentaron los menores valores de N, Cu y Mn. Para el elemento K, los valores más bajos correspondieron a los tratamientos que incluyeron broza de café en su composición.

Elementos como N, K, Ca, Mg y Zn se encontraron en mayor proporción tanto en suelo como en el follaje de las plantas en los tratamientos que incluyeron abonos fermentados.

2.3.4. Efecto de enmiendas orgánicas sobre la severidad de la marchitez bacterial.

Las plantas desarrolladas en SEBk, SEC1, SEC2 y SEBrBk tuvieron diferencias altamente significativas ($p \leq 0,05$) al testigo (Cuadro 8). Estos tratamientos presentaron el menor grado de severidad de la marchitez bacterial (Figura 5). Los tratamientos que presentaron el sustrato cachaza sola y en mezcla con broza no mostraron diferencias con el testigo y el grado de severidad de la enfermedad fue el más alto. Mientras, los abonos fermentados no fueron diferentes estadísticamente entre ellos, los sustratos orgánicos broza y cachaza si mostraron diferencias entre si.

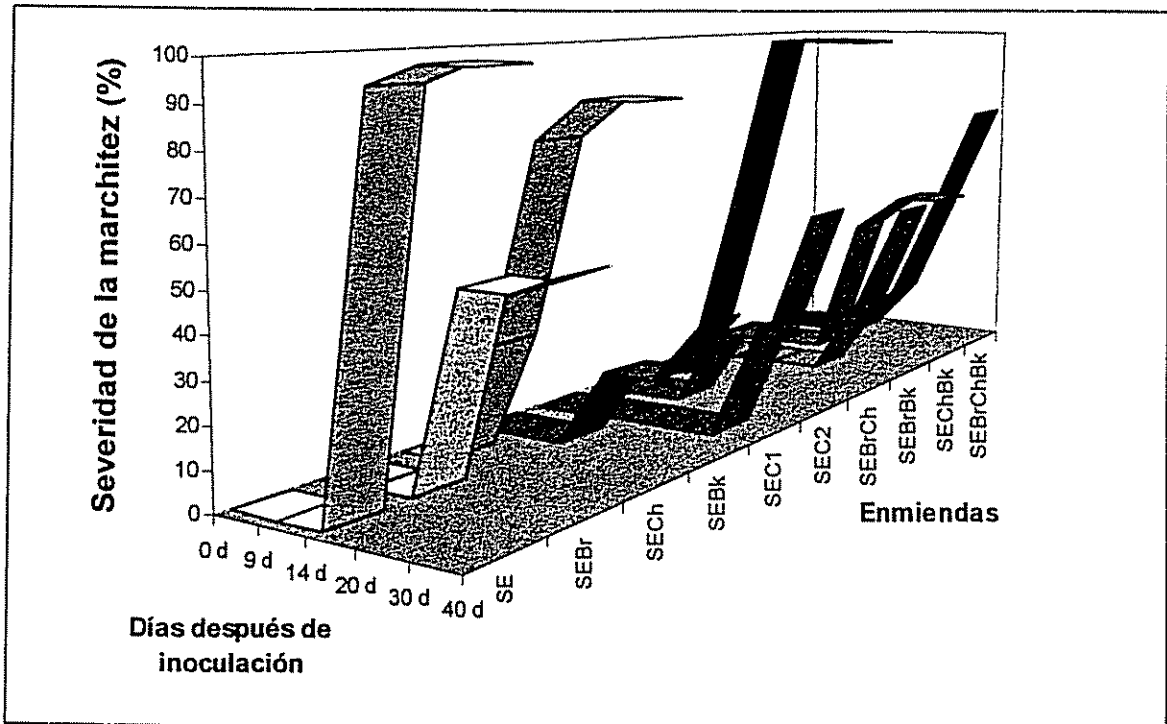


Figura 5. Comportamiento de la severidad de la marchitez bacteriana en plantas de tomate tratadas con enmiendas orgánicas al suelo, 9, 14, 20, 30 y 40 días después de inoculadas con *P. solanacearum* y en condiciones de invernadero, CATIE, Turrialba.

Cuadro 8. Valores del área bajo la curva de progreso de la marchitez bacteriana en plantas de tomate en invernadero inoculadas con *P. solanacearum* en respuesta al uso de enmiendas orgánicas en el suelo, CATIE, Turrialba.

Tratamiento	ABCPE
Suelo estéril (SE)	94,8 a ¹
SE + broza	46,9 b
SE + cachaza	89,8 a
SE + bokashi	26,8 bc
SE + compost 1	4,2 c
SE + compost 2	23,1 bc
SE + Broza + Bokashi	22,8 bc
SE + Broza + Cachaza	110,8 a
SE + Cachaza + Bokashi	42,9 b
SE + Broza + Cachaza + Bokashi	36,1 b

¹Medias con letras iguales no difieren significativamente entre sí por la prueba de Bonferroni ($p \leq 0,05$). SE: testigo.

La marchitez bacterial producida por *P. solanacearum* fue reducida de forma considerable cuando se añadió al suelo abono orgánico fermentado. Esta respuesta en el desarrollo de la enfermedad, además de estar relacionada con los aportes de nutrimentos hechos por las enmiendas orgánicas, puede estar influenciada por el componente biológico, ya que se incorporan microorganismos al suelo cuando se aplica composts; u otra posible explicación es el balance existente entre el componente biológico y la nutrición del suelo ideal para el desarrollo del cultivo.

Los contenidos de N, P, K, Ca y Mg fueron mayores cuando se incorporó composts tipo 1 y 2 al suelo. Esta misma tendencia fue observada en los contenidos de estos elementos en el tejido foliar de las plantas inoculadas con *P. solanacearum*.

El efecto principal del nitrógeno se reflejó en el vigor y en el crecimiento de las plantas. Los mayores contenidos de N en tejido de las plantas lo presentaron los tratamientos con composts tipo 1 y 2. En muchos casos, las plantas que se desarrollan con altos niveles de N toleran mejor el ataque de ciertas plagas (Chaverri y Alvarado 1992, Palti 1981). En el experimento la severidad de la marchitez bacterial no fue significativamente diferente cuando se aplicó al suelo compost tipo 1, que cuando se añadió el compost tipo 2.

Huber y Watson (1974), demostraron que además del contenido de N en las plantas también es importante la fuente del material nitrogenado que se aplica, esto por que la marchitez bacterial es menos favorecida cuando se aplica N en forma amoniacal que en forma nítrica. Para el caso del bokashi, donde los contenidos de N fueron bajos tanto en el suelo como en el tejido de las plantas, podría indicar que el N aportado por este compost haya sido predominantemente de forma amoniacal.

El P es un elemento esencial en muchas funciones del metabolismo de las plantas, pudiendo afectar su crecimiento, a través de la participación de este elemento en la síntesis de proteínas. Cavalcante *et al.* (1996), evaluaron la reacción de dos cultivares de tomate, uno resistente y otro susceptible a la marchitez bacterial con diferentes concentraciones de

nutrimentos en soluciones nutritivas y encontraron que al disminuir los niveles de P en las plantas del cultivar resistente, se redujo también el nivel de resistencia a la marchitez bacterial.

La alta concentración de K favorece la turgencia de las células, proceso que limita la penetración de patógenos a los tejidos de las plantas. Las plantas crecidas en el tratamiento con bokashi presentaron los niveles más altos de este elemento tanto en el suelo como en los tejidos. El K es un elemento presente en los abonos orgánicos, lo que repercute sobre la disponibilidad en el suelo por ser altamente concentrado en los tejidos (Bertsch 1995).

Los tratamientos con abonos orgánicos fermentados presentaron altos contenidos de Ca y Mg en el tejido de las plantas. El efecto del Ca sobre la severidad de la marchitez bacterial ya es conocido. Tanto cultivares de tomate susceptibles como resistentes a la marchitez bacterial han presentado mayor severidad a la enfermedad cuando crecen bajo condiciones de deficiencia de Ca y Mg (Cavalcante *et al.* 1996).

En pruebas realizadas bajo condiciones controladas de invernadero y campo, la incidencia de la marchitez bacterial en tomate se redujo cuando se aplicó cal (CaCO_3) al suelo (Mercadal 1989). También Michel *et al.* (1997), estudiando la interacción entre *P. solanacearum*, cultivos intercalados y aplicación de enmiendas al suelo encontraron que al añadir CaO y MgO se afectó la supervivencia de *P. solanacearum*, y al combinar estos compuestos con urea, se observó un mejor efecto.

Todos los tratamientos donde se aplicaron enmiendas orgánicas aumentaron el pH del suelo, con la excepción del sustrato broza de café, cuyo valor de pH fue menor que el tratamiento testigo. No se presentó una relación directa entre el pH y la severidad de la enfermedad en este experimento. Aunque Michel *et al.* (1997) asociaron el pH del suelo con las condiciones de supervivencia del patógeno, definiendo como suelos adecuados para *P. solanacearum* aquellos con valores alrededor de pH 6.0, siendo menos favorables los suelos con pH iguales o mayores a 7.0.

Las enmiendas orgánicas incorporadas al suelo, frecuentemente influyen sobre las enfermedades por medio de las interacciones nutricionales, ya sea supliendo nutrimentos de forma directa o aumentando su disponibilidad a través de cambios en la actividad microbiana del suelo (Huber 1989, Thurston 1992). También se conoce que los suelos con contenidos adecuados de nutrimentos presentan comunidades de microorganismos abundantes que participan en el reciclaje de nutrientes que son esenciales para las plantas (INPOFOS 1997).

Cuando se aplican abonos orgánicos al suelo, es difícil separar los efectos de su aplicación sobre la textura, la reacción del suelo o sobre la microbiota existente en el mismo. La información conocida sobre el efecto de elementos en la nutrición de las plantas y el desarrollo de enfermedades se relaciona con investigaciones aplicando fertilizantes minerales, mientras que poco se conoce sobre los aportes de nutrimentos por vía orgánica (Palti 1981).

Al relacionar las variables peso seco, diámetro de las plantas y contenido de humedad con el grado de severidad de la marchitez bacterial se obtuvo una correlación negativa altamente significativa ($p \leq 0,01$) entre la severidad y las variables peso seco y diámetro (Cuadro 9). Esto indica que a mayor diámetro del tallo y a mayor cantidad de biomasa en las plantas, se obtuvo relación con una menor severidad de la marchitez.

Cuadro 9. Correlación entre la severidad de la marchitez bacterial y las variables de crecimiento de plantas de tomate desarrolladas en suelo con aplicación de enmiendas orgánicas, bajo condiciones de casa de mallas, CATIE, Turrialba.

Correlación	Coefficiente r	Significancia*
Severidad - Peso seco	- 0,8486	0,0001
Severidad - Diámetro	- 0,5698	0,0001
Severidad - Cont. Hum	0,3701	0,0096

* : altamente significativo ($p \leq 0,01$) bajo la Prueba de correlación de Pearson.

Mientras que se detectó correlación positiva entre la severidad y el contenido de humedad las plantas ($p \leq 0,01$). Aquellas plantas que presentaron menor contenido de humedad se relacionaron con aquellas que manifestaron menor grado de severidad de la enfermedad.

Jiménez (1996) estudió la relación entre variables de crecimiento del cultivo de tomate y la severidad del virus del mosaico amarillo, y encontró relación negativa entre el diámetro y la producción de biomasa (peso fresco y peso seco) con la severidad de la enfermedad. Mientras la aplicación de cal y estiércol fue estudiada por Mercadal (1989), evaluando su efecto sobre la altura de plantas de tomate y sobre la severidad de la marchitez bacterial y encontró que el tratamiento testigo sin enmienda, obtuvo los menores valores de altura de planta y el mayor grado de severidad de la marchitez bacterial.

La información proporcionada por French (1984) y Persley (1986) muestra que la marchitez bacterial es una enfermedad que tiene un gran potencial de manejo a través del control integrado. Considerando este potencial y los factores relacionados con una estrategia de control indicada por French (1994) es muy factible combinar el uso de suelos libres del patógeno, lo cual puede ser obtenido con la combinación de suelos supresivos, rotación de cultivos y aplicación de enmiendas al suelo. Aunque la puntuación otorgada por French (1994) al uso de enmiendas orgánicas es baja para el control de la raza 1 de *P. solanacearum* en solanaceas, no se puede olvidar la función de los antagonistas presentes en los abonos orgánicos como *Pseudomonas fluorescens* y *Bacillus spp.*, organismos estos con buenos resultados como controladores biológicos del patógeno (Kempe y Sequeira 1983, Anuratha y Gnanamanickam 1990, Trigalet *et al.* 1994).

Al analizar la severidad de la marchitez bacterial en los tratamientos de este experimento se pudo observar que los abonos orgánicos fermentados (composts tipo bokashi, tipo 1 y 2) y la mezcla de broza más bokashi fueron los que presentaron menor desarrollo de la enfermedad en el período de evaluación. Aunque la severidad fue menor en estos tratamientos, y el período de evaluación fue de 40 días después de la inoculación,

encontrándose las plantas más o menos a los 80 días de edad, se hace necesario evaluar la producción del cultivo para observar si la baja severidad presentada en estos tratamientos afectan el rendimiento del cultivo.

La respuesta obtenida en los tratamientos de este experimento influyó en la selección de las plantas crecidas en suelo estéril + bokashi, suelo estéril + compost tipo 1, suelo estéril + compost tipo 2 y suelo estéril sin enmendar para aislar las bacterias existentes en la rizosfera y evaluar su efecto antagónico a colonias de *P. solanacearum*, pruebas estas, que se realizaron el experimento 2.

3. EXPERIMENTO 2: ANTAGONISMO DE RIZOBACTERIAS A *P. solanacearum*

3.1. REVISION DE LITERATURA

3.1.1. Microorganismos del suelo y rizosfera

El suelo presenta interacciones entre los componentes minerales sólidos: arena, limo y arcillas; minerales en solución, sustratos orgánicos, enzimas, coloides orgánicos y raíces, pero sobre todo es el lugar más complejo disponible para los microorganismos (Marshall 1976).

La actividad de los microorganismos en el suelo es influida por una gama de micronichos existentes, las cuales dependen de las condiciones presentes, dada la existencia de interfases sólido-líquido, sólido-gas y líquido-gas. Pueden ocurrir procesos como la nitrificación, que requiere condiciones anaeróbicas y la desnitrificación, que requiere las anaeróbicas (Ramírez 1996).

El conocimiento y uso de microorganismos para el manejo de patógenos no es un área ampliamente explotada y necesita más investigación para llegar al nivel que permita un amplio uso de esta táctica biológica. Actualmente se pueden utilizar en el suelo poblaciones de *Trichoderma spp.* para el control de *Rhizoctonia solani* (Bustamante 1994c)

Muchos organismos que producen antibióticos comerciales fueron aislados inicialmente del suelo, aunque las razas actuales pueden ser diferentes a las originales. Es posible aislar organismos productores de antibióticos de las hojas y otras partes de las plantas, pero son más comunes en el suelo. Se estima que más del 52% de los aislamientos del suelo pueden producir sustancias inhibitorias (Campbell 1989)

Existen bacterias y hongos que pueden ser obtenidos de un gramo de suelo, aunque

muchos pueden estar inactivos por limitaciones de temperatura, humedad, aireación y sustratos disponibles para el metabolismo y crecimiento. En la mayoría de los suelos el carbono es un recurso poco disponible para microorganismos heterótrofos, aunque contengan materia orgánica, ésta no siempre estará disponible y los microorganismos no pueden tomarla, o no producen enzimas que puedan degradarla (Campbell 1989). Manifestando que la materia orgánica debe presentar un grado de maduración adecuado, la cual sea disponible a los microorganismos existentes.

Tomando en consideración lo anterior se deben buscar los mecanismos para mantener la riqueza que los suelos presentaban cuando no eran sometidos a la intensa actividad agrícola en la cual se encuentran en la actualidad.

Una excepción a la limitación de nutrimentos en el suelo lo constituye la zona alrededor de las raíces, la rizosfera, donde azúcares simples, aminoácidos y otros compuestos son exudados por las plantas y están disponibles a los microorganismos (Campbell 1989). Esta zona puede favorecer la llegada de antagonistas o ayudar al desarrollo de patógenos en el sistema radical de los cultivos.

La rizosfera ha sido fuente primaria como potencial del control biológico de enfermedades o de la promoción del crecimiento de las plantas, debido a la diversidad y densidad de población de bacterias (Musson *et al.* 1995).

3.1.2. Uso de organismos antagonistas para controlar patógenos de plantas

Aquellos organismos que pueden utilizarse en la prevención de fitopatógenos son considerados antagonistas. Existen ejemplos de su uso para reducir enfermedades causadas por bacterias y hongos, estudiados tanto a nivel de laboratorio, invernadero y campo. El éxito ha sido desafortunadamente mayor a nivel de laboratorio e invernadero, ya que cuando los

antagonistas son aplicados al campo, no pueden competir con la microbiota presente en él, no sobreviviendo por mucho tiempo (Agris 1996).

Lambert *et al.* (1987) y Lievens *et al.* (1989), mencionan la obtención de bacterias presentes en maíz, cebada y achicoria; y en uva, soya, girasol y remolacha azucarera, respectivamente, como antagonistas a hongos fitopatógenos

El control de enfermedades foliares también tiene perspectivas viables por medio del biocontrol. Por ejemplo, la severidad de las manchas bacterianas causadas por *P. syringae* y *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* fueron reducidas significativamente en pruebas de invernadero y campo con el uso de cepas de *P. syringae*, *P. fluorescens* y *P. mendocina* (Wilson *et al.* 1996).

3.1.3. Control biológico de *P. solanacearum* con el uso de antagonistas

El método de control de la marchitez bacterial más empleado, ha sido el uso de variedades resistentes, pero la gran variabilidad en la virulencia de los aislamientos del patógeno en diferentes localidades del mundo, que afectan la estabilidad de la resistencia, permiten el estudio de medidas alternativas que incluyen el control biológico basado en el antagonismo microbial (Trigalet y Trigalet-Demery 1990).

Por las características del patógeno, se propuso como opción de control biológico la introducción al sistema vascular del hospedante de mutantes avirulentos espontáneos de *P. solanacearum* y/o especies de *Pseudomonas* saprófitas (Kempe y Sequeira 1983). Sin embargo, estos microorganismos aislados del suelo no han sido capaces de sobrevivir o multiplicarse en la planta.

Se atribuye la baja efectividad de los mutantes de *P. solanacearum* a su origen espontáneo, ya que permitía la regresión de estos a la forma virulenta. Basados en la estabilidad

del potencial de colonización y de la condición avirulenta inducida en forma artificial, Trigalet y Trigalet-Demery (1990) utilizaron mutantes avirulentos inducidos de *P. solanacearum* contra la marchitez bacterial en tomate, infectando plantas con los antagonistas por vía radical, logrando un efecto protector significativo contra cepas virulentas del patógeno. En forma contrastante, Gadewar *et al.* (1993) lograron inducir colonias no fluidas avirulentas a la condición de virulentas con el uso de antibióticos. Los resultados de los trabajos con mutantes muestran perspectivas promisorias, pero se recomienda la necesidad de continuar investigaciones al respecto.

En Costa Rica, Cartin y Wang (1996) trabajando con suelos paperos, identificados como supresivos a la marchitez bacterial, detectaron e identificaron 12 aislamientos bacterianos como antagonistas a *P. solanacearum*. Los autores le atribuyeron el efecto antagónico de los microorganismos a la posible producción de antibióticos.

Por presentar la rizosfera un ambiente rico para la interacción de microorganismos entre el suelo y la planta, se puede favorecer el control de enfermedades por medio del uso de rizobacterias. Por ejemplo, *Bacillus spp.* y *Pseudomonas fluorescens* (Kempe y Sequeira 1983, Anuratha y Gnanamanickam 1990, Hsu *et al.* 1993), *Bacillus subtilis* (Shekhawat *et al.* 1993), *Bacillus polymyxa* (Aspiras y Cruz 1986) y actinomicetes han sido probados con resultados satisfactorios, como posibles controladores biológicos de *P. solanacearum*.

3.1.4. Abonos orgánicos fermentados o composts como fuentes de microorganismos benéficos

A partir de los materiales de compost se puede aislar una amplia gama de microorganismos asociados con bacterias, hongos y levaduras (Haug 1980).

Las poblaciones de microorganismos predominantes durante el proceso de compostaje están definidos por la temperatura, identificándose los grupos termofílicos y mesofílicos con

más de 70 especies responsables del proceso (Haug 1980, USDA 1980). En todas las etapas del proceso, el grupo de bacterias (incluyendo los actinomicetes) predominan en número, superando en algunos casos en 100 ó más veces a los hongos (Poincelot 1977).

Entre el grupo de microorganismos aislados de enmiendas de compost e identificados como agentes de control biológico se han encontrado bacterias pertenecientes a los géneros *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium* y *Pseudomonas* (Haug 1980, Hoitink *et al.* 1997).

La comunidad de microorganismos presente en un compost maduro, en número y riqueza, también estará definida por la disponibilidad microbial en el ambiente para recolonizar el material en la fase de curado. Por esta razón se recomienda la preparación del compost en espacios abiertos (Hoitink *et al.* 1997).

3.2. MATERIALES Y METODOS

En esta prueba se seleccionaron tres de los mejores tratamientos de la evaluación de enmiendas orgánicas por la supresión a la marchitez bacterial (Experimento 1). Las bacterias de la rizosfera fueron aisladas en estos tratamientos con el objetivo de determinar la presencia de microorganismos de la rizosfera antagonistas a *P. solanacearum*.

3.2.1. Preparación del extracto de la rizosfera

Para hacer el aislamiento de bacterias habitantes en la rizosfera de las plantas de tomate, se obtuvo un extracto usando el método de dilución de suelo y lavado de raíces inoculando en platos con medio de cultivo, propuesto por Dhingra y Sinclair (1985). La colección de muestras se hizo excavando el suelo con cuidado y separando las plantas con sus raíces. Las plantas se agitaron para remover el exceso de suelo, utilizando solo el suelo que se mantuvo adherido al sistema radical. Posteriormente, se pesaron 10 g (suelo + raíz) y se colocaron en un erlenmeyer de 125 mL con 90 mL de agua destilada estéril, y por agitación se removió el suelo adherido. Transcurridas 24 horas y comprobado el desprendimiento del suelo de las raíces, de éste extracto de suelo mas raíces se hicieron diluciones hasta 10^{-5} .

3.2.2. Prueba de antagonismo del extracto de la rizosfera a *P. solanacearum*

Se utilizó un método de tres capas de medio de cultivo, para determinar la relación antagonica entre el extracto obtenido de la rizosfera y el patógeno *P. solanacearum*, haciendo una modificación para bacterias, del método propuesto por Herr (1959). Se colocó en platos Petri una primera capa de medio agar-agua con la finalidad de proveer una superficie de medio agarificado a las siguientes capas, además de prevenir también el crecimiento de bacterias anaeróbicas y distinguir mejor las zonas de inhibición formadas. Posterior a la primera capa de medio, se aplicó una segunda capa constituida por agar nutritivo (AN). En esta capa se

inocularon 20 μL , de una concentración de 10^{-4} del extracto obtenido de la rizosfera, permitiéndose el crecimiento de microorganismos hasta las 72 horas de incubación a 28°C . Mientras que, en la tercera y última capa se cultivó un aislamiento de *P. solanacearum* en medio TZC para evaluar la relación antagónica de las bacterias crecidas en la capa de AN con el patógeno. El efecto del extracto de la rizosfera en el método de tres capas se evaluó cualitativamente, a través de la presencia o ausencia de zonas de inhibición del patógeno en el medio TZC.

Las zonas de inhibición del crecimiento de *P. solanacearum* en la capa de TZC se identificaron como áreas en la cual no se observó crecimiento del patógeno en los platos. La frecuencia de las zonas de inhibición se registró en porcentaje del total de platos evaluados.

3.2.3. Aislamiento de microorganismos de la rizosfera

A partir del extracto de la rizosfera de las enmiendas orgánicas seleccionadas, se realizaron diluciones hasta 10^{-5} . Se seleccionaron las concentraciones 10^{-4} y 10^{-5} , se tomó una alícuota de 20 μL de cada repetición por tratamiento. Se sembraron en platos Petri con los medios agar tripticasa soya (TSA) (Antillón *et al.* 1985, Dhingra y Sinclair 1985, Musson *et al.* 1995) y B de King (KB) (Misaghi y Donndelinger 1990). Posteriormente se mantuvieron en incubadora a 28°C , haciendo evaluaciones de los crecimientos bacterianos a las 24, 48 y 72 h posteriores al aislamiento.

3.2.4. Determinación de bacterias de la rizosfera como antagonistas *in vitro* a *P. solanacearum*

Las bacterias aisladas en los tratamientos que presentaron mayor supresión a la marchitez bacterial en el experimento anterior fueron evaluadas para conocer su efecto

antagónico sobre *P. solanacearum*, haciendo una prueba de antagonismo en laboratorio usando como base suelo estéril.

3.2.4.1. Procedimiento y tratamientos

En viales de vidrio se colocaron 10 g de suelo estéril. Posteriormente se inoculó 1 mL de las bacterias provenientes de la rizosfera con una suspensión de 10^9 ufc*mL⁻¹. Se mantuvieron en incubación durante 48 h a 28°C. Una vez multiplicadas las bacterias en el suelo de los viales, el inóculo de *P. solanacearum* fue cultivado aplicando 1 mL de una suspensión de 10^8 ufc*mL⁻¹. Una vez que los posibles antagonistas se pusieron en interacción con el patógeno, se evaluó el crecimiento de *P. solanacearum* a los 25 días después de inoculada. Para esta evaluación se cultivó la bacteria en medio TZC y se estimaron las ufc*g de suelo⁻¹ a través del conteo de colonias por cada tratamiento.

Los tratamientos estuvieron constituidos por las mezclas de las rizobacterias más el patógeno y dos testigos, uno donde se inoculó *P. solanacearum* con agua destilada estéril y otro donde se inoculó en el suelo solo agua estéril. Una vez en los viales, los tratamientos quedaron distribuidos de la siguiente forma:

- Testigo absoluto: suelo estéril + agua destilada estéril,
- Testigo relativo: suelo estéril + *P. solanacearum*,
- 301: suelo estéril + MIP BRT-301 + *P. solanacearum*,
- 302: suelo estéril + MIP BRT-302 + *P. solanacearum*,
- 401: suelo estéril + MIP BRT-401 + *P. solanacearum*,
- 402: suelo estéril + MIP BRT-402 + *P. solanacearum*,
- 403: suelo estéril + MIP BRT-403 + *P. solanacearum*,
- 404: suelo estéril + MIP BRT-404 + *P. solanacearum*,
- 405: suelo estéril + MIP BRT-405 + *P. solanacearum*,
- 406: suelo estéril + MIP BRT-406 + *P. solanacearum* y
- 501: suelo estéril + MIP BRT-501 + *P. solanacearum*

3.2.4.2. Diseño experimental

Se aplicó un diseño completamente aleatorizado. Se determinó el antagonismo de las rizobacterias a *P. solanacearum* por el porcentaje de inhibición del crecimiento de la bacteria en los tratamientos con respecto al testigo (suelo estéril con *P. solanacearum*). La información se analizó por medio de análisis de varianza y pruebas de medias.

3.2.5. Aislamiento e identificación de bacterias provenientes de la rizosfera

Las cepas bacterianas seleccionadas para los experimentos fueron caracterizadas a través de pruebas físicas y bioquímicas básicas.

3.2.5.1. Caracterización morfológica de las colonias: los aislamientos crecidos en medio AN fueron observados para determinar el color de la colonia, la forma, elevación y el margen

3.2.5.2. Reacción de Gram: también denominada de solubilidad al Hidróxido de Potasio (KOH), se basa en la resistencia de la pared celular de un grupo de bacterias (Gram positivas) a sufrir lisis por contacto con una solución de KOH al 3% (Agarwal *et al.* 1989). La reacción positiva a la prueba se verificó cuando al hacer frotis de la bacteria con el reactivo se produjo una masa viscosa (mucilago) adherida al aza bacteriana (reacción positiva = grupo de bacterias Gram negativas).

3.2.5.3. Identificación de *Bacillus* sp.: en bacteriología agrícola, es común que las bacterias Gram positivas aisladas correspondan al género *Bacillus*. (Franklin Jiménez, UCR, com. pers.). La prueba para la identificación de *Bacillus* se basa en que este género de bacterias forman esporas (endosporas) resistentes al calor (Buchanan y Gibbons 1974).

La prueba consistió en colocar una suspensión bacteriana (aislamiento) en agua destilada estéril (ADE) en baño de María a 80 °C durante 10 min, para inactivar las células

bacteriales que no forman esporas. Se tomó una alícuota de la suspensión sometida a calor y se dispersó sobre medio AN. La reacción positiva a la prueba se confirmó en los platos con crecimiento bacterial en AN a las 48 h de incubación (Okumoto 1992).

3.2.5.4. Reacción de pigmentación para *Pseudomonas fluorescentes*: la prueba se basa en la producción de pigmentos por algunos grupos de bacterias en medios especiales, que tienen valor diagnóstico y taxonómico. Las *Pseudomonas fluorescentes* se identifican por la formación de un pigmento verde fluorescente en medio con bajo contenido de hierro (Agarwal *et al.* 1989). La reacción a la prueba fue positiva cuando el crecimiento de la cepa en medio B de King produjo pigmentos verdes fluorescentes bajo luz ultravioleta.

3.3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.3.1. Antagonismo del extracto de la rizosfera a *P. solanacearum*

La prueba de antagonismo del extracto de la rizosfera por el método de tres capas mostró reducción en el crecimiento de *P. solanacearum* (Cuadro 10). La presencia de zonas definidas en los platos donde no se observó crecimiento de *P. solanacearum* (zonas de inhibición), mostró efecto sobre el patógeno.

Cuadro 10. Frecuencia de aparición de zonas de inhibición¹ (en porcentaje) del crecimiento de *P. solanacearum* en pruebas de laboratorio.

Tratamiento	Repeticiones			Promedio
	1	2	3	
Suelo (testigo)	0,0	20,0	40,0	20,0
Suelo + Bokashi	60,0	100,0	20,0	60,0
Suelo + Compost 1	60,0	40,0	60,0	53,3
Suelo + Compost 2	20,0	20,0	20,0	20,0

¹Frecuencia determinada como porcentaje de platos con zonas de inhibición al crecimiento del patógeno en el total de platos evaluados (cinco platos por tratamiento) en cada repetición de la prueba.

En los tratamientos donde se utilizó extracto de la rizosfera proveniente de los composts tipo bokashi y tipo 1, se observó una frecuencia de zonas de inhibición de *P. solanacearum* mayores al 50%. Con el extracto que provino del tratamiento testigo, y del suelo enmendado con el compost tipo 2 se observaron zonas de inhibición en el 20% de los casos.

Se estimó en forma cualitativa la diversidad de microorganismos existentes en los platos de cada tratamiento. En los que presentaron abono orgánico fermentado se encontró mayor diversidad microbiana en comparación al testigo.

El método de tres capas de medio ha mostrado ser eficiente para identificar antagonistas a hongos patógenos. Sin embargo, se reconoce que en ensayos con suelo existen otros crecimientos microbiales (de hongos o bacterias no antagonistas), que pueden interferir con la respuesta esperada. Otra variable que puede dificultar la cuantificación de la respuesta es la desuniformidad de la zona de inhibición del crecimiento del patógeno (Herr 1959). Estos factores intervinieron en la prueba realizada, pudiendo restarle consistencia a los resultados.

La mayor diversidad microbial en los platos donde se aplicó extracto proveniente de la rizosfera, que interactuó con compost tipo bokashi y tipo 1 puede estar influyendo en el bajo crecimiento de *P. solanacearum* en estos tratamientos. Este comportamiento puede estar determinado por la microflora existente en la rizosfera de las plantas.

Muchos de los microorganismos que se desarrollan en la rizosfera son ideales para ser usados como agentes de control biológico, ya que la rizosfera constituye la línea de defensa de las raíces contra el ataque de patógenos (Weller 1988, Chet 1990).

3.3.2. Efecto de bacterias de la rizosfera como antagonistas a *P. solanacearum*

El crecimiento de *P. solanacearum* fue reducido en presencia de cepas aisladas de la rizosfera, mostrando diferencias significativas ($p \leq 0,05$) entre el testigo (suelo inoculado con *P. solanacearum* y agua destilada estéril), y los demás tratamientos (suelo inoculado con cepas provenientes de la rizosfera de tomate) (Figura 6). Todos los aislamientos provenientes de la rizosfera de tomate limitaron el crecimiento del patógeno a un nivel menor del 41%, con excepción de la cepa MIP BRT-402 que permitió un crecimiento de *P. solanacearum* igual a 76%, en comparación al testigo.

Las cepas provenientes del bokashi, MIP BRT-301 y MIP BRT-302 redujeron el crecimiento de *P. solanacearum* en un 77 y 65%, respectivamente. Las cepas aisladas del compost 1, MIP BRT-401, MIP BRT-403, MIP BRT-404, MIP BRT-405 y MIP BRT-406,

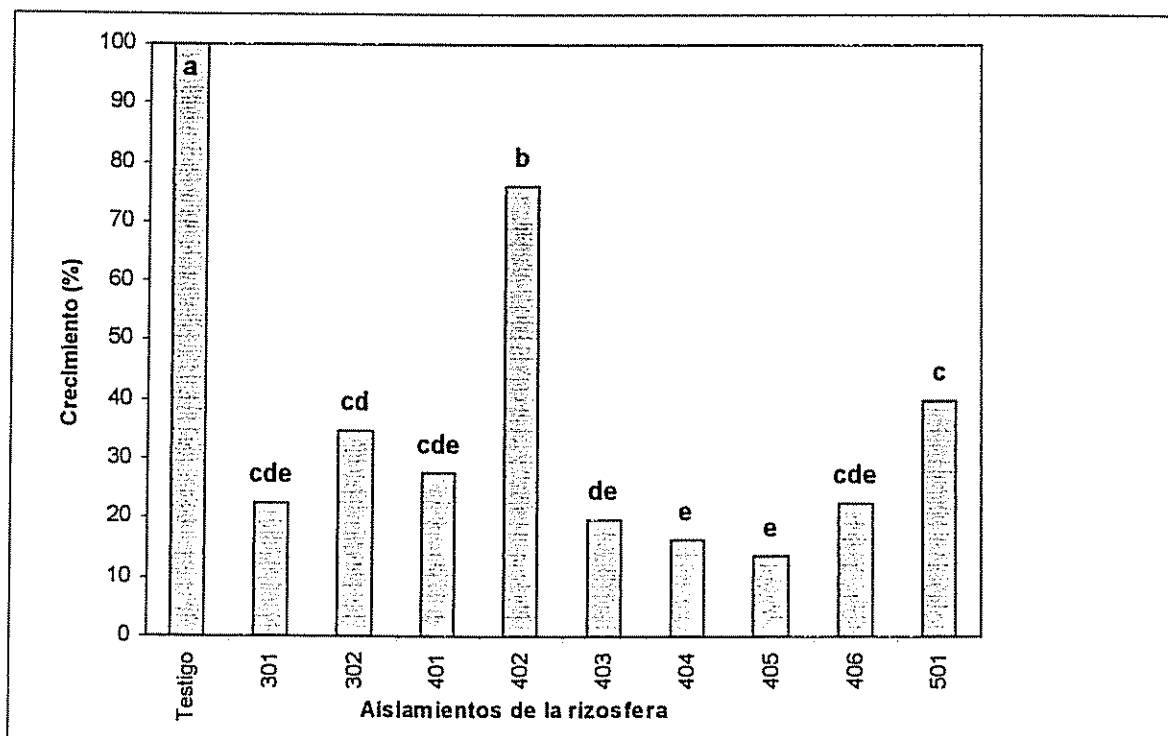


Figura 6. Reducción del crecimiento *in vitro* de *P. solanacearum* en presencia de bacterias aisladas de la rizosfera de plantas de tomate crecidas en sustratos orgánicos.

redujeron el crecimiento de *P. solanacearum* entre 72 y 86%. La cepa MIP BRT-501, aislada del compost 2 limitó el desarrollo del patógeno a un 40%, con relación al testigo.

Los tratamientos donde se interactuó *P. solanacearum* con bacterias de la rizosfera del compost tipo bokashi no presentaron diferencias estadísticas entre sí. Igual ocurrió con los tratamientos con bacterias aisladas de la rizosfera con compost tipo 1, con la excepción del aislamiento MIP BRT-402. El mejor efecto en la disminución del crecimiento de *P. solanacearum* se logró con las cepas MIP BRT-404 y MIP BRT-405 (aisladas del compost tipo 1), ya que se observaron los menores valores promedio de crecimiento del patógeno.

Los resultados obtenidos en esta prueba de antagonismo a nivel de laboratorio, usando suelo como sustrato para estudiar la interacción de *P. solanacearum* con cepas provenientes de la rizosfera de tomate, demostraron la existencia de una relación antagónica. Todas las cepas evaluadas limitaron el crecimiento de *P. solanacearum*.

Aunque la evidencia de antagonismo es clara, existe información acerca de pruebas de inhibición *in vitro* de *P. solanacearum* que indican la necesidad de continuar estudios a nivel de campo, ya que ciertos microorganismos funcionan como antagonistas a nivel de laboratorio, pero en condiciones de campo pierden su potencial de control (Shekhawat *et al.* 1993).

La comunidad de bacterias de la rizosfera que pueden ejercer actividad antagonista se considera que representa menos del 10% de la comunidad bacteriana de esta zona, por lo cual se recomienda como una estrategia para la selección de bacterias antagonicas, el aislar a partir de suelos con actividad supresiva (Weller 1988). En este experimento, la actividad supresiva de los composts a la marchitez bacterial se asoció con la presencia de bacterias antagonistas a *P. solanacearum*.

3.3.3. Identificación de rizobacterias probadas como antagonistas *in vitro*

Las cepas bacterianas seleccionadas fueron caracterizadas según las pruebas descritas en el numeral 3.2.5. Seis de las nueve cepas aisladas de la rizosfera de plantas de tomate desarrolladas en suelo enmendado con compost tipo bokashi, 1 y 2 correspondieron con las características de *Pseudomonas fluorescentes* y de *Bacillus sp.* (Cuadro 11).

Cuadro 11. Identificación de bacterias aisladas de la rizosfera de tomate con el uso de diferentes composts probadas como antagonistas a *P. solanacearum*.

Grupo bacterial	No. de cepas	Cepas
Gram negativos	7/9	MIP BRT (301, 402, 403, 404, 405, 406, 501)
<i>Pseudomonas fluorescentes</i>	4/7	MIP BRT (301, 403, 405, 406)
Gram positivos	2/9	MIP BRT (302, 401)
<i>Bacillus sp.</i>	2/2	MIP BRT (302, 401)

La identificación de las cepas reveló la presencia de *Bacillus* sp. y de *Pseudomonas* fluorescentes, grupos bacterianos que han resultado promisorios como agentes de control biológico de *P. solanacearum* (Kempe y Sequeira 1983, Anuratha y Gnanamanickam 1990, Hartman *et al.* 1993, Hsu *et al.* 1993, Shekhawat *et al.* 1993).

También se confirma la tendencia al predominio de los grupos de *Pseudomonas* fluorescentes y *Bacillus spp.* como los taxones más frecuentes de la comunidad de rizobacterias en diferentes cultivos (Lambert *et al.* 1987, Lievens *et al.* 1989).

Las *Pseudomonas* fluorescentes son bien conocidas por su actividad antagonista a diferentes hongos y bacterias fitopatógenos. Este grupo bacterial puede ejercer su actividad antagónica a través de diferentes modalidades de antibiosis (Lievens *et al.* 1989). También se les atribuye una evidente agresividad como colonizadores de la rizosfera en diferentes cultivos, por lo cual han recibido mucha atención para ser utilizadas como agentes de control biológico (Sivasithamparam *et al.* 1979, Weller 1988).

La identificación de bacterias antagonistas a *P. solanacearum* permite plantear la alternativa de su inoculación al suelo o bacterización de semillas del cultivo. Sin embargo, se ha demostrado que el establecimiento de poblaciones de *Pseudomonas* fluorescentes en la rizosfera está influenciada por el tipo de suelo y el cultivo en que se desarrolla (Latour *et al.* 1996). Por esta razón, habrá que considerar la necesidad de aplicar la enmienda orgánica al suelo para garantizar la supervivencia y efecto de las *Pseudomonas* fluorescentes antagonistas.

En este experimento, se pudo detectar la presencia de bacterias antagonistas a *P. solanacearum*, encontrándose un mayor número de estas en la rizosfera de plantas de tomate crecidas en el compost tipo 1, el cual mostró el mejor efecto en reducir la severidad de la marchitez bacterial. De esta forma, el efecto de la enmienda sobre la marchitez y la presencia de bacterias antagonistas al patógeno, mostraron una asociación.

También en la prueba, la mayoría de las cepas aisladas coincidieron con los grupos de la rizosfera frecuentes como antagonistas de *P. solanacearum*, el género *Bacillus* sp. y las *Pseudomonas* fluorescentes (Trigalet *et al.* 1994).

4. EXPERIMENTO 3: SUPERVIVENCIA DE *Pseudomonas solanacearum* EN EL SUELO

4.1. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1.1. Suelos infestados con *Pseudomonas solanacearum*

P. solanacearum sobrevive básicamente a nivel del suelo, pero también se ha encontrado creciendo saprofiticamente en la parte aérea de algunas especies de plantas, indicando la existencia de una fase epífita de la bacteria, la cual contribuye con la supervivencia y mantenimiento de una fuente de inóculo que renuevan las poblaciones del patógeno en el suelo (Hayward 1991).

En general, la raza 1 del patógeno puede sobrevivir indefinidamente como organismo de vida libre o en la rizosfera de las plantas. En condiciones de barbecho persiste hasta 6 años y por más de 10 años en suelos cultivados con plantas susceptibles al patógeno (CATIE 1990, Bustamante 1994b), pudiendo localizarse en suelos hasta 70 cm de profundidad. La persistencia del patógeno en el suelo se ha asociado con la presencia de restos vegetales, semillas de plantas, sin descartar su existencia en la rizosfera de malezas (Hayward 1991), que son las responsables de mantener el nivel de inóculo aún en ausencia de un hospedante susceptible.

A pesar de las características mencionadas, *P. solanacearum* es conocida por una distribución y persistencia erráticas en suelos infestados naturalmente. Se ha notado que las colonias aparentemente sobreviven en suelos con largos períodos de ausencia de cultivos susceptibles (Jackson y González 1981); mientras que en otros suelos las poblaciones del patógeno declinan bruscamente aún en presencia de cultivos susceptibles (McCarter 1976).

Estos contrastes en la respuesta de los suelos, los hace llamar conductivos o supresivos a la marchitez bacterial (Hayward 1991). Aunque se reconoce que en estas respuestas

participan factores físicos, químicos y biológicos, en algunos casos se ha correlacionado la supresividad del suelo a la marchitez con la acción de microorganismos antagonistas (Nesmith y Jenkins 1985).

Varios autores han mencionado un aspecto importante de la supervivencia del patógeno: su limitada persistencia en suelos no rizosféricos en comparación con suelos portadores de malezas, restos vegetales, etc. (Rema *et al.* 1981, Granada y Sequeira 1983).

Debido a la inconsistencia en la infestación de suelos con *P. solanacearum*, se han propuesto métodos de infestación artificial con fines experimentales (McCarter 1973). Estos métodos permiten efectuar estudios de supervivencia del microorganismo, efecto de medidas de control y de resistencia del hospedante, superando los problemas de infestaciones naturales que se presentan de forma irregular en el campo (McCarter 1976).

4.1.2. Prácticas para reducción de inóculo de *P. solanacearum* en el suelo

Aunque existen una serie de medidas preventivas para evitar la llegada del patógeno al campo, como lo son la siembra de semillas o plantas sanas, prácticas de drenaje adecuadas, desinfección de herramientas de trabajo (Agrios 1996); el principal problema para el manejo del patógeno ocurre cuando se establece en el suelo.

De acuerdo con las condiciones y necesidades del agricultor, este aplicará prácticas agronómicas o de otro tipo, o simplemente evadirá la siembra de cultivos susceptibles en el campo, ya que es un factor limitante de la producción de tomate y papa en Centroamérica (Mercadal 1989).

El efecto de las prácticas de manejo que se recomiendan para reducir el inóculo de *P. solanacearum* en el suelo, depende de las condiciones climáticas de la zona, el nivel de inóculo y raza del patógeno existente. En condiciones del trópico seco y semi-seco, algunas prácticas

como las rotaciones de cultivos pueden resultar efectivas (French *et al.* 1972, Drummond 1984).

En condiciones de trópico húmedo, las rotaciones han mostrado ser ineficientes debido a que la bacteria es favorecida por las condiciones de humedad del suelo y puede sobrevivir en la rizosfera de plantas compuestas, solanáceas y leguminosas (Hayward 1991, Bustamante 1994b).

Bajo ciertas condiciones del trópico, se han probado los cultivos asociados como medio de reducción de las poblaciones del patógeno en el suelo y disminuir la transmisión de raíz a raíz entre plantas de un mismo cultivo. El estudio sobre prácticas de cultivos asociados se ha efectuado en mayor grado en tabaco, con pocas experiencias sobre el cultivo de tomate (Michel *et al.* 1996, Michel *et al.* 1997).

Una práctica que se ha propuesto bajo condiciones de trópico húmedo es la aplicación de enmiendas en forma de abonos orgánicos y/o cal, con el objetivo de garantizar la nutrición de la planta y favorecer la competencia de microorganismos benéficos del suelo (Mercadal 1989, Bustamante 1994b).

Considerando la dificultad para eliminar el patógeno una vez en el suelo, la combinación de materiales resistentes con un manejo agronómico apropiado para reducir el inóculo, que incluya el uso de enmiendas y aprovechamiento del control biológico con antagonistas (rizobacterias o mutantes avirulentos de *P. solanacearum*) y micorrizas, presentan un amplio potencial de estudio para la producción de cultivos en presencia del patógeno con bajos niveles de inóculo del patógeno (Hayward 1991).

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

La supervivencia de *P. solanacearum* en el suelo fue determinada por medio de su comportamiento poblacional en el tiempo, por efecto de las materias orgánicas mezcladas al suelo. El objetivo fue determinar el número de ufc de *P. solanacearum*, y así determinar cuales de los sustratos disminuían el inóculo del patógeno en el suelo en ausencia del hospedante susceptible (tomate).

4.2.1. Procedimiento experimental

Se prepararon macetas con mezclas de enmiendas orgánicas y suelo, igual a las utilizadas en el experimento 1. El suelo de cada maceta fue inoculado con 25 mL de una suspensión de 10^8 ufc mL⁻¹ de *P. solanacearum*. Durante un período de 3 meses, se evaluó a intervalos de 30 días la supervivencia del patógeno presente en la mezcla de suelo, a través del conteo de ufc.g⁻¹ de suelo.

Se hicieron aislamientos tomando una muestra de 10 g de suelo en 90 mL de agua destilada estéril, con diluciones hasta 10^{-3} y se cultivaron en medio TZC a 30°C durante 48 horas. La virulencia de las cepas aisladas se verificó por medio de la inoculación en plantas de tomate sanas. La suspensión de *P. solanacearum* inoculada al suelo se tomó como la población del patógeno en el tiempo cero, y esta correspondió a 5×10^5 ufc.g⁻¹ de suelo en cada maceta.

4.2.2. Tratamientos y variable evaluada

Se determinó la supervivencia de *P. solanacearum* en cada tratamiento a través del método de dilución y siembra en platos con medio TZC. La variable evaluada fue el número de ufc por gramo de suelo para cada uno de los tratamientos. La relación de tratamientos fue la siguiente:

- Testigo:** suelo estéril + *P. solanacearum* (*P.s*);
- SEBr:** suelo estéril + broza de café + *P.s* ;
- SECh:** suelo estéril + cachaza + *P.s*;
- SEBk:** suelo estéril + bokashi + *P.s*;
- SEC1:** suelo estéril + compost 1 + *P.s*;
- SEC2:** suelo estéril + compost 2 + *P.s*;
- SEBrCh:** suelo estéril + (broza de café + cachaza) + *P.s*;
- SEBrBk:** suelo estéril + (broza de café + bokashi) + *P.s*;
- SEChBk:** suelo estéril + (cachaza + bokashi) + *P.s* y
- SEBrChBk:** suelo estéril + (broza de café + cachaza + bokashi) + *P.s*.

4.2.3. Diseño experimental y análisis de los resultados

Los platos con medio de cultivo y con los aislamientos a nivel de laboratorio se les asignó un diseño de parcelas divididas en el tiempo con diez tratamientos y tres tiempos de evaluación. La unidad experimental correspondió a cada una de las macetas de la cual se obtuvo la muestra de suelo. Los resultados se analizaron por medio de un análisis de varianza y se determinó el efecto de los tratamientos, de los tiempos de evaluación y la interacción de dichas variables.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSION

4.3.1. Supervivencia de *Pseudomonas solanacearum* en el suelo con el uso de abonos orgánicos

Como tendencia general, la densidad poblacional de *P. solanacearum* (ufc g⁻¹ de suelo) fue menor en los tratamientos con aplicación de enmienda orgánica en comparación al testigo, en cada uno de los períodos de evaluación (Figura 7).

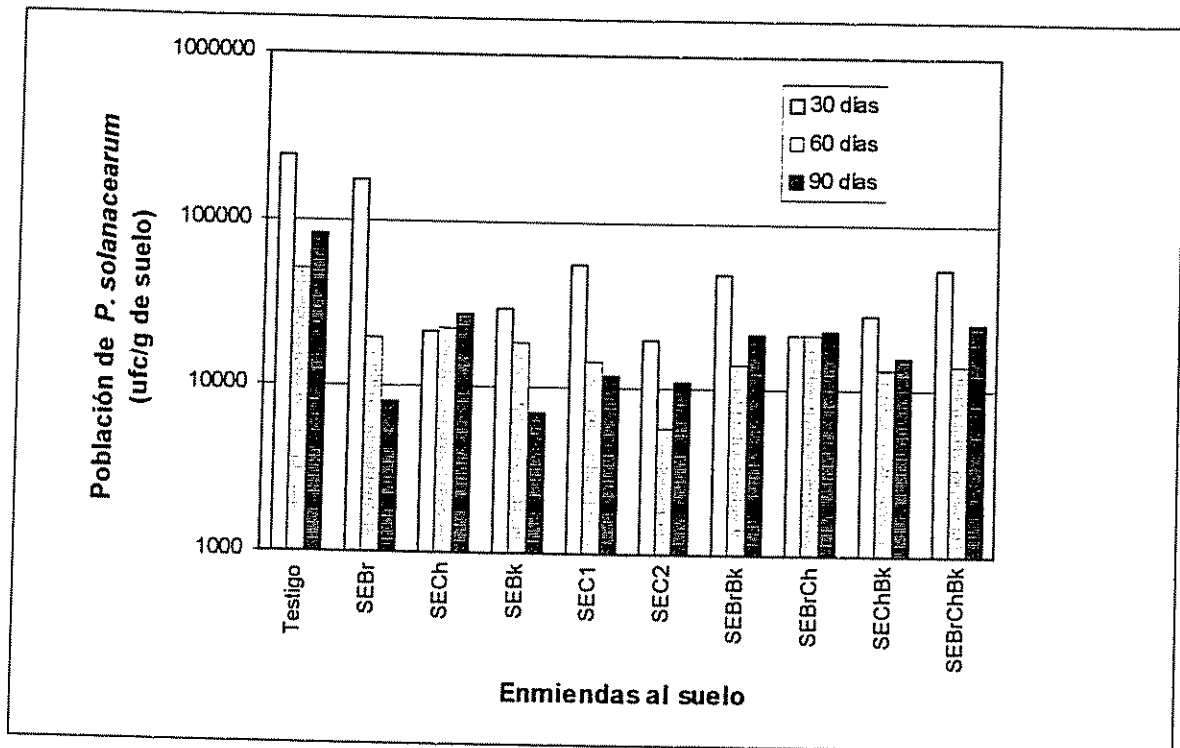


Figura 7. Efecto de sustratos orgánicos sobre la población de *P. solanacearum* 30, 60 y 90 días después de inoculada en el suelo en invernadero, CATIE, Turrialba.

Se detectaron diferencias estadísticas significativas (5%) entre los tratamientos y entre los diferentes tiempos de evaluación. También la interacción tratamientos por tiempo mostró significancia estadística (Anexo 4). Esto indica que dentro de cada tratamiento, las poblaciones determinadas fueron diferentes a través del tiempo.

Los tratamientos que mostraron una disminución progresiva del patógeno en el tiempo fueron broza, compost tipo bokashi y tipo 1 (Cuadro 11). Los menores niveles poblacionales de *P. solanacearum* a los 90 días lo presentaron el compost bokashi y la broza de café. El bokashi presentó una población de 9%, mientras que en la broza fue del 10%, en comparación al testigo en ambos casos.

Cuadro 12. Población de *P. solanacearum* en suelo inoculado artificialmente en invernadero, tratado con enmiendas orgánicas a los 30, 60 y 90 días después de la inoculación, CATIE, Turrialba.

Tratamiento	ufc/g de suelo (promedio)			
	0 días ¹	30 días	60 días	90 días
Testigo	$5,0 \times 10^5$	$2,4 \times 10^5$	$5,0 \times 10^4$	$8,1 \times 10^4$
SEBr		$1,7 \times 10^5$	$1,9 \times 10^4$	$8,1 \times 10^4$
SECh		$2,2 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$	$2,8 \times 10^4$
SEBk		$3,0 \times 10^4$	$1,8 \times 10^4$	$6,9 \times 10^3$
SEC1		$5,6 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$
SEC2		$1,9 \times 10^4$	$5,8 \times 10^3$	$1,1 \times 10^4$
SEBrBk		$5,0 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	$2,1 \times 10^4$
SEBrCh		$2,2 \times 10^4$	$2,2 \times 10^4$	$2,3 \times 10^4$
SEChBk		$2,8 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	$1,6 \times 10^4$
SEBrChBk		$5,3 \times 10^4$	$1,4 \times 10^4$	$2,5 \times 10^4$

¹ Población inicial de *P. solanacearum* inoculada artificialmente en el día cero.

Aunque todas las enmiendas mostraron densidades del patógeno menores que el testigo para cada periodo de tiempo, solo los tratamientos que incluyeron broza, composts tipo bokashi y tipo 1 presentaron una disminución progresiva de la densidad poblacional de *P. solanacearum* a través del tiempo. El comportamiento de la broza en este experimento puede estar relacionado con la presencia de microorganismos antagonistas, los cuales estarían ejerciendo su efecto en ausencia del hospedante susceptible, a diferencia de lo ocurrido en el experimento 1, donde posiblemente la interacción de los exudados radicales con la broza en la rizosfera limitaron la acción de estos microorganismos o de sus metabolitos (antibióticos, enzimas, etc.).

Los compost tipo bokashi y tipo 1, mantuvieron un comportamiento consistente en las diferentes pruebas: efecto supresivo sobre la marchitez bacterial (Experimento 1), por vía directa (presencia de antagonistas, de sustancias con efecto antibiótico, competencia de microorganismos por espacio y nutrientes, etc.) o indirecta (mejorando condición nutricional de las plantas); actuando como fuente de bacterias antagonistas al patógeno (Experimento 2) y ahora confirmados como opciones para reducir el inóculo del patógeno en ausencia del hospedante.

Se ha hipotetizado que en ausencia de hospedantes naturales, el movimiento del patógeno del suelo a la rizosfera de plantas no hospedantes, parece ser un proceso de supresión de la bacteria en el suelo (Schuster y Coyne 1974), y que otorga potencial para la aplicación sistemas de cultivos asociados o en rotación. En este experimento *P. solanacearum* no necesitó una planta hospedante para poder sobrevivir, dado que a los 90 días las poblaciones del testigo comenzaron a aumentar. Bajo estas condiciones, los resultados coinciden con la tendencia encontrada por Jackson y González (1981), donde el patógeno puede sobrevivir en el suelo en ausencia del cultivo susceptible.

Rema Devi *et al.* (1981), estudiando la supervivencia de *P. solanacearum* en el suelo, encontraron que la población de ésta disminuyó a la mitad del valor original 46 días después de la adición del inóculo al suelo, más no fue significativo el efecto de suelos enmendados con torta de neem, urea y tejido del hospedante sobre la población del patógeno en comparación con el testigo sin enmienda.

Otras experiencias, han demostrado que la aplicación de prácticas de rotación de cultivos, no lograron reducir el inóculo de *P. solanacearum* en el suelo en ausencia de hospedantes susceptibles (Jackson y González 1981), restándole potencial a la rotación de cultivos como medida para disminuir el inóculo del patógeno en suelos infestados.

El retardo en la aparición de síntomas en las plantas con aplicación de composts tipo bokashi, tipo 1 y 2; el mayor aporte de nutrientes por parte de estos tratamientos, la

disminución de poblacional de *P. solanacearum* con las cepas bacterianas provenientes de los composts tipo bokashi y tipo 1, y finalmente, la reducción del crecimiento de *P. solanacearum* en suelos enmendados con estos mismos sustratos, fundamentan la importancia que puede tener el componente biológico en el manejo del patógeno, dada la riqueza de microorganismos en la rizosfera.

A través de los resultados obtenidos en este trabajo y conociendo el potencial de persistencia en el suelo de *P. solanacearum*, que puede ir desde 4 (McCarter 1976) hasta 15 años (Drummond 1984); es recomendable hacer estudios a nivel de campo en suelos infestados naturalmente aplicando abonos orgánicos fermentados para propiciar un aumento de las poblaciones de microorganismos benéficos que compitan con el patógeno.

En este trabajo se revela el potencial de las enmiendas orgánicas, especialmente de los composts, como herramientas a ser probadas y utilizadas dentro del contexto del manejo integrado de *P. solanacearum*, y también para complementar el uso de variedades resistentes en suelos con bajos niveles de inóculo del patógeno

5. CONCLUSIONES

- 1) Las plantas tratadas con los compost o abonos orgánicos fermentados (tipos bokashi, 1 y 2) presentaron los mayores valores de diámetro de tallo y peso seco de la parte aérea de las plantas, y menores valores de contenido de humedad.
- 2) Los menores grados de severidad de la marchitez bacterial los presentaron las plantas que crecieron en los tratamientos con abonos orgánicos fermentados.
- 3) Los abonos orgánicos fermentados fueron mejores que los sustratos utilizados solos (broza y cachaza) para estimular el crecimiento de las plantas y disminuir la severidad de la enfermedad.
- 4) Las cepas bacterianas aisladas de la rizosfera de tomate con aplicación de sustratos orgánicos mostraron actividad antagonista *in vitro* a *P. solanacearum*, reduciendo el crecimiento del patógeno hasta en un 86%.
- 5) Cuatro de las seis cepas con mejor efecto antagónico *in vitro* sobre el patógeno, correspondieron con características de *Pseudomonas fluorescentes*.
- 6) La aplicación de enmiendas orgánicas redujo la población de *P. solanacearum* en el suelo.
- 7) Los mejores abonos orgánicos en reducir las poblaciones del patógeno en el suelo fueron bokashi, compost I y la broza de café.

6. RECOMENDACIONES

- 1) Hacer pruebas a nivel de campo para evaluar la supresión de la marchitez bacterial con el uso de compost.
- 1) Para la preparación de compost, se deben utilizar fuentes de materia orgánica disponibles en las zonas agrícolas con el objetivo de aprovechar los recursos disponibles y disminuir costos.
- 2) Medir la supervivencia de *P. solanacearum* en suelos naturalmente infestados y enmendados con abonos orgánicos tipo compost.
- 3) El suelo del semillero debería mezclarse con el compost a ser utilizado en campo para favorecer el crecimiento de microorganismos en la rizosfera de las plántulas.
- 4) Preparar mezclas de suelo con abonos orgánicos con características físico-químicas similares a las obtenidas en este experimento con el uso de compost (tipo bokashi y tipo 1).
- 5) Evaluar el área foliar como una de las variable de crecimiento del tomate.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- AGARWAL, P.; NIEVES, C.; MATHUR, S. 1989. Seed-borne diseases and seed health testing of rice. Copenhagen, Denmark, CAB/CMI. Phytopathological Papers no. 30, Tech. Bull. 3. 106 p.
- AGRIOS, G. 1996. Fitopatología 3 ed. Editorial Limusa S.A. México. 838 p.
- ANURATHA, C.; GNANAMANICKAM, S. 1990. Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* in India with antagonistic bacteria. *Plant Pathology*, 36:27-38.
- ANTILLÓN, F.; GAMBOA, M.; MORA, J.; RODRIGUEZ, E. 1985. Bacteriología diagnóstica: tinciones, medios de cultivo, pruebas para identificación. San José, Costa Rica, Editorial UCR. 162 p.
- ASPIRAS, R.; DE LA CRUZ, A. 1986. Potential biological control of bacterial wilt in tomato and potato with *Bacillus polymyxa* FU6 and *Pseudomonas fluorescens*. In: Persley G. (ed). Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. Proceedings International Workshop. 8-10 Oct., 1985, Los Baños, Philippines. ACIAR Proceedings no. 13. 89-92.
- BAKER, K. 1987. Evolving concepts of biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 25:67-85.
- BAKER, R. 1985. Biological control of plant pathogens: definitions. In: Hoy, M. and Herzog, C. (eds). Biological Control in Agricultural IPM Systems. Academic Press, Orlando, USA. pp 25-29.
- BEGON, M.; HARPER, J.; TOWNSEND, C. 1986. Ecology: individuals, populations and communities. Blackwell. Londres, U.K. 876 p.
- BERTSCH, F. 1995. La fertilidad de los suelos y su manejo. Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo. San José, Costa Rica. 157 p.
- BUCHANAN, R.; GIBBONS, E. 1974. Bergey's manual for determinative bacteriology. 8 ed. Williams and Wilkins Co. Baltimore, USA. 1246 p.
- BUDDENHAGEN, I.; KELMAN, A. 1964. Biological and physiological aspects of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Ann. Rev. Phytopathology*, 2:203-230.

- BUSTAMANTE, E. 1994a. Control biológico de patógenos de plantas. In: Memorias Curso Internacional Sobre Manejo Integrado de Plagas. Universidad de Nariño, Colombia p:19-21.
- BUSTAMANTE, E. 1994b. La marchitez bacterial del chile y tomate. Hoja Técnica MIP. no. 9:4 p.
- BUSTAMANTE, E. 1994c. Manejo integrado del cultivo: fundamento del control de enfermedades. In: Memorias Curso Internacional Manejo Integrado de Plagas. Universidad de Nariño, Colombia. p:22-31.
- CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA (CATIE). 1990. Guía para el manejo integrado de plagas del cultivo de tomate. Turrialba, Costa Rica, CATIE. Serie Técnica, Informe Técnico no. 151. 138 p.
- CAMPBELL, R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens. Cambridge University Press. UK. 199 p.
- CARTIN, J; WANG, A 1996. Aislamiento de agentes supresores a *Pseudomonas solanacearum* en tomate (*Lycopersicon esculentum*). X Congreso Nacional Agronómico. p:107.
- CASTAÑO, J. 1994. Principios básicos de fitopatología. Escuela Agrícola Panamericana, Departamento de Protección Vegetal. El Zamorano, Honduras. 518 p.
- CAVALCANTE, E.; MARIANO, R.; LEITE, J.; COELHO, R. 1996. Influence of mineral nutrition on the reaction of tomato cvs Yoshimatsu and Santa Cruz to *Pseudomonas solanacearum*. ACIAR Proceedings.
- CELINO, M.; GOTTLIEB, D. 1952. Control of bacterial wilt of tomato by *Bacillus polymyxa* *Phytopathology*, 42:4. (abstr.)
- CENTRO INTERNACIONAL DE LA PAPA (CIP). 1984. Marchitez bacterial (*Pseudomonas solanacearum*) de la papa en América Latina. Lima, Perú, CIP. 120p.
- CIPAV/FAO. 1995. Biodigestor plástico de flujo continuo, generador de gas y bioabono a partir de aguas servidas. Cali, Colombia, CIPAV/FAO. 18 p.
- CHAVERRI-FONSECA, J.; ALVARADO, A. 1996. Fitoprotección preventiva por medio de la nutrición vegetal. In: García, J.; Fuentes, G.; Monge-Nájera, J. (eds.). Opciones al uso unilateral de plaguicidas en Costa Rica: pasado, presente y futuro. vol. 2. UNED. San José, Costa Rica. 25-34.

- ✓ CHEN, W.; HOITINK, H.; SCHMITTHENNER, A.; TUOVINEN O. 1988. The role of microbial activity in suppression of damping-off caused by *Phytophthora ultimum*. *Phytopathology*, 78:314-322.
- CHEN, W.; ECHANDI, E. 1984. Effect of avirulent bacteriocin-producing of *Pseudomonas solanacearum* on the control of bacterial wilt of tomato. *Plant Pathology*, 33:245-253.
- CHEY, Y.; BAKER, R. 1980. Induction of suppressiveness to *Rhizoctonia solani* in soil. *Phytopathology*, 70:994-998.
- DHINGRA, O.; SINCLAIR, Y. 1985. Basic plant pathology methods. CRC Press. Florida, USA. 355 p.
- DRUMMOND, O. 1984. Investigaciones para el combate de la marchitez bacteriana de la papa realizadas en el período de 1957 a 1982, en Rio de Janeiro. In: CIP. Marchitez bacteriana (*Pseudomonas solanacearum*) de la papa en América Latina. CIP. Lima, Perú. 120 p.
- EDEN-GREEN, S.; SASTRAATMADJA, H. 1990. Blood disease of banana present in Java. *Plant Protection Bulletin*. FAO. 38(1):49-50.
- FINEGAN, B. 1995. La descomposición en ecosistemas terrestres. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 7 p. (mimeografiado).
- FLAIG, W. 1975. Specific effects of soil organic matter on the potential of soil productivity. Roma, Italia, FAO *Boletín de Suelos* no. 27:31-70.
- FRENCH, E.; TORRES, H.; AMES DE ICOCHEA, T.; SALAZAR, L.; FRIBOURG, C.; FERNENDEZ, E.; MARTIN, A.; FRANCO, J.; DE SCURRAH, M.; HERRERA, I.; VISE, C.; LAZO, L.; HIDALGO, O. 1972. Enfermedades de la papa en el Perú. Ministerio de Agricultura. Estación Experimental Agrícola La Molina, Lima. Perú. Bol. Téc. no. 77. 36 p.
- FRENCH, E. 1979. Progress in the integrated control of bacterial wilt. Report of a Planning Conference on Developments in Control of Potato Bacterial Disease. 12-15 Jun., 1979. Lima, Perú. p: 72-81.
- FRENCH, E. 1994. Strategies for integrated control of bacterial wilt of potatoes. In: Hayward, A. And Hartman, G. (eds). Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB INTERNATIONAL. Wallingford, UK. p:199-207.
- FRENCH, E.; HEBERT, T. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. IICA, Costa Rica. 289 p.

- FREY, P.; PRIOR, P.; TRIGALET-DEMERY, D.; TRIGALET, A. 1993. Hrp mutants of *Pseudomonas solanacearum* for the biological control of tomato bacterial wilt. In: Hartman, G.L.; Hayward, A.C. (eds). Bacterial Wilt. Proceedings of an International Conference, 28-31 October, 1992. Kaohsiung, Taiwan: ACIAR Proceedings, no. 45, 257-260.
- GADEWAR, A.V.; SHEKHAWAT, G.S.; CHAKRABARTI, S.K. 1993. Antibiotic-induced virulence and changes in colony morphology of *Pseudomonas solanacearum*. In: Hartman, G.L.; Hayward, A.C. (eds). Bacterial Wilt. Proceedings of an International Conference, 28-31 October, 1992. Kaohsiung, Taiwan: ACIAR Proceedings, no. 45, 261-268.
- ✓ GAJDOS, R. 1992. The use of organic waste materials as organic fertilizers-recycling of plant nutrients. *Acta Horticulturae*, 302:325-331.
- GRANADA, G.; SEQUEIRA, L. 1983. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil, rhizosphere and plant roots. *Can. J. Microbiol.*, 29:433-440.
- GRIMAULT, V.; ANAIS, G.; PRIOR, P. 1994. Distribution of *Pseudomonas solanacearum* in the stem tissues of tomato plants with different levels of resistance to bacterial wilt. *Plant Pathology*, 43:663-668.
- GRIMAULT, V.; PRIOR, P. 1993. Bacterial wilt resistance in tomato associated with tolerance of vascular tissues to *Pseudomonas solanacearum*. *Plant Pathology*, 42:589-594.
- ✓ GUERRERO, J. 1993. Abonos orgánicos, tecnología para el manejo ecológico de suelos. Lima, Perú, Red de Acción en Alternativas al Uso de Agroquímicos (RAAA). 90 p.
- HAUG, R. 1980. Composting Engineering, Principles and Practice. Lancaster, Pennsylvania, USA, Technomic Publishing. 655 p.
- HARTMAN, G.; HONG, W.; HANUDIN, HAYWARD, A. 1993. Potential of biological and chemical control of bacterial wilt. In: Hartman, G.L.; Hayward, A.C. (eds). Bacterial Wilt. Proceedings of an International Conference, 28-31 October, 1992. Kaohsiung, Taiwan: ACIAR Proceedings, no. 45, 322-326.
- HAYWARD, A. 1991. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. *Ann. Rev. Phytopathol.*, 29:65-87.
- HAYWARD, A. 1994. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In: Hayward, A.C. and Hartman, G.L. (eds). Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB INTERNATIONAL. Wallingford, UK. p: 9-24.

- HE, L.; SEQUEIRA, L.; KELMAN, A. 1983. Characteristics of strains of *Pseudomonas solanacearum* from China. *Plant Disease*, 67:1357-1361.
- HERR, L. 1959. A method of assaying soil for numbers of actinomycetes antagonistic to fungal pathogens. *Phytopathology*, 49:270-273.
- HOITINK, H.; INBAR, Y.; BOEHM, M. 1991. Status of composted-amended potting mixes naturally suppressive to soilborne diseases of floricultural crops. *Plant Disease*, 75:869-873.
- HOITINK, H.; STONE, A.; HAN, D. 1997. Supresion de enfermedades mediante el uso de compost. *Manejo Integrado de Plagas*, 43:31-39.
- HSU, S.; CHEN, C.; LIU, H.; TZENG, K. 1993. Colonization of roots and control of bacterial wilt of tomato by fluorescent Pseudomonads. In: Hartman, G.; Hayward, A. (eds). *Bacterial Wilt. Proceedings of an International Conference, 28-31 October, 1992. Kaohsiung, Taiwan: ACIAR Proccedings, no. 45, 305-311.*
- HUBER, D.; WATSON, R. 1974. Nitrogen form and plant disease. *Ann. Rev. Of Phytopathology*, 60:22-26.
- HUBER, D. 1981. The use of fertilizers and organic amendment in the control of plant of plant diseases. In: Pimentel, D. (ed). *Handbook of pest management in agriculture.* CRC Press. Florida. p:357-394.
- HUBER, D.; SCHNEIDER, R. 1989. The description and ocurrence of supressive soils. In: Schneider, R. (ed). *Supressive soils and disease.* APS Press. Minnessota, USA. p:88.
- INSTITUTO DE LA POTASA Y EL FOSFORO (INPOFOS). 1997. Los fertilizantes y la salud del suelo. *Informaciones Agronómicas*, no. 29:13.
- JACKSON, M.; GONZALEZ, L. 1981. Persistence of *Pseudomonas solanacearum* (Race 1) in naturally infested soil in Costa Rica. *Phytopathology*, 71:690-693.
- JIMENEZ, J. 1996. Evaluación de inductores de resistencia a geminivirus y promotores del crecimiento en el cultivo del tomate. Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 74 p.
- KEMPE, J.; SEQUEIRA, L. 1983. Biological control of bacterial wilt of potatoes: attempts to induce resistance by treating tubers with bacteria. *Plant Disease*, 67:499-503.
- KELMAN, A. 1953. The bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*. NC. Agric. Exp. Sta. Tech. Bull. no. 99. 194 p.

- KELMAN, A. 1954. The relationship of pathogenicity in *Pseudomonas solanacearum* to colony appearance on a tetrazolium medium. *Phytopathology*, 44:693-695.
- KELMAN, A. 1985. Plant pathology at the crossroads. *Annual Review of Phytopathology*, no.23:1-11.
- KELMAN, A.; PERSON, L. 1961. Strains of *Pseudomonas solanacearum* differing in pathogenicity to tobacco and peanut. *Phytopathology*, 51:158-161.
- LAMBERT, B.; LEYNS, F.; JOOS, P.; TENNING, R.; VAN RIJSBERGEN, R.; VAN OUTRYVE, F.; ZHAO, Y.; SWINGS, J.; VAN MONTAGO, M. 1987. Rhizobacteria with broad-spectrum antifungal activity. *EPPO Bulletin*, 17:601-607.
- LATOUR, X.; CORBERAND, T.; LAGUERRE, G.; ALLARD, F.; LEMANCEAU, P. 1996. The composition of Fluorescent Pseudomonad populations associated with roots is influenced by plant and soil type. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:2449-2456.
- LELLIOTT, R.; STEAD, D. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. *Methods in Plant Pathology* vol. 2. 216 p.
- 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.
- LUMSDEN, R.; LEWIS, J.; MILLNER, P. 1983. Effect of composted sewage sludge on several soilborne pathogens and diseases. *Phytopathology*, 73:1543-1548.
- LUQUE, O. 1995. Aprovechamiento de los residuos orgánicos en un modelo de agricultura sustentable. Yaracuy, Venezuela, Fundación Polar. 40 p.
- MANDELBAUM, R. HADAR, Y. 1990. Effects of carbon source of microbial activity and suppression of *Phytium aphanidermatum* in compost and peat container media. *Phytopathology*, 80:794-804.
- MARSHALL, K. 1976. Interfaces in microbial ecology. Harvard University Press. Cambridge. 156 p.
- McCARTER, S. 1973. A procedure for infesting field soils with *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 63: 799-800.
- McCARTER, S. 1976. Persistence of *Pseudomonas solanacearum* in artificially infested soils. *Phytopathology*, 66:998-1000

- MERCADAL, R. 1989. Incidencia de la marchitez bacterial en el cultivo de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en respuesta a niveles de estiércol y cal en Turrialba, Costa Rica. Tesis M.Sc., Turrialba, Costa Rica. CATIE. 115 p.
- MEW, T.; HO, W. 1977. Effect of soil temperature on resistance of tomato cultivars to bacterial wilt. *Phytopathology*, 67:909-911.
- MISAGHI, I.; DONNDELINGER, C. 1990. Endophytic bacteria in symptom-free cotton plants. *Phytopathology*, 80:808-811.
- MICHEL, V.; HARTMAN, G.; MIDMORE, D. 1996. Effect of previous crop on soil populations of *Burkholderia solanacearum*, bacterial wilt, and yield of tomatoes in Taiwan. *Plant Disease*, 80:1367-1372.
- MICHEL, V.; WANG, F.; MIDMORE, D.; HARTMAN, G. 1997. Effects of intercropping and soil amendment with urea and calcium oxide on the incidence of bacterial wilt of tomato and survival of soil-borne *Pseudomonas solanacearum* in Taiwan. *Plant Pathology*, 46:600-610.
- MUELLER-SAEMANN, K.; KOTSCHI, J. 1994. Sustaining Growth: Soil Fertility Management in Tropical Smallholdings. CTA-GTZ, Weikersheim, Germany. 486 p.
- MUSSON, G.; McINROY, J.; KLOEPPER, J. 1995. Development of delivery systems for introducing endophytic bacteria into cotton. *Biocontrol Science and Technology*, 5:407-416.
- NESMITH, W.; JENKINS, S. 1985. Influence of antagonists and controlled matric potential on the survival of *Pseudomonas solanacearum* in four North Carolina soils. *Phytopathology*, 75:1182-1187.
- ✓ OKUMOTO, S. 1992. Efecto de enmiendas sobre bacterias antagónicas a *Alternaria solani* en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 114 p.
- OPENA, R.; TSCHANZ, A. 1987. Bacterial wilt resistance program on tomato at AVRDC. Bacterial Wilt Newsletter. ACIAR. No. 2:1-2.
- PALLERONI, N.; DOUDOROFF, M.; 1971. Phenotypic characterization and deoxyribonucleic acid homologies of *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of Bacteriology*, 107:333-39.
- PALTI, J. 1981. Cultural practices and infectious crop diseases. Springer-Verlag. New York, USA. 243 p.

- PARR, J.; WILSON, G. 1980. Recycling organic wastes to improve soil productivity. *HortScience*, 15:162-166.
- PEREIRA-NETO, J.; STENTIFORD, E. 1992. A low controlled windrow system. *Acta Horticulturae*, 302:141-152.
- PERSLEY, G. 1986. Bacterial wilt disease in Asia and the South Pacific. In: Proceedings International Workshop. 8-10 Oct., 1985. Los Baños, Philippines. ACIAR Proceedings no. 13. 145 p.
- POINCELOT, R. 1975. The biochemistry and methodology of composting. Conn. Agric. Exp. Station Bulletin no. 754. 18 p.
- POINCELOT, R. 1977. The biochemistry of composting. In: Composting of Municipal Residues and Sludges. Proceeding of the National Conference. USA.
- PRIOR, P.; BART, S.; LECLERCQ, S.; PARRASSE, A.; ANAIS, G. 1996. Resistance to bacterial wilt in tomato as discerned by spread of *Pseudomonas (Burkholderia) solanacearum* in the stem tissues. *Plant Pathology*, 45:720-726.
- RAMIREZ, G. 1983. Compostaje y uso de residuos orgánicos en Costa Rica. In: El ciclaje de materia orgánica en la Agricultura de América Latina. Roma, Italia, FAO. Boletín de Suelos no. 51:200-205.
- RAMIREZ, C. 1996. Efecto de las prácticas agrícolas sobre la microflora del suelo: oportunidades en la fitoprotección. X Congreso Nacional Agronómico. San José, Costa Rica. p:81-84.
- REMA, L.; RAMANATHA, M.; AIYER, R. 1981. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil. *Plant Soil*, 62:169-182.
- REMA DEVI, L.; RAMANATHA, M.; AIYER, R. 1981. Survival of *Pseudomonas solanacearum* in soil. *Plant Soil*, 62:169-182.
- SCHUSTER, M.; COYNE, D. 1974. Survival mechanisms of phytopathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology*, 12:199-216.
- SEQUEIRA, L. 1958. Bacterial wilt of bananas: dissemination of the pathogen and control of the disease. *Phytopathology*, 48:64-69.
- SHANER, G.; FINNEY, R. 1977. The effect of nitrogen fertilization on the expression of slow-midewing resistance in knox wheat. *Phytopathology*, 67:1051-1056.

- SHEKHAWAT, G.; CHAKRABARTI, S.; KISHORE, V.; SUNAINA, V.; GADEWAR, A. 1993. Possibilities of biological management of potato bacterial wilt with strains of *Bacillus sp.*, *B. subtilis*, *Pseudomonas fluorescens* and Actinomycetes. In: Hartman, G.; Hayward, A. (eds). Bacterial Wilt. Proceedings of an International Conference, 28-31 October, 1992. Kaohsiung, Taiwan: ACIAR Proceedings, no. 45, 327-330.
- SIVASITHAMPARAM, K.; PARKER, C.; EDWARDS, C. 1979. Rhizosphere micro-organisms of seminal and nodal roots of wheat grown in pots. *Soil Biol. Biochem.*, 11:155-160.
- SUÁREZ DE CASTRO, F. 1983. La pulpa de café como abono. In: El ciclaje de materia orgánica en la Agricultura de América Latina. Roma, Italia, FAO. Boletín de Suelos no. 51:89-91.
- TANAKA, Y.; NODA, N. 1973. Studies on the factors affecting survival of *Pseudomonas solanacearum* the causal agent of tobacco wilt disease. *Review of Plant Pathology*, 53: 3171.
- TRIGALET, A.; FREY, P.; TRIGALET-DEMERY, D. 1994. Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum*: State of the art and understanding. In: Hayward A. and Hartman G, eds. Bacterial wilt: the disease and its causative agent, *Pseudomonas solanacearum*. CAB INTERNATIONAL. p 225-233.
- TRIGALET, A.; TRIGALET-DEMERY, D. 1990. Use of avirulent mutants of *Pseudomonas solanacearum* for the biological control of bacterial wilt of tomato plants. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 36:27-38
- THURSTON, H. 1992. Sustainable practices for plant disease management in traditional farmig systems. Westview Press. Boulder, USA. 279 p.
- USDA-EPA. 1980. Manual for composting sewage sludge by the Beltsville Aereated-pile method. EPA 600/8-8-022. 63 p.
- VANDEVIVERE, P.; RAMIREZ, C. 1995. Control de calidad de abonos orgánicos por medio de bioensayos. In: García, J. Nájera, J. (ed) Memorias Simposio Centroamericano sobre Agricultura Orgánica. 6-11 Mar., 1995. San José, Costa Rica. UNED. p:121-139.
- WALL, G.; SANCHEZ, J. 1993. A biocontrol agent for *Pseudomonas solanacearum*. In: Hartman, G.; Hayward, A. (eds). Bacterial Wilt. Proceedings of an International Conference, 28-31 October, 1992. Kaohsiung, Taiwan: ACIAR Proceedings, no. 45, 220-221.

WELLER, D. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in rhizosphere with bacteria. *Ann. Rev. Phytopathology*, 26:379-407.

WILSON, M.; CAMPBELL, H; BYRNE, J.; JONES, J.; CUPPELS, D 1996. Biological control of bacterial speck and spot of tomato. In: APS/MSA Joint Annual Meeting. 27 a 31, July, 1996. Indianapolis, Indiana. APS Press.

✓ ZHANG, W.; DICK, W.; HOITINK, H. 1996. Compost-induced systemic acquired resistance in cucumber to pythium root rot and anthracnose. *Phytopathology*, 86:1066-1070.

8. ANEXOS

Anexo 1. Relación de materiales utilizados para la preparación del compost tipo Bokashi.

Material	Cantidad
Suelo	6 m ³
Gallinaza	3 m ³
Semolina (pulidura de arroz)	1 m ³
Concentrado para ganado bovino	1 m ³
Carbón vegetal (pulverizado)	3 m ³
Cáscara de arroz	3 m ³
Cal agrícola (CaCO ₃)	1,3 kg / m de suelo
Melaza (al 5%)	20 L

Anexo 2. Condiciones climáticas en casa de mallas durante el experimento de enmiendas orgánicas por la supresión a la marchitez bacterial.

Días después de inoculación	Temperatura (°C)			Humedad relativa (%)	
	Media	Máxima	Mínima	Media	Mínima
1	26.7	34.0	21.0	78.0	37.0
2	26.6	33.0	22.3	77.2	40.0
3	26.6	34.0	21.2	80.7	45.0
4	24.7	29.0	22.6	90.6	70.0
5	24.6	26.6	23.0	93.2	90.0
6	21.9	25.2	19.2	89.4	73.0
7	23.0	27.6	19.0	87.7	68.0
8	23.3	27.0	21.2	80.7	73.0
9	23.7	28.0	21.0	90.6	65.0
10	22.8	25.0	21.0	94.8	90.0
11	23.4	29.0	21.0	89.3	70.0
12	22.8	28.0	21.0	91.1	63.0
13	23.6	32.0	19.6	84.3	45.0
14	24.6	32.6	20.0	83.7	50.0
15	24.1	27.0	22.0	90.4	75.0
16	24.4	28.2	22.0	89.8	75.0
17	23.7	26.0	22.3	93.3	88.0
18	24.1	27.0	22.0	90.4	78.0
19	24.1	29.0	21.2	90.0	72.0
20	22.7	24.0	22.0	95.9	92.5
21	26.0	31.0	23.0	82.4	55.0
22	23.6	27.5	22.0	92.1	73.0
23	22.0	23.0	21.0	96.0	96.0
24	22.8	27.0	20.5	93.2	75.0
25	22.0	23.0	21.5	96.0	96.0
26	22.3	26.0	19.8	91.8	70.0
27	26.0	33.5	20.0	84.5	45.0
28	26.6	29.0	22.0	86.6	55.0
29	25.1	30.0	21.0	84.2	62.5
30	24.4	28.5	21.0	87.9	72.5
31	24.0	30.0	21.0	87.9	75.0
32	25.1	33.0	21.0	80.8	52.5
33	21.0	32.0	20.0	81.9	65.0
34	21.0	25.0	19.0	95.0	80.0

Anexo 3. Reacción de las rizobacterias aisladas a las diferentes pruebas de identificación fisiológicas.

Cepas	Pruebas bacteriológicas básicas				Catalasa
	Reacción de KOH	Detección de <i>Bacillus</i> sp	Fluorescencia en medio B de King	Oxidasa	
MIP BRT-301	+	-	+	-	+
MIP BRT-302	-	+	-	-	-
MIP BRT-401	-	+	-	-	+
MIP BRT-402	+	-	-	-	-
MIP BRT-403	+	-	+	-	+
MIP BRT-404	+	-	-	-	-
MIP BRT-405	+	-	+	-	+
MIP BRT-406	+	-	+	-	+
MIP BRT-501	+	-	-	-	+

Anexo 4. Análisis de varianza y significancia para el efecto de materias orgánicas y el tiempo de evaluación de las poblaciones de *P. solanacearum* en el suelo.

Variable	Grados de Libertad	Valor de F	Significancia
Tiempo	2	51,55	0,0001**
Error (a)	9	0,25	
Tratamiento	9	25,70	0,0001**
Tratamiento x Tiempo	18	10,76	0,0001**
Error (b)	81	0,25	

** : Valores altamente significativos al 5%.