

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA
ÁREA DE POSTGRADO

Efecto de sustratos sobre bacterias antagonistas a
Mycosphaerella fijiensis en banano

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

Magister Scientiae

por

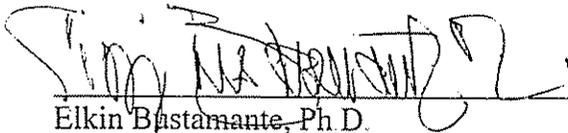
CARLOS A. RUIZ SILVERA

Turrialba, Costa Rica
1995

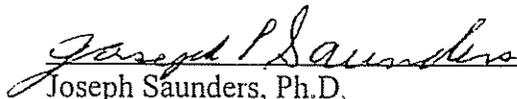
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Jefatura del Area de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

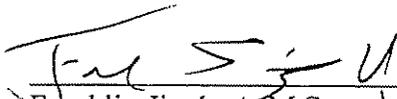
FIRMANTES:



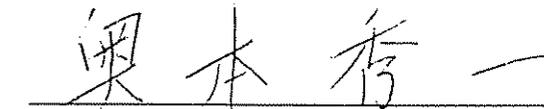
Elkin Bastamante, Ph.D.
Profesor Consejero



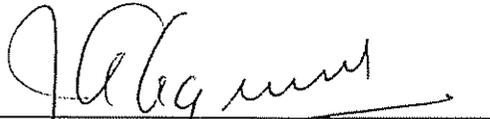
Joseph Saunders, Ph.D.
Miembro Comité Asesor



Franklin Jiménez, M.Sc.
Miembro Comité Asesor



Shuichi Okumoto, M.Sc.
Miembro Comité Asesor



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



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



Carlos Ruiz Silvera
Candidato

DEDICATORIA

A la memoria de mi padre, Salvador Ruiz Siso

A mi madre, Maria Silvera de Ruiz, y a mis hermanos

A mi esposa, Livia Rafaela Hernández, mi compañera y mi mejor motivo

AGRADECIMIENTOS

Al personal de la Biblioteca Conmemorativa Orton por su disposición a colaborar y su amistad.

Al personal del Laboratorio de Diagnóstico del Proyecto MIP, los asistentes Arturo Gamboa, Walter Bermúdez, Mario Cervantes, Ing Herbert González, M Sc. Vera Sánchez y M Sc Roberto González

A los doctores Fritz Elango, Pánfilo Tabora, Ramiro de la Cruz y James French por su colaboración e interés en la realización de los trabajos de campo en EARTH en Guácimo

A mis compañeros de especialidad, Martha Zamora, Liliana Chávez, Francois Herrera, Jorge Miranda, Osvaldo Pérez, Pilar Suazo y Mario Padilla por las experiencias compartidas.

A María Teresa Olivo, por su sencillez y sus atenciones con unos venezolanos en el exilio

Al Dr. Elkin Bustamante por haber actuado fielmente como orientador y consejero de Tesis, también le dedico mi respeto y admiración

Al Dr. Joseph Saunders, M Sc Franklin Jimenez y M Sc Shuichi Okumoto, integrantes del Comité Asesor de Tesis, por enseñarme algo siempre en cada conversación

A mis compañeros y amigos de la Promoción 1994-1995

Al gobierno holandés por haber financiado mis estudios

TABLA DE CONTENIDO

	Pág (s)
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
LISTA DE CUADROS	ix
LISTA DE FIGURAS	xi
LISTA DE ANEXOS	xii
RESUMEN	xiv
SUMMARY	xv
1 INTRODUCCION	1
2 REVISION DE LITERATURA	3
2.1. Características relevantes de la sigatoka negra	3
2.1.1. Situación actual de la enfermedad	3
2.1.2. Síntomas y signos de la enfermedad	4
2.1.3. Biología del agente causal	5
2.1.4. Epidemiología de la sigatoka negra	6
2.1.5. Prácticas de manejo de la enfermedad	6
2.2. El control biológico en la filosfera como opción.	9
2.2.1. Fundamentos y estrategias del control biológico	9
2.2.2. Situación actual del control biológico de patógenos	10
2.2.3. La resistencia inducida como estrategia de control biológico	11
2.2.4. Enzimas líticas y su relación con la resistencia a patógenos	12
2.2.5. Control biológico de la sigatoka negra	13
2.3. Las bacterias como agentes de control biológico	14
2.3.1. Fundamentos para el uso de bacterias en el control de patógenos foliares	14
2.3.2. El género <i>Bacillus</i> en el control biológico en la filosfera	14
2.3.3. El género <i>Serratia</i> en control biológico	15

2.4.	Manipulación del ambiente como estrategia de control biológico	18
2.4.1.	Fundamentos de la manipulación del medio para el control de patógenos	18
2.4.2.	Factores ambientales limitantes del desarrollo de los microorganismos epífitos	18
2.4.3.	Fuentes de nutrimentos para la microflora epífita de las hojas	19
2.4.4.	Composición de nutrimentos en la filosfera	20
2.4.5.	Utilización de nutrimentos por los microorganismos de la filosfera	21
2.5.	Sustratos para modificar la comunidad microbial de la filosfera	22
2.5.1.	Aplicación de azúcares	23
2.5.2.	Aplicación de celulosa	23
2.5.3.	Aplicación de quitina	23
2.5.4.	Aplicación de quitosan	24
2.5.5.	Aplicación de leche	25
2.5.6.	Aplicación de melaza	26
2.5.7.	Aplicación de almidón de yuca	26
2.5.8.	Aplicación de aminoácidos	27
3.	MATERIALES Y METODOS	28
3.1.	Localización de los experimentos	28
3.2.	Selección de sustratos <i>in vitro</i>	28
3.2.1.	Efecto de sustratos sobre multiplicación de los antagonistas	28
3.2.2.	Efecto de sustratos sobre habilidad quitinolítica de los microorganismos antagonistas	32

3.2.3. Efecto de la concentración de los sustratos sobre la multiplicación de los microorganismos antagonistas	33
3.3. Selección de sustratos en invernadero	35
3.3.1. Material vegetal utilizado	36
3.3.2. Efecto de sustratos sobre la población de antagonistas	36
3.3.3. Efecto de sustratos sobre comunidad microbiana de la filosfera	39
3.3.4. Efecto de sustratos y bacterias antagonistas sobre severidad de la sigatoka negra	40
3.4. Aplicación de sustratos en campo	42
3.4.1. Efecto de sustratos y bacterias antagonistas sobre la severidad de la sigatoka negra en plantas de banano en macetas	42
3.4.2. Efecto de sustratos y bacterias antagonistas sobre la severidad de la enfermedad en una plantación en campo	44
4. RESULTADOS Y DISCUSION	49
4.1. Selección de sustratos <i>in vitro</i>	49
4.1.1. Efecto de sustratos sobre multiplicación de antagonistas	57
4.1.2. Efecto de sustratos sobre habilidad quitinolítica de los antagonistas	59
4.1.3. Efecto de concentración de sustratos sobre multiplicación de antagonistas.	64
4.2. Selección de sustratos en invernadero	64
4.2.1. Efecto de sustratos sobre población de antagonistas	64
4.2.2. Efecto de sustratos sobre comunidad microbiana de la filosfera	70

	Pág (s)
4.2.3. Efecto de sustratos y bacterias sobre la sigatoka negra	73
4.3. Aplicación de sustratos en campo	77
4.3.1. Efecto de sustratos y bacterias sobre la sigatoka negra en plantas de banano en macetas en campo	77
4.3.2. Efecto de sustratos y bacterias antagonistas sobre severidad de la enfermedad en campo	79
5. CONCLUSIONES	89
6. RECOMENDACIONES	91
7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	92
8. ANEXOS	103

LISTA DE CUADROS

		Pág (s)
Cuadro 1	Relación de tratamientos en cada prueba de efecto de la concentración de los sustratos sobre <i>S. marcescens</i> R1	34
Cuadro 2	Resultados del análisis de suelo en la parcela de campo	45
Cuadro 3	Escala de grados de infección y área foliar afectada para evaluar la severidad de la sigatoka negra	48
Cuadro 4	Resultados del análisis de varianza y contrastes ortogonales entre los sustratos para la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>S. marcescens</i> R1	51
Cuadro 5	Resultados del análisis de varianza y contrastes ortogonales entre los sustratos para la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>S. entomophila</i> A100	53
Cuadro 6	Resultados del análisis de varianza y contrastes ortogonales entre los sustratos para la multiplicación <i>in vitro</i> de <i>B. cereus</i> A30	54
Cuadro 7	Resultados del análisis de varianza y efectos de concentración de leche sobre la multiplicación de <i>S. marcescens</i> R1	60
Cuadro 8	Resultados del análisis de varianza y efectos de concentración de melaza sobre la multiplicación de <i>S. marcescens</i> R1	62
Cuadro 9	Resultados del análisis de varianza y efectos de concentración de leche+melaza sobre la multiplicación de <i>S. marcescens</i> R1	63
Cuadro 10	Análisis de varianza del efecto de sustratos sobre <i>Serratia marcescens</i> , 10 días después de la inoculación de la bacteria (ddi) en plantas de banano en invernadero	66
Cuadro 11	Resultados del análisis de varianza del efecto de sustratos sobre <i>S. marcescens</i> , 15 días después de la inoculación de la bacteria (ddi) en plantas de banano en invernadero	67
Cuadro 12	Análisis de varianza y contrastes ortogonales entre los índices de diversidad de la comunidad microbiana de la filosfera de banano en invernadero bajo diferentes tratamientos	72

	Pág(s)	
Cuadro 13	Resultados del análisis de varianza y contrastes ortogonales entre tratamientos sobre la sigatoka negra en plantas de banano en invernadero	75
Cuadro 14	Resultados del análisis de varianza y contrastes ortogonales entre tratamientos sobre la sigatoka negra en plantas de banano en macetas expuestas en campo	77
Cuadro 15	Valores promedio de área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) obtenidos para diferentes tratamientos de la sigatoka negra en plantas de banano en campo	80
Cuadro 16	Resultados del análisis de varianza y contrastes ortogonales entre tratamientos sobre la sigatoka negra en plantas de banano en campo	82
Cuadro 17	Registros de concentración de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> en la parcela con relación a la existente en la plantación comercial de la EARTH, Guácimo, Costa Rica	85
Cuadro 18	Caracterización química del suelo de la parcela con relación a las condiciones de la zona Oeste de la vertiente Atlántica de Costa Rica	86
Cuadro 19	Relaciones de equilibrio K-Ca-Mg en el suelo de la parcela y las utilizadas para banano en Costa Rica	86

LISTA DE FIGURAS

		Pág(s)
Figura 1	Efecto de diferentes sustratos sobre la multiplicación <i>in vitro</i> de: A) <i>S. marcescens</i> R1, B) <i>S. entomophila</i> A100, y C) <i>B. cereus</i> A30	50
Figura 2	Efecto de diferentes sustratos sobre la habilidad quitinolítica <i>in vitro</i> de <i>S. marcescens</i> R1 MIP-CATIE, a los cuatro días de cultivo en medio agar quitina (AQ)	58
Figura 3	Efecto de diferentes concentraciones de: A) leche, B) melaza, y C) leche+melaza sobre multiplicación <i>in vitro</i> de <i>S. marcescens</i> R1 MIP-CATIE	61
Figura 4	Efecto de sustratos sobre <i>S. marcescens</i> R1 en plantas de banano en invernadero, a los 10 días (1er muestreo) y 15 días (2do muestreo) después de la inoculación de la bacteria (ddi)	65
Figura 5	Condiciones de temperatura y humedad relativa en casa de mallas y campo (estación CATIE) a las 6:00, 12:00 y 18:00 horas durante los días del estudio	68
Figura 6	Valores de diversidad de la comunidad microbiana diferente a <i>S. marcescens</i> R1 por tratamiento, aislada de la filosfera de banano en medio agar quitina (AQ)	71
Figura 7	Efecto de sustratos y <i>S. marcescens</i> R1 sobre la severidad de la sigatoka negra en plantas de banano de 5 meses de edad en invernadero	74
Figura 8	Efecto de sustratos y <i>S. marcescens</i> R1 sobre la severidad de la sigatoka negra en plantas de banano en macetas, aclimatadas durante 45 días en campo	78
Figura 9	Efecto de tratamientos sobre el desarrollo de la sigatoka negra en banano, EARTH, Guácimo, Costa Rica	81
Figura 10	Registros semanales de: (A) precipitación y B) concentración de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> en la parcela de campo, EARTH, Guácimo, Costa Rica	83

LISTA DE ANEXOS

		Pág(s)
Anexo 1	Composición química total aproximada de los sustratos utilizados en los ensayos	104
Anexo 2	Composición de minerales aproximada de los sustratos utilizados	104
Anexo 3	Composición de vitaminas aproximada de los sustratos utilizados	105
Anexo 4	Diagrama del muestreo efectuado para la obtención del extracto de la superficie de la hoja de banano con los exudados	106
Anexo 5	Diagrama de muestreo de las hojas de banano en invernadero para determinar el número de estrías totales de sigatoka negra	107
Anexo 6	Croquis de la localización de la parcela de campo en EARTH, Guácimo, Costa Rica	108
Anexo 7	Cálculos para estimar la concentración semanal de esporas de <i>M. fijiensis</i> utilizando la trampa volumétrica de esporas	109
Anexo 8	Representación de los grados de área foliar afectada por la sigatoka negra en banano	110
Anexo 9	Resultados prueba de Dunnett del efecto de sustratos sobre <i>S. marcescens</i> R1	111
Anexo 10	Resultados prueba de Dunnett del efecto de sustratos sobre <i>S. entomophila</i> A100	111
Anexo 11	Resultados prueba de Dunnett del efecto de sustratos sobre <i>B. cereus</i> A30	112
Anexo 12	Resultados prueba de Dunnett del efecto de sustratos sobre la habilidad quitinolítica de <i>S. Marcescens</i> R1	112
Anexo 13	Valores promedio y desviación de la densidad bacteriana de <i>S. marcescens</i> R1 recuperada de plantas en invernadero	113
Anexo 14	Resultados prueba de Dunnett del efecto de sustratos sobre la comunidad microbiana en invernadero	113

	Pág(s)	
Anexo 15	Resultados prueba de Dunnett del efecto de sustratos sobre la sigatoka negra en plantas en casa de mallas	114
Anexo 16	Resultados prueba de Dunnett del efecto de sustratos sobre la sigatoka negra en plantas en macetas en campo	114
Anexo 17	Resultados prueba de Dunnett del efecto de sustratos sobre la sigatoka negra en plantación de campo	115

RESUMEN

RUIZ, C. 1995. Efecto de sustratos sobre bacterias antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis* en banano.

Palabras claves: *Mycosphaerella fijiensis*; *Musa* sp.; control biológico; bacterias antagonistas; sustratos, fitoprotección; sigatoka negra; banano

La producción de bananos y plátanos en América Central, Colombia y Ecuador, así como en muchos países de África y Asia, es afectada por la enfermedad conocida como sigatoka negra. Los fungicidas han sido las principales herramientas de control de su agente causal, el hongo *Mycosphaerella fijiensis*. González (1995) obtuvo resultados positivos en el control de la enfermedad en casa de mallas y campo con el uso de microorganismos. Sin embargo, la aplicación de estos en forma masiva en los campos podría tener efectos ambientales no predecibles. Los sustratos aplicados al follaje son una alternativa para favorecer el crecimiento de los antagonistas, restringiendo su aplicación masiva y los riesgos potenciales asociados. Este trabajo tuvo por objetivo determinar el efecto de sustratos sobre organismos antagonistas a *M. fijiensis* en banano. La investigación se dividió en tres etapas: laboratorio, casa de mallas y campo. Se probaron los sustratos leche, abono foliar, melaza y almidón de yuca. En laboratorio, leche y melaza fueron los sustratos comunes en efecto positivo sobre el crecimiento de los antagonistas a *M. fijiensis*. En casa de mallas, leche y melaza mostraron la mejor tendencia para la supervivencia de *S. marcescens* R1 MIP-CATIE, y esta bacteria con melaza fue la mejor combinación sustrato-bacteria para el control de la enfermedad. En la prueba de campo efectuada en una zona productora de banano (EARTH, vertiente Atlántica de Costa Rica), no se detectaron diferencias estadísticas entre los tratamientos con sustratos y el testigo sin protección. Sin embargo, la densidad de inóculo de *M. fijiensis* en la plantación comercial vecina bajo aplicación de fungicidas fue mayor que en la parcela experimental bajo aplicación de sustratos.

SUMMARY

RUIZ, C. 1995. Effect of substrates on antagonistic bacteria to *Mycosphaerella fijiensis* in banana.

Key words: *Mycosphaerella fijiensis*; *Musa* sp.; biological control; antagonistic bacteria; substrates; plant protection; black sigatoka; banana

Banana and plantain production in Central América, Colombia, Ecuador and Brasil, as well as in many African and Asian countries, is affected by the disease known as black sigatoka. Fungicides had been the principal tools used to control the causal agent of the disease, *Mycosphaerella fijiensis*. González (1995) obtained positive results in controlling the disease using microorganisms under greenhouse and field conditions. The mass application of bacteria in crop fields could have unpredictable environmental effects. Substrates applied to foliage are an alternative which favor antagonists, while decreasing their use frequency and potential risks. This study was conducted to determine the effect of substrates on antagonistic organisms to *M. fijiensis* in bananas.

Research was divided in three steps: laboratory, greenhouse and field. Substrates tested were milk, leaf fertilizer, molasses and cassava starch. In laboratory test, milk and molasses were those which showed positive effects on antagonistic bacteria growth. In the greenhouse, milk and molasses showed the best survival tendency of *Serratia marcescens* R1 MIP-CATIE, and this bacteria with molasses was the best bacteria-substrate combination for disease control. In field test conducted in the bananas-producing region (EARTH, Atlantic region of Costa Rica), no statistical differences between treatments with substrates and control were detected. However, higher *M. fijiensis* ascospores density was detected in commercial plantation using fungicides than in the experimental plot where substrates were applied.

1. INTRODUCCION

La producción de bananos¹ y plátanos en América Latina representa una de las actividades socioeconómicas más importantes por el aporte de estas en la generación de divisas y empleos, y por su importancia como alimento básico, especialmente el plátano para millones de habitantes en la región (Bureau *et al* 1992)

La producción de estos cultivos involucra diferentes áreas, entre las que se encuentra el manejo de plagas. Una de éstas, la sigatoka negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* es el principal problema del banano y plátano en América Central, Colombia y Ecuador, así como en muchos países de África y Asia (Marín y Romero 1993)

La enfermedad se presenta en las hojas de las plantas produciendo su rápido deterioro, cuando no es combatida. El crecimiento y la productividad de las plantas se ve afectado por disminución de su capacidad fotosintética, además la disminución de hojas causa una maduración prematura de la fruta, lo que representa la mayor pérdida del cultivo debido a esta enfermedad (CORBANA 1993, Marín y Romero 1993).

La base del control de la sigatoka la han constituido los fungicidas sintéticos, de los cuales ya se ha documentado la evolución de resistencia por poblaciones del hongo (Stover 1989). El aumento en el número de aplicaciones, además del deterioro acelerado del medio ambiente, ha incrementado la probabilidad de resistencia del hongo con graves consecuencias económicas para los productores

El control de la enfermedad debería sustentarse en un manejo integral de la plantación (Bureau *et al* 1992), que permita incluir prácticas de control biológico como parte de un programa de manejo, por los beneficios que representaría su aplicación y su bajo impacto ambiental

Recientemente (Gonzalez 1995), evaluó el potencial del uso de microorganismos quitinolíticos en el control de la sigatoka negra con resultados promisorios para su aplicación en campo.

Los sustratos o enmiendas aplicados al follaje podrían actuar en favor de la supervivencia de los antagonistas sobre las hojas como mecanismo de acción primario y por lo tanto en el control de la enfermedad. Esta práctica se presenta como una alternativa

¹ Cambures en Venezuela

para mejorar la efectividad de los antagonistas a *M fijiensis*, y disminuir los riesgos potenciales que representaría para los humanos su aplicación masiva

Con base en lo anterior, este trabajo tuvo por objetivos principales determinar el efecto de diferentes sustratos sobre las poblaciones de microorganismos antagonistas a *M fijiensis* en banano y sobre la severidad de la enfermedad en campo.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. Características relevantes de la sigatoka negra

2.1.1. Situación actual de la enfermedad

La sigatoka negra es una enfermedad de amplia diseminación en la mayoría de las zonas productoras de banano y plátano de América. La cronología de su dispersión en el continente es: Honduras, 1972; Belize, 1975; Guatemala, 1977; Nicaragua y Costa Rica, 1979; México, 1980; Panamá y Colombia, 1981; Ecuador, 1987 y Cuba, 1991 (Bureau *et al* 1992).

En Venezuela, se detectó un foco de la enfermedad extendido en un radio de 50 km en la zona fronteriza con Colombia, siendo esta la primera confirmación de la introducción de la enfermedad a dicho país (Haddad *et al* 1992).

La importancia económica de la sigatoka negra radica en que su control constituye un rubro importante en la estructura de costos de producción del banano, el cual puede ser sufragado por ser un cultivo de alto valor comercial.

La disminución en la efectividad de las medidas de control aplicadas en forma periódica y cambios en las perspectivas económicas de los productores por las condiciones del mercado han llevado a una situación de crisis con relación al manejo de la enfermedad (Marín y Romero 1993).

En Costa Rica, uno de los países con mayor productividad bananera en América, los rendimientos han disminuido de 2731¹ cajas/ha/año en 1989 a 1850 cajas en 1994 (Sauma 1995), lo que se atribuye a la depresión internacional de los precios del banano con pocos incentivos para los productores y al efecto de la sigatoka negra en los campos.

La disminución en los rendimientos contrasta con el número de aplicaciones de fungicidas por hectárea por año, las cuales han aumentado hasta ubicarse en 1993 en un promedio de 35 aplicaciones (CORBANA 1993).

¹ Una caja equivale a 18,14 kg de fruta

La Fundación Hondureña de Investigación Agrícola (FHIA) ha iniciado la comercialización de los materiales tetraploides FHIA-01, FHIA-03 y FHIA-21 seleccionados por resistencia a la sigatoka negra (Rowe y Rosales 1994), estableciéndose ya la multiplicación de estos materiales en algunos países (Pánfilo Tabora, EARTH, 1995, com pers.).

2.1.2. Síntomas y signos de la enfermedad

Los síntomas se asocian con diferentes etapas o estados de la enfermedad en la planta (Meredith y Lawrence 1969, Fouré 1985)

Posterior al período de incubación se presenta el desarrollo visible de la enfermedad que comprende desde pequeñas decoloraciones hasta la necrosis (Bureau *et al* 1992) El tiempo de este proceso depende de las condiciones climáticas y podría variar entre los 15 y 30 días después que aparecen los primeros síntomas.

Tomando como referencia las observaciones de Bureau *et al* (1992) el desarrollo de la enfermedad se ha dividido en seis estados con las siguientes características:

- Estado 1: pequeña decoloración de aproximadamente 1 mm de largo, blanca o amarilla en fase inicial y visible únicamente en el envés de la hoja. Para observarla, debe exponerse el envés de la hoja a la luz.

- Estado 2: la decoloración se convierte en una estría de 2 a 3 mm de largo y rojiza, que puede ser observada tanto en el envés como en el haz de la hoja.

- Estado 3: la estría aumenta sus dimensiones, haciéndose más larga y ancha. A partir de este estado aparecen los conidióforos que producen los conidios.

- Estado 4: se presenta como una mancha oval, marrón en el envés y negra en el haz de la hoja.

- Estado 5: se diferencia por ser una mancha totalmente negra, elíptica y rodeada por un halo amarillo cuyo centro empieza a deprimirse.

- Estado 6: el centro de la mancha se seca y llega a ser blanco grisáceo, y se desarrollan los peritecios o pseudotecios.

En condiciones de alta humedad relativa las estrias pueden aparecer entre los 10 y 14 días después de la infección, presentándose con un patrón de distribución variable: hacia

el ápice, en ambos márgenes de la hoja, o bien a uno o ambos lados a lo largo de la vena central, siendo este último el más común (González 1987).

Cuando la infección es severa pueden observarse estrías y manchas desde la segunda hoja en plantas sin fructificar, y a partir de la primera en plantas fructificadas o paridas; (González 1987). En plantas de banano con 6 u 8 semanas de edad del racimo con todas las hojas afectadas, el fruto madura prematuramente.

Gauhl (1990) describió la enfermedad a través de una escala de seis grados a partir de la propuesta por Stover (1971), con base en la estimación visual del porcentaje de área foliar afectada (con manchas), y que ha sido ampliamente utilizada en la evaluación de la incidencia y severidad de la enfermedad en campo

2.1.3. Biología del agente causal

El agente causal de la sigatoka negra es el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis*, el cual se reproduce en forma sexual y asexual durante su ciclo de vida (Meredith y Lawrence 1969, Pons 1989).

La forma sexual o teleomorfo corresponde, según la clasificación de Linneo, a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet; mientras que para el estado imperfecto o anamorfo correspondería a *Paracercospora fijiensis* (Zimm) Deighton (Pons 1989)

El organismo pertenece al subreino Eumycete, clase Ascomycete, orden Dothiales, familia Dothiaceae (Alexopoulos y Mims 1979), de estructura micelial, con paredes de quitina, ascas en ascocarpos y otras características que se han establecido para el subreino (Whittaker 1969).

Morfológicamente el estado asexual es diferente al de *Mycosphaerella musicola* Leach (sigatoka amarilla). La producción de conidióforos difiere entre ambas especies; en la sigatoka negra se forman solos o en grupos de tres o cuatro sin formar esporodoquios. Tanto el conidióforo como las conidias presentan una conspicua cicatriz que no se observa en *M. musicola* (Pons 1989).

Las conidias de *M. fijiensis* poseen hilum basal grueso obclavadas o cilíndrico obclavadas, rectas o curvas, angostas en el ápice y de un mayor tamaño que en *M. musicola* (Pons 1989).

Estos organismos también difieren en actividad patogénica y ámbito de hospedantes, siendo mayor para *M. fijiensis* (Mourichon 1994)

2.1.4. Epidemiología de la sigatoka negra

Las esporas germinan en dos horas sobre el envés de las hojas húmedas, pero el tubo germinativo dura de 48 a 72 horas para penetrar por el estoma si hay saturación de humedad o cerca de la misma con temperaturas sobre los 20 °C

Luego de la incubación del patógeno comienzan a emerger por el estoma los conidióforos que producirán los conidios. Cuando germinan los conidios, ocurren desplazamientos de los tubos germinativos hacia otros estomas que llevan a la aparición y desarrollo de estrias sobre la superficie de las hojas

Las primeras lesiones pequeñas (pizcas) de 2 a 3 mm de largo aparecen alrededor del estoma entre los 10 y 14 días siguientes a la infección en un clima húmedo y caluroso (Stover 1978).

La principal fuente de inóculo son las ascosporas (Meredith *et al* 1973, Gauhl 1990), ocurriendo una mayor emisión de estas cuando se inician las lluvias. A las ascosporas se les atribuye la responsabilidad por la diseminación de la enfermedad en el campo, mientras que las conidias serían importantes en la diseminación entre hojas de la planta (Stover y Dickson 1976)

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

2.1.5. Prácticas de manejo de la enfermedad

2.1.5.1. Prácticas culturales

Los aspectos de manejo considerados relevantes para la enfermedad son:

- Establecimiento de drenajes para reducir las condiciones de humedad que favorecen al patógeno, y para contribuir al mejor crecimiento del cultivo (Marín y Romero 1993).

- Control de malezas, ya que su presencia afecta la fase de establecimiento del cultivo, tanto al competir por los recursos, como al participar como hospedantes de plagas, y en el caso de la sigatoka, por propiciar condiciones de microclima adecuadas para el patógeno (Soto 1985)

- Deshoja sanitaria o manejo del área foliar dañada por el hongo. Esta práctica es una forma de reducir la fuente de inóculo dentro de la plantación. En hojas agobiadas por la enfermedad la descarga de esporas se puede prolongar hasta por veinte semanas (Bureau *et al* 1992); con las hojas cortadas y el envés en contacto con el suelo se limitaría la descarga a cuatro semanas (Bustamante y López 1982). En esta práctica se incluye el despunte y la deshoja sanitaria

- Manejo de la población de plantas para evitar la formación de áreas con concentración de estas (ranchos) que son fuente de inóculo, tanto por la condición de microclima que crean como por las dificultades para una efectiva cobertura y acción del producto fungicida (Bureau *et al* 1992)

- Otras prácticas como fertilización y manejo de nematodos, mejoran la eficacia del manejo de la enfermedad (Marín y Romero 1993)

En muchas plantaciones comerciales de banano, por las condiciones actuales del mercado se ha disminuido la frecuencia en la realización de algunas de estas actividades con consecuencias graves para la producción.

2.1.5.2. Resistencia varietal

Todas las variedades comerciales de banano (AAA) y plátano (AAB) son susceptibles a la enfermedad. Los plátanos Pelipita (ABB) y Cuadrado (ABB) han mostrado tolerancia (González 1987).

En diploides avanzados se ha logrado incorporar niveles de resistencia de los diploides silvestres *Musa acuminata* sub-especie *burmannica* y sub-especie *maleccensis* para la obtención de nuevas variedades (Stover 1987).

Debido a que todas las variedades comerciales comestibles son susceptibles a la enfermedad, con fruto partenocárpico y de semilla sexual estéril, existe la necesidad de aplicar nuevas técnicas de mejoramiento (diferentes al mejoramiento genético convencional) y de selección para obtener cultivares resistentes

En Costa Rica, así como en otros países se están evaluando por sus características de producción y resistencia a la sigatoka negra las variedades tetraploides FHIA-01 Y FHIA-02 provenientes del centro con el mismo nombre en Honduras (Erick Bolaños, CORBANA, 1994, com pers).

2.1.5.3. Uso de fungicidas

Los fungicidas han sido las principales herramientas de manejo de la enfermedad. Estos incluyen los protectantes, los de acción sistémica local y los sistémicos (Marín y Romero 1993).

Para mejorar el control se aplican mezclas o "cocteles" que combinan fungicidas protectantes con sistémicos, y rotaciones de productos para prevenir el desarrollo de resistencia a los fungicidas sistémicos (Stover y Fullerton 1989)

Estas prácticas son complementadas con la utilización de métodos de pronóstico (preaviso) para racionalizar el número de aplicaciones (Bureau *et al* 1992), y con labores de seguimiento (monitoreo) del desarrollo de resistencia en las poblaciones del hongo (Marín y Romero 1993),

El uso de productos agroquímicos en el control de plagas puede reducir las poblaciones de microorganismos en el filoplano. Se ha documentado que los ditiocarbamatos inhiben el crecimiento de hongos saprófitos, con poco a ningún efecto sobre las bacterias (Fokkema 1981). Zineb, benomil y tiabendazol inhiben el crecimiento de algunas levaduras y hongos filamentosos (Dickinson y Wallace 1976, Egdinton *et al* 1971)

Estos trabajos sugieren que cualquier programa de manejo integrado de enfermedades debe tomar en cuenta el espectro de acción del producto químico para que sea compatible con otros elementos de manejo como el control biológico (Blakeman y Fokkema 1982).

Se ha evaluado a nivel de laboratorio y campo la compatibilidad de mezclas de *B. thuringiensis* con diferentes productos químicos, basados en que la adición de dosis subletales de productos químicos a suspensiones de esta bacteria mejoran la efectividad en el control de organismos plaga. Se encontró en pruebas *in vitro* que zineb a la concentración de 3,0 g de ia/L afectó la germinación y crecimiento de las esporas del microorganismo (Jiménez *et al* 1989).

González (1995) identificando microorganismos antagonistas a *M. fijiensis*, evaluó cepas de *Serratia* sp. y *Bacillus* sp. por su compatibilidad *in vitro* con los fungicidas y coadyuvantes comerciales. Se demostró compatibilidad de las cepas con los fungicidas, pero no así con los coadyuvantes que aparentemente afectaron las poblaciones de estos microorganismos.

2.2. El control biológico en la filosfera como opción

2.2.1. Fundamentos y estrategias del control biológico

El control biológico se ha definido como la reducción de la cantidad de inóculo del organismo patógeno o de su actividad patológica, directa o indirectamente, con uno o más organismos diferentes al hombre (Cook y Baker 1983), incluyendo la planta misma

De acuerdo a la zona de acción del patógeno y del control, se diferencian el control biológico en la rizosfera y el control biológico en la filosfera

Se considera que la comunidad microbial de la filosfera es un sistema abierto. La dinámica poblacional en este medio es función de su multiplicación, inmigraciones, muertes y emigraciones (Andrews 1992).

En cualquier planta podemos encontrar las hojas colonizadas por diversos microorganismos epífitos, los cuales se clasifican como residentes si son capaces de multiplicarse en la filosfera sin causar daños a las hojas; y el grupo de los transitorios dispersados por el aire u otros agentes y que permanecen latentes hasta que se presentan las condiciones ambientales adecuadas para su germinación (Blakeman y Fokkema 1982), en estos últimos se incluye *M. fijiensis*.

El conocimiento de estas relaciones en la filosfera es aprovechado por las prácticas de control biológico para manejar los patógenos.

Existen desventajas en la filosfera con respecto a la rizosfera para la aplicación de prácticas de control biológico. Estas se resumen en variabilidad en las condiciones ambientales (menos importante en el suelo) y amplia disponibilidad y efectividad de los fungicidas aplicados al follaje (Blakeman y Fokkema 1982)

Los mecanismos de acción de los agentes de control biológico con base en la ecología microbial incluyen la acción directa sobre el patógeno a través de la antibiosis, competencia por nutrientes o por nichos, y el parasitismo (Morris y Rouse 1985). El otro mecanismo es indirecto y actúa por alteración de la fisiología de la planta aumentando su capacidad de resistencia al ataque del patógeno, donde se ha identificado la protección o resistencia inducida (Tomashow y Weller 1988).

Las estrategias de control incluyen la inoculación de semillas con rizobacterias promotoras del crecimiento, sistemas bióticos que excluyen al patógeno del hospedante y el uso de plantas transgénicas (Jacobsen y Backman 1993).

Entre las estrategias, las más aplicadas han sido la introducción de organismos antagonistas y la manipulación del ambiente físico y/o nutricional en el cual se desarrollan los microorganismos (Bravo y Victoria 1981).

2.2.2. Situación actual del control biológico de patógenos

Esta opción de manejo de patógenos está recibiendo mayor atención por el énfasis actual en la sostenibilidad de los sistemas de producción agrícola que tiende a reducir el uso de productos agroquímicos en dichos sistemas (Jacobsen y Backman 1993, Johnson 1994) y las medidas regulatorias para disminuir la contaminación de alimentos con residuos de plaguicidas.

Hay consenso en que se mejorará la eficacia de los agentes biocontroladores si se adquieren más conocimientos de la ecología planta-agente de control y de los mecanismos de acción de los agentes (Jacobsen y Backman 1993).

Hasta el año 1993 el número de productos biológicos registrados en los Estados Unidos solo alcanzaban a seis, lo que no se considera una sorpresa si se toma en cuenta que la investigación orientada al desarrollo de productos biológicos tiene de 15 a 20 años (Cook 1993, Jacobsen y Backman 1993).

Entre las limitaciones que encuentran los productos biológicos para su utilización en gran escala están su menor disponibilidad, eficacia y espectro de acción en comparación con los plaguicidas químicos (Andrews 1992).

Un factor considerado también perjudicial es que el desarrollo de plantas transgénicas en biotecnología se ha sustentado en más de un 30% en cepas de *Bacillus thuringiensis*, lo que crearía uniformidad genética de los materiales, nueva evolución de resistencia por las plagas y pérdida de eficacia de la alternativa en el futuro (Hobbelink 1994).

Por tanto, el control biológico debe orientarse a aprovechar agentes o prácticas de control con diferentes mecanismos de acción, para dificultar la evolución de las plagas por la complejidad de los reguladores a los que se enfrentaría

2.2.3. La resistencia inducida como estrategia de control biológico

La resistencia inducida, protección inducida, resistencia adquirida o inmunidad inducida se refieren a reacciones en que una planta estimulada previamente por un agente inductor desarrolla mecanismos de resistencia suficientes para controlar un patógeno, limitando su infección (Kuc 1981).

Esta respuesta en las plantas se mantuvo en estudio a nivel de laboratorio hasta hace poco más de 10 años (Hammerschmidt y Kuc 1995). Desde entonces, se ha incrementado el interés en la resistencia inducida como un medio seguro para el control de enfermedades y utilizarlo como modelo de estudio de los genes involucrados en las reacciones de defensa de la planta y de las "señales" que las regulan.

Esta reacción se puede lograr con inoculación controlada de patógenos, de razas atenuadas de patógenos, de organismos no patógenos, y tratamientos con sustancias químicas, entre otros (Dean y Kuc 1987).

El fenómeno de resistencia se logra en la planta de forma local o sistémica, siendo en este último caso de amplio espectro, restringiendo la infección de varios hongos, bacterias o virus (Kuc 1982).

Muchas de las experiencias en el uso de microorganismos no patogénicos incluyen suspensiones y filtrados de cultivos de *Bacillus* sp., los cuales se han efectuado en condiciones controladas (Maiss 1987, Schmidt 1988).

Se cree que el aumento en la actividad de las enzimas quitinasas y glucanasas en las plantas es un componente de la defensa y uno de los cambios bioquímicos que ocurren cuando las plantas son tratadas con inductores (Linhorst 1991).

2.2.4. Enzimas líticas y su relación con la resistencia a patógenos

Las plantas responden al ataque de patógenos con la expresión de una serie de genes que codifican diversas proteínas, muchas de las cuales se cree que actúan en la defensa vegetal (Bol *et al* 1990). De estas proteínas se han identificado las enzimas quitinasas, las cuales provocan lisis en los extremos de las hifas de hongos susceptibles (Broekaert *et al* 1988)

Las quitinasas se han clasificado en endoquitinasas y exoquitinasas de acuerdo a su sitio de acción en la planta, y la determinación de su actividad puede hacerse por diferentes pruebas bioquímicas (Boller *et al* 1983)

Además de la pared fungosa, otros compuestos que sirven de sustrato para las quitinasas son el peptidoglicano bacteriano, la quitina soluble y en algunos casos el quitosano (Molano *et al* 1979, Boller *et al* 1983, Bernasconi *et al* 1987). Hasta el momento no se han identificado sustratos endógenos en la planta

En la planta, las quitinasas pueden ser inducidas por varios factores que incluyen ataques de plagas, tratamientos con inductores (elicitores) que pueden ser factores abióticos como metales pesados, o factores bióticos como microorganismos vivos. Su inducción está correlacionada frecuentemente con la inducción de β -1,3 glucanasas específicas y otras proteínas (Bowles *et al* 1991).

Debido a que en pruebas *in vitro* con hongos, el crecimiento de estos no fue inhibido por quitinasas solas, se cree que la efectividad de las quitinasas depende de la acción simultánea con β -1,3 glucanasas u otras sustancias antifúngicas (Mauch *et al* 1988)

La actividad de las quitinasas también se ha detectado en diversos microorganismos con potencial para el control biológico de patógenos, asociándola con su efecto antimicrobiano (Ordentlich *et al* 1988, Lorito *et al* 1993 y 1994).

En trabajos con organismos de la filósfera de banano y tomate identificados en pruebas *in vitro* como quitinolíticos, se ha detectado también actividad glucanólítica en algunos antagonistas a hongos patógenos de dichos cultivos (Elkin Bustamante, Roberto González y Arturo Gamboa, sin publicar)

En pruebas de inoculación de plantas con patógenos generalmente ocurre que el incremento de la actividad de las quitinasas es mayor en plantas resistentes que en susceptibles. Esta respuesta se obtuvo con *Cladosporium fulvum* en tomate (Joosten y De

Wit 1989), *Colletotrichum lindemuthianum* en frijol (Daugrois *et al* 1990) y *Phoma lingam* en colza (Rasmussen *et al*, 1992a y 1992b)

En estudios preliminares sobre mejoramiento genético en banano se compararon los niveles de las enzimas quitinasas y β -1,3 glucanasa en extractos foliares provenientes de los espacios intercelulares de una variedad resistente (Yangambi) y una susceptible (Gran Enano) a la sigatoka negra. El cultivar susceptible mostró valores superiores para las dos enzimas (Du Montcel y Hugon 1994).

2.2.5. Control biológico de la sigatoka negra

El control biológico de la sigatoka negra de acuerdo a la literatura existente se ha basado en la inoculación de antagonistas previa a la llegada del patógeno

Jiménez *et al* (1985) aislaron de la hoja de banano bacterias epífitas que fueron evaluadas por su antagonismo a *M. fijiensis*. De un total de 225 cepas, 12 se comportaron como antagonistas *in vitro*; mientras que *in vivo*, la inoculación de una cepa de *Pseudomonas sp.* en plantas de invernadero mantuvo su antagonismo al hongo superando la aplicación de clorotalonil.

Por los problemas que han tenido para establecerse sobre la superficie foliar las bacterias del género *Pseudomonas*, la selección de bacterias antagonistas se ha dirigido hacia aquellos organismos con alto potencial para colonizar la superficie y/o con capacidad para formar estructuras de resistencia en condiciones ambientales adversas, como es el caso de *Bacillus sp.*

Con base en el aprovechamiento de la colonización interna de la planta por microorganismos antagonistas a *M. fijiensis* para protegerlas del patógeno, Rodríguez (1995) trató de determinar en plátano variedad Curraré el efecto de microorganismos inoculados vía endofítica. De acuerdo con los resultados obtenidos no se demostró efecto de los organismos sobre la enfermedad.

González (1995) utilizó bacterias como antagonistas a *M. fijiensis*, las cuales se inocularon a una concentración de 10^9 ufc/mL y redujeron la severidad de la enfermedad en campo. Estos resultados se consideran promisorios para la aplicación de prácticas de control biológico en el manejo de la sigatoka negra en banano.

2.3. Las bacterias como agentes de control biológico

2.3.1. Fundamentos para el uso de bacterias en el control de patógenos foliares

Las bacterias constituyen el grupo más utilizado en control biológico por ser los más numerosos de la microflora foliar, por su alto potencial de colonización y por su habilidad para utilizar diferentes formas de nutrimentos bajo condiciones ambientales diversas (Blakeman 1993)

El uso de bacterias en el control biológico de enfermedades foliares se ha constituido en una estrategia promisoría por la evidencia de ejemplos exitosos (Windels y Lindow 1985)

Los resultados desfavorables con la aplicación de bacterias del género *Pseudomonas* orientaron los estudios hacia el uso de organismos capaces de secretar enzimas hidrolíticas de las paredes celulares de patógenos que actúen también como inductores de mecanismos de resistencia en las plantas y/o que formen estructuras de resistencia ante condiciones climáticas adversas, y esta es la tendencia que se ha seguido en el CATIE en los trabajos más recientes (Rivera 1992, Okumoto y Bustamante 1993a y 1993b, González 1995, Rodríguez 1995, Sánchez, en prensa, González, en prensa).

2.3.2. El género *Bacillus* en control biológico en la filosfera

2.3.2.1. Características relevantes del género

Los organismos del género *Bacillus* pertenecen a la familia Bacillaceae, tienen células en forma de bastón, la mayoría móviles con flagelos laterales. Todos forman endosporas resistentes al calor, son gram-positivos, aerobios estrictos o anaerobios facultativos (Buchanan y Gibbons 1974).

Se encuentran de forma frecuente en el suelo, aire y agua (Collins, 1969).

2.3.2.2. Especies del género como biocontroladores

El potencial y uso comercial de cepas del género *Bacillus* en control biológico es conocido en muchos cultivos.

Con aplicaciones de la cepa PPL-3 de *B. subtilis* tres veces por semana se redujo la severidad de la roya en frijol hasta en un 75% y se tuvo un efecto significativo en el crecimiento de la planta, la cual mostró una coloración más verde y mayor succulencia (Baker *et al* 1983)

Okumoto y Bustamante (1993b) aislaron de hojas de tomate cepas de *Bacillus* sp. y *Pseudomonas* sp., las cuales fueron evaluadas como antagonistas a *Alternaria solani*. La mayoría de las cepas de *Bacillus* sp. se comportaron como buenos antagonistas *in vitro* afectando el crecimiento del tubo germinativo del hongo

De la filosfera de muchos cultivos se han aislado cepas de *Bacillus* con amplio potencial para su uso como agentes de control biológico (Zavaleta-Mejía *et al* 1989a, Bora *et al* 1993, Saikia y Chowdhury 1993).

2.3.3. El género *Serratia* en control biológico

2.3.3.1. Características relevantes del género

Los miembros del género *Serratia* pertenecen a la familia de las enterobacteriáceas, gram-negativas con forma de bastón, móviles por flagelos peritricos (Buchanan y Gibbons 1974).

Estas bacterias son obicuas en la naturaleza encontrándose comúnmente como saprófitos en agua, suelo, leche y otros alimentos (Grimont y Grimont 1978, Buchanan y Gibbons 1974). Algunos miembros del género se han encontrado con frecuencia como patógenos oportunistas de pacientes en hospitales (Starr *et al* 1976).

Cuando presente, una característica distintiva de las colonias es la coloración rosada, roja o magenta que les da un pigmento insoluble en agua denominado prodigiosina, variando la coloración con la fuente nutricional del organismo (Buchanan y Gibbons 1974). Esta pigmentación se considera de importancia para bacterias epífitas porque actúa como protector contra la radiación ultravioleta, que es un factor limitante del establecimiento de estos organismos sobre el filoplano (Starr *et al* 1981)

2.3.3.2. *Serratia entomophila* como biocontrolador

Serratia entomophila fue aislada del gusano del pasto de Nueva Zelanda *Costelytra zealandica* (Trought *et al* 1982), constituyéndose en un agente promisorio para el control biológico de insectos.

Esta especie no se ha aislado de otros animales o plantas, y se ha estado aplicando para el control del gusano del pasto de Nueva Zelanda, del que parasita la larva y causa la muerte en un periodo de cuatro a seis semanas (Jackson *et al* 1986)

Pasados casi 10 años desde el primer aislamiento de la bacteria se desarrolló un insecticida microbial (Invade) para el control de *Costelytra zealandica* basado en *S entomophila* que fue registrado como producto en Nueva Zelanda. Este es el primer microorganismo endémico registrado como insecticida microbial para ser aplicado a dosis de 1 L/ha con un mínimo de unidades viables de *S entomophila* de 4×10^{10} /mL (Jackson *et al* 1993).

Basado en la premisa de un posible control de patógenos con el uso de organismos antagonistas no residentes en el hospedante y por su probada seguridad para la salud humana, González (1995) utilizó una cepa de *S entomophila* por sus buenas características quitinolíticas *in vitro* con resultados positivos en la reducción de la severidad de la sigatoka negra en banano a nivel de invernadero y campo

2.3.3.3. *Serratia marcescens* como biocontrolador

Se considera que esta es la especie más estudiada del género. Produce dos enzimas proteasas, una metaloproteasa, una serinoproteasa (Kaska 1976), y una quitinasa (Lysenko 1976).

En una revisión crítica de los enemigos naturales del plegador de la hoja de arroz *Cnaphalocrocis medinalis* se incluyó *S. marcescens* como un potencial agente de control biológico de la plaga (Joshi *et al* 1987)

Zavaleta-Mejía *et al* (1989a) utilizando aislamientos de *S. marcescens* de la rizosfera redujeron la severidad de los daños por *Meloidogyne incognita* en raíces de tomate. Estos resultados a nivel de invernadero se atribuyeron a la secreción de sustancias volátiles producto de la actividad metabólica de la bacteria (Zavaleta-Mejía *et al* 1989b) que inactivaron los estados ninfales del nematodo agallador.

S. marcescens con otras bacterias y hongos aislados del filoplano de frijol mungo *Vigna radiata*, protegieron el cultivo de la mancha bacteriana de la hoja causada por *Xanthomonas campestris* pv. *vignaradiatae* Dye. *S. marcescens* propició mejor control cuando fue aplicada 48 horas antes o simultáneamente con la inoculación del patógeno (Bora *et al* 1993).

En arroz, se aislaron una serie de organismos de la microflora del filoplano que incluían *S. marcescens*, y que fueron probados por su efecto sobre el tizón bacteriano del follaje causado por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Saikia y Chowdhury 1993). En pruebas sobre tejido foliar se redujo la severidad de la enfermedad en más de un 50%.

De suelos infestados con *S. rolfsii* se aislaron doscientas tres cepas bacterianas de la rizosfera de frijol, maní y garbanzo. El mejor agente de control del patógeno en condiciones de invernadero fue identificado como *S. marcescens* con el que se logró reducir la pudrición de corona hasta en un 75%. Con poblaciones de 10^5 - 10^6 ufc/g de suelo se logró el mejor control de la enfermedad (Ordentlich *et al* 1987).

Esta cepa fue evaluada también por su efecto sobre el sancocho o "damping off" en frijol causado por *Rhizoctonia solani*, logrando reducir la enfermedad en un 50% (Ordentlich *et al* 1987). El mecanismo de acción que se atribuyó al antagonista fue de competencia por nutrimentos con el patógeno.

Continuando los trabajos, Ordentlich *et al* (1988) demostraron que el aislamiento fue capaz de degradar la N-acetil-D-glucosamina que forma la quitina de la pared celular de *S. rolfsii*. La detección de este mecanismo de acción dio inicio a trabajos de ingeniería genética para codificar los genes responsables de la secreción de las enzimas quitinasas y usarlos en la obtención de plantas transgénicas (Chet *et al* 1990).

González (1995) aisló cepas bacterianas de la filofera de banano, de las cuales cuatro cepas pigmentadas fueron identificadas como *S. marcescens* y mostraron buenas características quitinolíticas y de antagonismo a *M. fijiensis*.

El aprovechamiento de organismos como biocontroladores basados en su acción enzimática y no antibiótica se presenta como una alternativa viable para la aplicación del control biológico con menores riesgos para los humanos.

2.4. Manipulación del ambiente como estrategia de control biológico

2.4.1. Fundamentos de la manipulación del medio para el control de patógenos

La manipulación del ambiente se basa en la modificación de las condiciones físicas y/o nutricionales del filoplano, con el objetivo de perjudicar la germinación y establecimiento del patógeno y/o favorecer al antagonista.

Esta estrategia requiere un mayor estudio del ecosistema de la filosfera para determinar la(s) variable(s) nutricional(es) que favorecen la actividad del antagonista o del patógeno (Morris y Rouse 1985)

Es difícil encontrar el antagonista perfecto a un patógeno en particular, especialmente en condiciones del trópico por la mayor diversidad y actividad biológica. Una serie de características de los antagonistas como su capacidad competitiva, habilidad para multiplicarse y persistir durante condiciones ambientales desfavorables, pueden ser mejoradas con el manejo de las condiciones ambientales en la filosfera (Blakeman y Fokkema 1982)

2.4.2. Factores ambientales limitantes del desarrollo de microorganismos epifitos

Los microorganismos en la superficie de las hojas están expuestos al efecto del ambiente químico en la superficie (Blakeman y Fokkema 1982), y a la influencia directa de los factores climáticos, especialmente la disponibilidad de agua y la radiación (Blakeman, 1993).

El ambiente en el filoplano es más oscilante que en la rizosfera; en el día la temperatura de las hojas es generalmente de 2-3 °C mayor que la del aire circundante, mientras que en la noche ocurre al contrario (Blakeman 1985). La humedad relativa es el principal factor que determina el crecimiento y la supervivencia de los microorganismos en este hábitat.

Las levaduras están bien adaptadas para resistir condiciones climáticas adversas en las hojas por desarrollar grandes cantidades de polisacáridos extracelulares, los cuales proveen cierto grado de protección contra la pérdida de agua, de allí que puedan persistir durante ciertos períodos de baja humedad (Blakeman 1985).

Algunos hongos filamentosos frecuentemente persisten en las hojas en forma de esporas que son más resistentes a la desecación (Blakeman 1993)

Del medio químico de la filosfera, los nutrimentos deben estar disponibles en cantidades adecuadas para propiciar el establecimiento de los organismos epífitos (Blakeman 1985)

2.4.3. Fuentes de nutrimentos para la microflora epífita de las hojas

El crecimiento de organismos epífitos en la superficie foliar sería nulo sino hubieran nutrimentos disponibles.

Los nutrimentos del filoplano tienen origen endógeno y exógeno, e incluyen una variedad de sustancias de naturaleza orgánica e inorgánica (Morris y Rouse 1985)

En las fases iniciales de crecimiento de la planta, la principal fuente de nutrimentos para los organismos epífitos es el tejido foliar y, las cantidades de compuestos que contienen carbono y nitrógeno (principalmente azúcares y aminoácidos) son bajas, lo que se refleja en bajos niveles de poblaciones microbianas (Blakeman 1985)

De los nutrimentos exógenos destacan partículas de suelo, polvo, iones y solutos del agua de lluvia, deposición de áfidos, microorganismos muertos y excrementos de insectos y aves; también el polen ha sido reconocido como nutrimento (Andrews 1992)

Algunas sustancias liberadas de las esporas de los hongos y metabolitos microbiales extracelulares sirven de nutrimento para organismos epífitos. Se ha documentado que las levaduras producen ácidos grasos que restringen el crecimiento de algunas bacterias y sirven como promotores del crecimiento de otras levaduras (Morris y Rouse 1985).

En la planta, la composición en cantidad y calidad de los exudados foliares es cambiante y depende de una serie de elementos que incluyen a la planta misma, posición de la hoja, superficie de la hoja, edad de la planta, radiación, temperatura, tipo de fertilizante nitrogenado, pH del medio y los daños sufridos por la hoja (Morgan y Tukey 1964, Blakeman 1972, Kumar y Gupta 1976, Rodger y Blakeman 1984)

En las condiciones del trópico, con precipitaciones intensas y frecuentes, ocurren pérdidas de nutrimentos en las hojas por la acción erosiva de la lluvia y reacciones donde

iones H^+ en la película de agua sustituyen a los cationes (Ca^{+2} , Mg^{+2} y K^+) en los sitios de intercambio de la pared celular o la cutícula (Andrews 1992)

Se ha indicado que la disponibilidad de nutrimentos en el filoplano es limitada, convirtiéndose entonces la competencia por nutrimentos en un factor clave en la determinación del tamaño de las poblaciones microbianas (Blakeman 1993)

2.4.4. Composición de nutrimentos en la filosfera

Los nutrimentos de la filosfera incluyen una variedad de carbohidratos, aminoácidos, ácidos orgánicos, azúcares, trazas de elementos minerales, vitaminas y hormonas, así como de algunos compuestos antimicrobianos como fenoles y terpenoides (Andrews 1992).

Se han hecho estimaciones del contenido de nutrimentos en los exudados foliares, las cantidades de carbohidratos y aminoácidos se ubican en poco menos de 100 mg/mL de exudado o su correspondiente en mg/m² de hoja (Andrews 1992) A estos compuestos se les considera los más importantes en proporción del sustrato orgánico de la hoja (Blakeman 1993).

Se han documentado las cantidades totales de carbohidratos y aminoácidos en lavados de hoja de una serie de cultivos (melón, sandía, pepino, tomate, algodón, lechuga, ajo y remolacha), variando en un ámbito de 3 a 74 mg/mL para carbohidratos, y de 3 a 52 mg/mL para aminoácidos (Chet *et al* 1973), reflejándose una mayor proporción de azúcares (1,2 a 1,5 veces mayor) que aminoácidos en los cultivos evaluados

Ciertos compuestos como la glicina, ribosa y xylosa se han indicado como parte de los exudados de otras plantas, pero cuando estos se encuentran en bajos niveles su detección dependerá de la sensibilidad del método utilizado (Morqan y Tukey 1964)

Aparentemente las cantidades de carbohidratos (principalmente glucosa) muestran ser superiores en relación a los contenidos de aminoácidos, siendo estos compuestos los más estudiados e identificados en los exudados foliares. Sin embargo, hasta ahora no ha sido posible obtener un medio que simule la composición de los exudados foliares, aunque se han hecho algunos intentos (Lindow 1988)

A las características mencionadas se agrega que en la filosfera se presentan condiciones oscilantes por efecto de los factores ambientales, con una secuencia en la

composición de nutrimentos en la hoja que tendrán efecto sobre la composición de la comunidad microbial.

2.4.5. Utilización de nutrimentos por los microorganismos de la filosfera

Los nutrimentos tienen efecto tanto sobre el tamaño como la composición de microorganismos en la superficie foliar. Esta afirmación se originó de estudios de la utilización de nutrimentos en las hojas por los microorganismos y de los resultados de aplicaciones de compuestos orgánicos a la superficie de la hoja.

Trabajos de Blakeman y Brodie (1977) demostraron la competencia entre bacterias epífitas y esporas de algunos hongos fitopatógenos. Determinaron que las bacterias pueden aprovechar nutrimentos presentes en las hojas esenciales para la germinación de esporas de hongos y por tanto, aquellas tendrían un alto potencial para restringir la colonización de las hojas por patógenos fungosos.

En una determinación de la quimiotaxia de *Pseudomonas lachrymans* a extractos de plantas hortalizas y de los lavados de hoja, en pruebas con 16 aminoácidos, 6 nucleótidos y 14 carbohidratos, se encontró que solo fallaron en la atracción los azúcares. De estos, presentaron atracción a la bacteria: ribosa, arabinosa y glucosa. La combinación de azúcar + aminoácido fue superior que el compuesto respectivo solo (Chet *et al*, 1973).

Evaluando la competencia *in vitro* por sustratos exógenos entre microorganismos del filoplano y *Botrytis cinerea*, Brodie y Blakeman (1976) utilizaron diferentes combinaciones de aminoácidos y azúcares. Los resultados revelaron que las bacterias removieron 75-80% de los aminoácidos en 5 h, y menos del 30% de los azúcares en 24 h. La velocidad de remoción de los azúcares siguió la secuencia de prioridad fructosa > glucosa > sucrosa; de igual forma, se evidenció que la remoción de glucosa fue mayor en presencia de aminoácidos.

Blakeman y Brodie (1977) trabajando con hojas de remolacha, mostraron que aunque se ha establecido que bacterias y levaduras compiten activamente por aminoácidos, algunas cepas de *Pseudomonas sp.* y otros aislamientos bacterianos resultaron pobres competidores por azúcares.

El aumento de poblaciones de levaduras epífitas que ocurrió posterior a la aplicación de nutrimentos (2% de sucrosa + 1% de extracto de levadura) y agua en hojas de

remolacha, mostró que las cantidades de nutrimentos presentes en forma natural en la hoja eran una limitante para el crecimiento de los microorganismos epífitos (Bashi y Fokkema 1977).

Swinburne (1976) considera que los exudados foliares pueden afectar tres fases del desarrollo en hongos fitopatógenos, estas son la germinación de la espora, el crecimiento del tubo germinativo y la formación de estructuras infecciosas como el apresorio.

Los nutrimentos que promueven el crecimiento saprófito de los hongos pueden actuar como limitantes del desarrollo del apresorio (Emmett y Parbery 1975)

En pruebas con exudados de banano, Swinburne (1976) demostró que estos estimulaban la germinación de *Colletotrichum musae* causante de la antracnosis en frutos. El estímulo se debió principalmente a la presencia de ácido antranílico en el exudado. Los azúcares simples como la glucosa y la fructosa también estimularon la germinación pero suprimieron la formación del apresorio del hongo.

El conocimiento de la influencia de un conjunto de variables sobre el factor nutricional en la superficie foliar, propicia la realización de trabajos orientados a la aplicación de sustratos (al suelo o al follaje) que estimulen una mayor diversidad microbial y/o que tiendan a favorecer a los antagonistas en perjuicio de los organismos patógenos, para mejorar el control de enfermedades.

2.5. Sustratos para modificar la comunidad microbial de la filosfera

La aplicación de compuestos orgánicos al follaje se basa en que estos pueden actuar como nutrimentos, estimulantes del crecimiento o como inductores de competencia entre los microorganismos epífitos, entre otros mecanismos que se han propuesto (El Ghaouth *et al* 1995).

Las enmiendas podrían incrementar la eficacia de organismos antagonistas al proveerles nutrimentos y posibilitar la creación de nichos que serían favorables para los mismos.

2.5.1. Aplicación de azúcares

Los análogos de azúcares han mostrado que afectan procesos metabólicos en células vegetales y fungosas. En el tejido vegetal tienen la habilidad de inmovilizar fosfatos y reducir la síntesis de ATP, lo que se ha considerado como la base de su actividad biológica (Herold y Lewis 1977).

En trabajos efectuados para explorar el potencial de análogos de azúcares en el control de enfermedades post-cosecha en manzanas y peras, El Gháouth *et al* (1995) demostraron el potencial del 2-deoxy-D-glucosa como un buen agente que podría usarse en combinación con microorganismos antagonistas para mejorar su efectividad y/o en formulación con productos fungicidas.

2.5.2. Aplicación de celulosa

La celulosa es un polisacárido presente en la pared celular de muchos hongos. Anteriormente se creía que estaba presente solo en la pared de los organismos del subreino Oomycota y la quitina en los del subreino Eumycota (Whittaker 1969), pero se tienen evidencias de que esta dicotomía no es tal ya que existen hongos con ambos polisacáridos en su pared (Griffin 1994).

La celulosa aplicada al follaje podría actuar como fuente de carbón que promueve el crecimiento selectivo de antagonistas específicos productores de las enzimas necesarias para la digestión de la celulosa.

Davis *et al* (1992) obtuvieron buenos resultados en el control de *Gloeodes pomigena* y *Zygothiala jamaicensis* en frutos de manzana con la aplicación de una formulación de celulosa (0,5% p/v) + *Chaetomium globosum* (10^5 ascosporas/mL) + Soy-Dex (0,5% v/v) a los árboles. Este método mostró un medio promisorio para la aplicación de enmiendas foliares con el objetivo de favorecer la supervivencia y el crecimiento selectivo de los organismos antagonistas.

2.5.3. Aplicación de quitina

La quitina (polímero de unidades de N-acetilglucosamina) es un polisacárido constituyente común de la pared celular de los hongos, de la cáscara de huevos de

nematodos y del exoesqueleto de insectos y crustáceos. Su uso como enmienda foliar para modificar la ecología microbial y mejorar el control de hongos fitopatógenos, se ha investigado en los últimos años.

La adición de quitina al suelo infestado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* estimuló a bacterias de los géneros *Bacillus* y *Pseudomonas* que ejercieron control sobre el patógeno (Mitchell y Alexander 1961)

También la quitina depositada sobre la hoja puede funcionar como barrera física contra la germinación de las esporas y la penetración de hongos patógenos (Kokalis-Burelle *et al* 1992).

Se ha mostrado que la quitina aplicada en suspensión amorfa (Kokalis-Burelle *et al* 1992) o en suspensión coloidal (Ploper *et al* 1991) incrementó la supervivencia de microorganismos quitinolíticos

Kokalis-Burelle *et al* (1992) informaron que al aplicar una suspensión amorfa de quitina al follaje de maní ocurrió un cambio altamente significativo en la población de organismos epífitos. Se incrementó la proporción de quitinolíticos de menos del 1% hasta más del 40% de la población total de microorganismos

Bajo condiciones controladas de temperatura y humedad, con la aplicación de quitina coloidal al follaje de tomate, Okumoto y Bustamante (1993a) lograron incrementar las poblaciones de microorganismos quitinolíticos identificados en el cultivo.

González (1995) encontró efectos positivos en la supresión de la sigatoka negra en banano, con una aplicación semanal de quitina coloidal al 5,0% al follaje de plantas en campo.

2.5.4. Aplicación de quitosan

El quitosan es un derivado desacetilado de la quitina también presente en hongos, insectos y crustáceos.

Este compuesto tiene la habilidad de formar una película que cubre la superficie de frutos y vegetales, y regular el intercambio de gases y humedad. También se ha encontrado que tiene efecto fungicida y de inducción de resistencia (Wilson *et al* 1994)

Su potencial como agente fungicida se ha evidenciado en diferentes trabajos con hongos fitopatógenos (Allan y Hadwiger 1979; Hirano y Nagao 1989). Con base en

estudios *in vitro* se ha sugerido que el quitosan tiene mejor efecto fungicida que la quitina (Allan y Hadwiger 1979)

Las propiedades inductoras del quitosan se han demostrado con tratamientos de productos en postcosecha. La aplicación de quitosan en frutos de fresa, tomate y pimentón elevó los niveles de quitinasas, β -1,3-glucanasa, y quitosanasas hasta 14 días después del tratamiento (El Ghaouth y Arul 1992)

El tratamiento de semillas con bajas dosis de quitosan (0,002 a 0,02%) evidenció un buen potencial para proveer altos niveles de protección sistémica de algunos cultivos a patógenos como *Helminthosporium oryzae* y *Pyricularia oryzae* en arroz, *Cercospora arachidicola* y *Sclerotium rolfsii* en maní, y *Fusarium oxysporum* f sp *ciceri* en garbanzo (Sinha *et al* 1993).

En pruebas con tomate en invernadero, usando quitosan en una combinación de tratamiento de la semilla (1 mg/mL) con aplicación al suelo como enmienda (1 mg/mL) se obtuvo una reducción significativa de la incidencia de la pudrición radical y de corona por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Benhamou *et al* 1994).

Los estudios ultraestructurales en los sitios de penetración del hongo revelaron que el pretratamiento del tejido con quitosan fue correlacionado siempre con menor crecimiento del hongo, disminución de su viabilidad y una marcada acumulación de compuestos en los tejidos radicales (fenoles y β -1,3 glucano).

Entre los mecanismos de acción atribuidos al efecto del quitosan en el control de enfermedades, el estímulo de la microflora antagonista es una alternativa potencial.

2.5.5. Aplicación de leche

La leche es usada para el control de enfermedades por algunos agricultores costarricenses, aunque se desconoce su mecanismo de acción. En El Salvador se ha aplicado para evitar la transmisión de virus por insectos.

Recientemente, Okumoto y Bustamante (1993a) estudiaron el efecto de algunas enmiendas sobre el tizón temprano causado por *Alternaria solani* en tomate. La leche cruda (87% de agua, 5% de proteínas y 4% de grasas, lactosa, vitaminas y sales minerales) a una concentración de 4,8 L/200 L de agua no mostró efectos positivos en la supresión de la enfermedad.

2.5.6. Aplicación de melaza

La melaza tiene una composición aproximada de 60% de azúcares y la cantidad de nitrógeno presente es muy baja, por lo que no se considera con valor proteico (Carrera 1955). Está constituida por: 17-25% de agua, 30-40% de sacarosa, 4-9% de dextrosa, 5-12% de levulosa, otros hidratos de carbono, proteínas, ceras y algunas vitaminas (DGETA 1978)

La melaza se usa como fuente de carbohidratos en dietas para ganado (Morrison 1991). Este compuesto, que puede adicionarse en forma pura o diluida en agua se utiliza para aumentar la actividad de las bacterias responsables de la fermentación de los productos de ensilaje (Lara 1977)

En experimentos llevados a cabo con nabo y chile se aplicaron al suelo y hojas soluciones acuosas de melaza al 0,1% como fuente de carbono y energía para la población microbial existente (Higa y Wididana 1991). Los resultados mostraron incrementos en el número de bacterias, actinomicetes, y hongos del suelo y de las hojas. Se produjo un incremento en el número de bacterias fijadoras de nitrógeno en la superficie foliar del nabo y mayores rendimientos asociados con el aumento de las poblaciones microbianas.

La composición de carbohidratos de la melaza la convierte en una fuente de sustrato de fácil obtención y bajo costo si se comprueba su acción positiva sobre los microorganismos benéficos del filoplano.

2.5.7. Aplicación de almidón de yuca

El almidón de yuca fue evaluado como adherente en mezcla con una bacteria antagonista al ojo de gallo *Mycena citricolor* en cafeto, con buenos resultados en el control del patógeno para un tratamiento de bacteria+turba+almidón de yuca. Se reconoció que el almidón de yuca pudo tener un efecto de sustrato para la bacteria, el cual no fue evaluado (Calvo y Vargas 1989).

2.5.8. Aplicación de aminoácidos

Existen una serie de nuevos abonos foliares formulados con base en aminoácidos, los cuales son utilizados por muchos productores de hortalizas en Costa Rica. Su posible efecto sobre la microflora foliar epífita no ha sido estudiado.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. Localización de los experimentos

Los trabajos de laboratorio, invernadero y parte de campo fueron realizados en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), y el ensayo de campo en la Escuela de Agricultura de la Región Tropical Húmeda (EARTH).

El CATIE se localiza en Turrialba, provincia de Cartago, situada a 602 msnm a 9°55'21" N y 83°39'40" W, con temperatura, precipitación y humedad relativa promedio anual de 21,7 °C, 2065 mm y 87%, respectivamente

La EARTH se ubica en la localidad de Las Mercedes de Guácimo, provincia de Limón, en la zona Oeste de la vertiente Atlántica de Costa Rica, una de las tres zonas del país destacadas por la producción de banano. En la zona Oeste la precipitación y temperatura promedio se ubican en 3500 mm y 26 °C, respectivamente

3.2. SELECCION DE SUSTRATOS *in vitro*

3.2.1. Efecto de sustratos sobre multiplicación de microorganismos antagonistas

3.2.1.1. Material experimental

Los microorganismos evaluados fueron las cepas de *Serratia marcescens* R1 MIP-CATIE, aislada de la filosfera de banano (González 1995), *Serratia entomophila* A100 NRI-CATIE aislada por primera vez del gusano del pasto de Nueva Zelandia *Costelytra zealandica* (Trought *et al* 1982) y proporcionada por el Proyecto NRI en Costa Rica; y *Bacillus cereus* A30 MIP-CATIE aislado de la filosfera de tomate (Okumoto y Bustamante 1993b), todos identificados como organismos productores de quitinasas y utilizados en el Area de Fitoprotección del CATIE por su buena actividad antagonista *in vitro* e *in vivo* a *M. fijiensis* (González 1995).

Los sustratos probados fueron leche íntegra y descremada, melaza de caña y almidón de yuca obtenidos de fuentes comerciales (Anexos 1, 2 y 3), y abono foliar con base en aminoácidos (Biovit, LBE, composición (% p/v): 48,4 % de aminoácidos libres y 42,1 % de materia orgánica) usado por algunos productores de hortalizas en Costa Rica. La leche y el abono foliar fueron utilizados como fuentes básicas de nitrógeno (aminoácidos y/o proteínas), la melaza y el almidón como fuentes básicas de carbono (carbohidratos).

En el uso de las concentraciones de los sustratos se tomó en cuenta la proporción carbohidrato:aminoácido que sugiere la literatura como correspondiente a los exudados foliares, y la concentración de los mismos encontradas en el follaje de una serie de cultivos.

3.2.1.2. Tratamientos evaluados

De acuerdo a la fuente (carbono o nitrógeno), se probaron los sustratos solos y en mezcla, manteniendo la concentración de los mismos en cada caso.

Se consideraron como tratamientos en las pruebas, las suspensiones de las cepas bacterianas R1, A30 y A100 en mezcla con los sustratos: 1, agua destilada estéril (ADE) como testigo; 2, extracto de la superficie de la hoja de banano (Extracto de hoja); 3, leche; 4, abono foliar; 5, melaza; 6, almidón; 7, leche+melaza; 8, leche+almidón; 9, abono+melaza; y 10, abono+almidón.

Se hicieron tres pruebas de 10 tratamientos cada una con la mezcla de los diez sustratos y cada cepa bacteriana.

3.2.1.3. Procedimiento general

3.2.1.3.1. Preparación de la suspensión bacteriana

Las cepas de las bacterias antagonistas se cultivaron a 28°C en medio agar nutritivo quitina ANQ (2,3 % de agar nutritivo DIFCO, y 2,3 % de quitina coloidal, pH 7-8). La quitina coloidal fue obtenida de quitina SIGMA grado práctico sometida al método de Backman modificado por Okumoto y Salazar (Okumoto y Bustamante 1993a y 1993b) para la obtención de quitina coloidal a partir de conchas de camarones. A las 24 horas de

incubación las colonias se transfirieron con un asa bacteriana a tubos con ADE para obtener una suspensión concentrada de la bacteria

La suspensión fue ajustada a una concentración de 10^3 ufc/mL aproximadamente utilizando la cámara de conteo de bacterias Petroff-Hausser (French y Hebert 1982) y efectuando diluciones decimales en tubos con ADE

En la solución de *B. cereus* A30 se adicionó Tween 80 (0,01% v/v) para mejorar la dispersión de las ufc en la suspensión debido a la agrupación en cadena mostrada por las células de la cepa, que es una característica común de la especie (Buchanan y Gibbons 1974).

3.2.1.3.2. Preparación de los sustratos

La leche y el abono fueron utilizados a una concentración aproximada de 40 mg de aminoácidos (aa) o proteínas/L de solución; la melaza y el almidón a una concentración de 60 mg de carbohidratos/L de solución.

El sustrato de leche se preparó mezclando 20 g de leche íntegra en polvo (26 g de proteínas/100 g) con 100 mL de leche descremada (8,3 g de proteínas/250 mL) y con diluciones se ajustó a 40 mg de proteínas/L de solución, aproximadamente

El sustrato abono foliar (456,2 g de aminoácidos/L y 49% p/v de materia orgánica) se preparó añadiendo 0,088 mL del producto/L de solución para ajustar a 40 mg de aa/L.

La melaza (50% de carbohidratos) se preparó con 0,125 g/L de solución y el almidón (90% de carbohidratos) con 0,067 g/L, ajustando en ambos casos a 60 mg de carbohidratos/L de solución.

Para obtener el extracto de la superficie de hoja de banano que representara los exudados se tomó la sección media de la hoja cuatro (contada de arriba hacia abajo sin incluir la hoja bandera o candela) de plantas próximas a parición de la variedad Gran Enano. De esta parte, se cortaron secciones de tejido al azar en la zona próxima a la nervadura principal (Anexo 4), donde se ha indicado que se concentran los exudados foliares (Blakeman 1984). Se colocaron 10 g del tejido (peso fresco) en una solución de 100 mL de buffer fosfato (pH 7) con Tween 80 (0,1%) en un erlenmeyer de 125 mL. La mezcla se sometió a agitación constante (100 rpm) con agitador mecánico (Lab-line Instruments,

Inc , USA) a 28 °C por 45 min, considerados suficientes para desprender los exudados foliares de la superficie. Se obtuvo el extracto final por separación del líquido del tejido lavado.

Los sustratos se esterilizaron en autoclave vertical portátil a 121 °C y 15 psi de presión aproximadamente durante 25 min, posteriormente se ajustó el pH entre 7 y 8, a excepción del ADE y el extracto de hoja. Las soluciones que incluyeron melaza se trataron dos veces en autoclave para garantizar el efecto esterilizador sobre el compuesto.

3.2.1.3.3. Establecimiento del experimento

Por las características diferenciales de las cepas bacterianas (pigmentación, tasa de multiplicación, etc.), para medir su multiplicación se combinó una exposición en medio líquido (sustrato) con estriado posterior en medio sólido para efectuar el conteo de colonias.

Se adicionaron 9 mL de los sustratos con pH ajustado a tubos estériles. Se añadió 1 mL de la suspensión bacteriana preparada en el punto 3.2.1.3.1. en tubos estériles quedando una concentración inicial por tubo de 10^2 ufc de la cepa/mL de sustrato, aproximadamente. Se formaron entonces 10 tratamientos con la combinación de los 10 sustratos y cada cepa bacteriana.

Las mezclas sustrato+bacteria en los tubos fueron incubadas en forma estática a 28° C por 24 horas y posteriormente se efectuaron diluciones decimales de las mezclas hasta 10^4 y se realizaron siembras de cada dilución en platos petri con medio agar agua (AA). Se agregaron con pipeta serológica 0,02 mL de la mezcla por plato y se dispersó sobre el medio con un asa de vidrio. Cada tratamiento se replicó tres veces.

El conteo de las colonias se efectuó en la dilución donde se contabilizaran de 30 a 300 colonias por plato para disminuir el error en la estimación de la variable (ASM 1984).

3.2.1.4. Evaluación de los tratamientos y análisis estadístico

Se determinó la multiplicación de las bacterias por efecto de los sustratos. La variable evaluada fue el número de ufc a las 48 horas para R1 y a las 72 horas para A30 Y A100.

Las unidades contabilizadas por plato fueron expresadas en ufc/mL con la fórmula $ufc/mL = (\text{contaje} \times \text{dilución})/0,02 \text{ mL}$

La información fue procesada a través de un análisis de varianza de los valores originales y comparando los sustratos con el testigo de ADE por medio de la prueba de Dunnett. También se aplicó una prueba de contrastes de los efectos de los sustratos sobre la multiplicación de los microorganismos.

Para efectuar el análisis de los valores obtenidos para cada cepa, estos fueron transformados como $\ln(ufc + 0,5)$ para reducir la heterogeneidad de la varianza (Steel y Torrie 1985), después de haber efectuado pruebas de normalidad y homogeneidad.

3.2.2. Efecto de sustratos sobre habilidad quitinolítica de los microorganismos antagonistas

3.2.2.1. Material experimental

Se utilizó la cepa *S. marcescens* R1 como indicador de la respuesta de los microorganismos, y las mezclas de los sustratos bajo evaluación.

En esta prueba fue incluida quitina coloidal al 0,2% (p/v) como sustrato testigo de la respuesta de los antagonistas.

3.2.2.2. Tratamientos evaluados

Los tratamientos definidos para la prueba fueron: **1**, sustrato a base de quitina como testigo; **2**, extracto de la superficie de la hoja de banano (Extracto de hoja); **3**, leche; **4**, abono foliar; **5**, melaza; **6**, almidón; **7**, leche+melaza; **8**, leche+almidón; **9**, abono+melaza; y **10**, abono+almidón.

Cada uno de los diez sustratos se mezcló con la cepa bacteriana.

3.2.2.3. Procedimiento experimental

Se ajustó la suspensión bacteriana a una concentración de 10^6 ufc/mL en las mezclas con los sustratos como en el punto 3.2.1.3.2. Se formaron mezclas sustrato+bacteria como en la prueba anterior, a una concentración aproximada de 10^5 ufc de R1 por mL de sustrato.

Las mezclas sustrato+bacteria en los tubos fueron incubadas a 28° C por 24 horas. Luego, en platos petri de 150 x 20 mm con medio agar quitina (AQ) previamente divididos en cuadrados de 2,5 cm de lado, se colocó por cuadrado 0,01 mL de cada tratamiento. Cada tratamiento se replicó cuatro veces, correspondiendo un plato por repetición.

3.2.2.4. Variables evaluadas y análisis estadístico

Las variables evaluadas fueron la presencia/ausencia del halo transparente a las 48 horas de incubación en el medio, y la longitud de dicho halo a las 96 horas.

Para la determinación de la longitud del halo se efectuaron 4 mediciones (en mm) al azar desde el borde de la colonia hasta la prolongación del halo sobre el medio.

Se aplicó un análisis de varianza para la variable longitud del halo y una prueba de Dunnett para comparar los sustratos con el control a base de quitina.

3.2.3. Efecto de la concentración de los sustratos sobre multiplicación de los microorganismos antagonistas

En esta evaluación se probaron los mejores tratamientos de los ensayos 3.2.1. y 3.2.2. anteriores y se determinó su efecto sobre los organismos a diferentes concentraciones de cada sustrato seleccionado.

3.2.3.1. Material experimental

Con base en la similitud con las otras bacterias en la tendencia de la respuesta a los sustratos y por su alta tasa de multiplicación *in vitro* se utilizó la cepa *S. marcescens* R1.

Los sustratos probados fueron leche, melaza y leche+melaza a tres diferentes concentraciones cada uno

3.2.3.2. Tratamientos evaluados

Se efectuaron tres pruebas, una para cada mezcla de sustrato seleccionada a tres concentraciones diferentes (Cuadro 1).

Cuadro 1. Relación de tratamientos en cada prueba de efecto de concentración de los sustratos sobre *S. marcescens* R1.

Sustrato	Concentraciones del sustrato probadas *		
Leche	0,05 %	0,1 %	1,0 %
Melaza	0,01 %	0,1 %	1,0 %
Leche+Melaza	0,05·0,01%	0,1·0,1 %	1,0·1,0 %

* La menor concentración corresponde a la utilizada en las pruebas de multiplicación de las bacterias antagonistas
La concentración de leche en v/v y la melaza en p/v.

3.2.3.3. Procedimiento experimental

3.2.3.3.1. Preparación de la suspensión bacteriana

Se ajustó la suspensión bacteriana como en la prueba 1 (punto 3.2.1.3.1).

3.2.3.3.2. Preparación de los sustratos

La menor concentración para cada sustrato correspondió a la preparada para la prueba del efecto de los sustratos (Prueba 1), y las otras dos concentraciones fueron cada sustrato solo y en mezcla, en ambos al 0,1% y al 1,0%

Los sustratos fueron esterilizados y se ajustó el pH entre 7 y 8. Al igual que en las otras evaluaciones, las soluciones con melaza se esterilizaron dos veces.

3.2.3.3.3. Establecimiento del experimento

Se formaron mezclas sustrato+bacteria como en la Prueba 1, y a las 24 horas de incubación a 28 °C se efectuaron diluciones decimales de las mezclas hasta 10^{-5} y se sembró cada dilución en platos petri con medio agar agua (AA). Se agregaron 0,02 mL de la mezcla por plato y se dispersó sobre el medio, replicando cada tratamiento tres veces

Se contaron las colonias por cada dilución a las 48 horas. El conteo siguió el criterio de disminución del error en la estimación de la variable (ASM 1984)

3.2.3.3.4. Evaluación de los tratamientos y análisis estadístico

Se determinó la multiplicación de las bacterias por efecto de cada concentración del sustrato. La variable evaluada fue el número de ufc a las 48 horas de incubación en el medio sólido y se expresaron en ufc/mL.

La información fue procesada por medio de un análisis de varianza. Se aplicó una prueba de contrastes de los efectos de los sustratos sobre la multiplicación de los microorganismos.

Para efectuar el análisis los valores fueron transformados como $\ln(\text{ufc} + 0,5)$ para reducir la heterogeneidad de la varianza (Steel y Torrie 1985).

3.3. SELECCION DE SUSTRATOS EN INVERNADERO

En las pruebas de laboratorio se seleccionaron los tres mejores sustratos por la respuesta positiva de las cepas, tanto en multiplicación como en no afectar su capacidad quitinolítica. Antes de la prueba de estas alternativas a nivel de campo, era necesario evaluar la acción de los compuestos sobre la planta (*in vivo*)

A nivel de invernadero se efectuaron dos evaluaciones: una para determinar el efecto de los sustratos sobre los antagonistas y otra donde se evaluó el efecto de sustratos y organismos sobre la severidad de la sigatoka negra.

3.3.1. Material vegetal

Se utilizaron plantas de banano variedad Gran Enano (Giant Cavendish) susceptible a la sigatoka negra (Fouré 1990), obtenidas de cultivo de tejidos. Las plantas mantenidas en bolsas de polietileno y con un promedio de 5 hojas fueron trasplantadas a macetas plásticas Polyplast No 600 de aproximadamente 5 kg utilizando suelo esterilizado con bromuro de metilo ($0,459 \text{ kg/m}^3$ de suelo)

Fueron fertilizadas al momento del trasplante con fórmula completa (NPK 10-30-10), y a los 20 y 45 días después del trasplante (ddt) con urea (NPK 46-0-0) a una dosis de 10 g/pl. Posteriormente se mantuvo un ciclo mensual de fertilización a la misma dosis con fórmula completa

Las plantas se regaron diariamente y se les eliminó la hoja bajera en senescencia hasta el inicio de los ensayos. A los tres meses de trasplante (6 meses de edad aproximadamente) se iniciaron los ensayos y las plantas presentaban un promedio de seis hojas y una altura de 30 cm (medidos desde el suelo hasta el punto donde el peciolo de la hoja 1 abarca la hoja candela)

3.3.2. Efecto de sustratos sobre población de antagonistas.

3.3.2.1. Medición de las condiciones climáticas en invernadero

Se registraron los valores de temperatura ($T^{\circ}\text{C}$) y humedad relativa (H R. %) en casa de mallas en diferentes momentos del día durante el tiempo de realización de la prueba (17 días). Se registraron los valores correspondientes a las 6:00, 12:00 y 18:00 horas con la ayuda de un termohigrómetro (Airguide Instrument Co., Chicago, USA)

También se registraron los valores de temperatura y humedad relativa para dicho período en condiciones de campo con información proveniente de la estación climatológica del CATIE.

3.3.2.2. Material experimental

Se utilizó la cepa *S. marcescens* R1 como indicador del efecto del sustrato por recuperación de la bacteria de las hojas inoculadas. La cepa utilizada en las inoculaciones

era reaislada de plantas de banano previamente inoculadas con el organismo para mantener su acción biológica ya que es probable una disminución de su actividad por el manejo continuo en medios artificiales de laboratorio (Yarwood 1973)

Se evaluaron los sustratos leche, melaza y leche+melaza (al 1,0% p/v en solución) y quitina coloidal al 4,5% (p/v), esta última utilizada en trabajos previos como sustrato para estimular las poblaciones de organismos quitinolíticos en banano (González 1995, González, Bustamante, Okumoto y González, datos sin publicar)

3.3.2.3. Tratamientos evaluados y diseño experimental

Los tratamientos aplicados incluyeron los sustratos seleccionados en combinación con la bacteria y los testigos para cada sustrato. La relación de tratamientos fue la siguiente:

- | | |
|-----------------|---------------------|
| 1. Testigo | 6. Leche + R1 |
| 2. Ceba R1 | 7. Melaza |
| 3. Quitina | 8. Melaza + R1 |
| 4. Quitina + R1 | 9. Leche + melaza |
| 5. Leche | 10. Leche+melaza+R1 |

Se aplicó un diseño en bloques completos al azar (DBCA) con tres repeticiones correspondientes a tres tiempos de muestreo y dos plantas por cada repetición.

3.3.2.4. Procedimiento general

3.3.2.4.1. Aplicación de tratamientos

Las plantas fueron asperjadas con la cepa antagonista a una concentración aproximada de 10^7 - 10^8 ufc/mL en una solución de caldo nutritivo+dextrosa+quitina (0,4% de caldo nutritivo DIFCO; 2,3% de quitina coloidal y 0.2% de dextrosa DIFCO) preparada en el Area de Fitoprotección del CATIE para la multiplicación de bacterias quitinolíticas (Bustamante, González y Gamboa 1995, en prensa).

Las aplicaciones se efectuaron con atomizadores manuales y fueron dirigidas a toda la planta hasta lograr total humectación o punto de escurrimiento. Las plantas de los

tratamientos que no correspondía ser inoculadas con la bacteria fueron asperjadas con agua.

A los siete días después de la inoculación de la bacteria (ddi) se aplicaron los sustratos (quitina, leche, melaza y leche+melaza) siguiendo el criterio de aplicación a toda la planta

Las plantas fueron regadas diariamente dirigiendo el flujo de agua hacia la maceta para limitar la diseminación de la bacteria dentro del invernadero entre los tratamientos que incluyeron los sustratos solos.

3.3.2.4.2. Recuperación de la población bacteriana

El establecimiento de la bacteria por efecto de los diferentes tratamientos sobre y bajo la hoja fue cuantificado por la técnica de lavado de hojas y dilución en platos.

A los tres y siete días después de la aplicación de los sustratos (dda), se procesaron muestras de hojas para efectuar conteos de las poblaciones de la cepa en laboratorio.

Cada repetición de los tratamientos estuvo constituida por las diferentes horas de realización del muestreo de las plantas en el día

Para los conteos las muestras se tomaron de la hoja en posición tres (primer muestreo) y dos (segundo muestreo) al momento de la inoculación de la bacteria. En cada repetición (tiempo), de las dos plantas de cada tratamiento se homogeneizó una muestra con 25 discos de 1 cm de diámetro cortados al azar con un sacabocados en la sección central de la hoja.

La muestra final se colocó en un erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de ADE y se agitó la mezcla por 45 min en agitador mecánico. Finalizado el tiempo de agitación, se efectuaron diluciones decimales de la mezcla hasta 10^{-3} . Luego se tomaron 0,02 mL de cada dilución y se sembraron en platos petri con medio AQ con posterior dispersión del líquido sobre el medio. Los platos sembrados se incubaron a 28 °C por 48 horas. Cada muestra fue replicada tres veces.

3.3.2.5. Variables evaluadas y análisis estadístico

La variable evaluada fue el número de unidades formadoras de colonias (ufc) de la cepa/cm² de hoja (número de ufc contadas en los platos expresado por unidad de área foliar) a los diez y quince días después de la inoculación de la bacteria (tres y siete días después de la aplicación de los sustratos, respectivamente) El conteo de colonias se efectuó a las 48 horas de incubación en el medio.

La información fue procesada aplicando un análisis de varianza para cada muestreo transformando los valores obtenidos como $\ln(\text{ufc} + 0,5)$.

3.3.3. Efecto de sustratos sobre comunidad microbiana de la filosfera

Esta prueba se efectuó sobre las muestras del ensayo anterior para determinar el efecto de los sustratos aplicados solos y combinados con la bacteria R1 sobre la comunidad microbiana identificada en el primer muestreo del ensayo de invernadero anterior

3.3.3.1. Procedimiento experimental

Se estimó la población total de bacterias y hongos, mediante la técnica de lavado de hojas y dilución en platos con medio agar quitina (AQ), a partir de los crecimientos diferentes a R1 del ensayo anterior.

Las bacterias y hongos fueron agrupados por su morfología y crecimiento en medios agar nutritivo (AN) y agar papa dextrosa (PDA), respectivamente. Del grupo fungoso se efectuaron pruebas básicas de identificación. Con las bacterias se efectuó la prueba de KOH al 3%

3.3.3.2. Diseño experimental y variable evaluada

Los tratamientos y el diseño experimental seguidos en esta prueba fueron los mismos del ensayo anterior.

La variable evaluada fue la diversidad microbiana encontrada en los tratamientos por los aislamientos identificados en el medio agar quitina. La diversidad se expresó con el Índice de diversidad de Shannon de acuerdo a la fórmula

$$ID = - \sum (N_i/N) \times \log (N_i/N) \quad \text{donde}$$

N_i = número de valores de la especie
 N = total de valores de las especies

Este índice es utilizado en ecología microbiana para evaluar la estructura de comunidades y las respuestas de estas a factores ambientales (Southwood 1978, Atlas 1984)

El conteo de los microorganismos se efectuó a las 96 horas de incubación en el medio agar quitina sin considerar las colonias de la cepa R1.

3.3.3.3. Análisis estadístico de los resultados

La información fue procesada por medio de un análisis de varianza y se efectuó una prueba de Dunnett para comparar la respuesta del tratamiento testigo con la del resto de los tratamientos. También se efectuó una prueba de contrastes ortogonales entre grupos de tratamientos.

3.3.4. Efecto de sustratos y bacterias antagonistas sobre la severidad de la sigatoka negra.

En esta prueba se determinó a nivel de invernadero el efecto de los sustratos sobre la severidad de la enfermedad en plantas de invernadero expuestas a inoculación natural con *M. fijiensis*. De esta forma, se descartarían los sustratos que no mostraran efecto positivo en el control de la enfermedad.

3.3.3.1. Material experimental

Al igual que en el primer ensayo de invernadero se incluyeron los sustratos leche, melaza, leche+melaza y quitina, solos y en combinación con la bacteria

Se incluyó un tratamiento con fungicida como testigo relativo, con una mezcla de propiconazol al 25,3% + aceite agrícola a la dosis comercial.

3.3.3.2. Tratamientos evaluados y diseño experimental

Se probaron los tratamientos correspondientes a los sustratos seleccionados, aplicación de quitina, aplicación de fungicida y los testigos para cada sustrato, quedando de la siguiente forma:

- | | |
|-----------------|-------------------------|
| 1. Testigo | 7. Leche + R1 |
| 2. Fungicida | 8. Melaza |
| 3. Cepa R1 | 9. Melaza + R1 |
| 4. Quitina | 10. Leche + melaza |
| 5. Quitina + R1 | 11. Leche + melaza + R1 |
| 6. Leche | |

Se aplicó un diseño en bloques al azar (DBCA) con tres repeticiones por tratamiento y dos plantas por repetición

3.3.3.3. Procedimiento general

Al igual que en la prueba anterior, en las plantas seleccionadas se asperjaron los sustratos y la bacteria antagonista.

Al día siguiente de la aplicación de los sustratos (dda) las plantas fueron expuestas a inoculación natural de *M. fijiensis* en una parcela de plátano con presencia de sigatoka negra en la finca experimental La Montaña del CATIE

Luego de doce días de exposición, las plantas fueron trasladadas a un terreno expuesto a las condiciones climáticas naturales para favorecer la incubación del patógeno y el desarrollo de síntomas.

3.3.3.4. Evaluación de tratamientos y análisis estadístico

La variable evaluada fue la severidad de la enfermedad a través del número de estrias totales/9 cm² en dos áreas (apical y media) en la periferia de la sección derecha de las hojas 2 y 1 al momento de aplicar los tratamientos (Anexo 6) Esta evaluación se efectuó a los 28 días después de traídas las plantas del campo

Los registros del número de estrias en las plantas fueron promediados para cada tratamiento

Se analizaron los resultados por medio de un análisis de varianza y una comparación de los tratamientos con el testigo por la prueba de Dunnett También se efectuó una prueba de contrastes entre grupos de tratamientos para determinar diferencias en el efecto de los sustratos solos y en combinación con la bacteria

3.4. APLICACION DE SUSTRATOS EN CAMPO

3.4.1. Efecto de sustratos y bacterias antagonistas sobre la severidad de la enfermedad en plantas de banano en macetas

En esta prueba se determinó el efecto de los sustratos sobre la severidad de la enfermedad en plantas de banano en macetas con 45 días de aclimatación en campo.

La prueba se efectuó en las instalaciones del CATIE desde el 4 de Septiembre hasta el 16 de Octubre de 1995.

3.4.1.1. Material experimental

Como en el ensayo de la selección de sustratos en invernadero se incluyeron los sustratos leche, melaza, leche+melaza y quitina, solos y en combinación con la bacteria *S marcescens* R1, y el tratamiento con fungicida (propiconazol 23,5% + aceite agrícola)

El material vegetal utilizado correspondió a las mismas plantas en macetas utilizadas en el ensayo 3.3.3. ya citado con 45 días aproximadamente de adaptación a las condiciones

ambientales. Estas plantas se mantuvieron lo más sanas posibles con remoción de tejido infectado y fueron fertilizadas periódicamente.

3.4.1.2. Tratamientos evaluados y diseño experimental

La relación de tratamientos fue:

- | | |
|-----------------|-------------------------|
| 1. Testigo | 7. Leche + R1 |
| 2. Fungicida | 8. Melaza |
| 3. Ceba R1 | 9. Melaza + R1 |
| 4. Quitina | 10. Leche + melaza |
| 5. Quitina + R1 | 11. Leche + melaza + R1 |
| 6. Leche | |

Se aplicó un diseño en bloques al azar (DBCA) con tres repeticiones por tratamiento y dos plantas por repetición.

3.4.1.3. Procedimiento general

Las plantas fueron asperjadas con los sustratos y los antagonistas durante tres semanas consecutivas y se removió el tejido afectado en las hojas bajas para disminuir la densidad de inóculo en la planta.

Las plantas se dejaron en un terreno expuesto sin trasladarse a campos infectados con sigatoka negra por considerarse que existía un adecuado nivel de inóculo para la evaluación de los tratamientos.

3.4.1.4. Evaluación de tratamientos y análisis estadístico

La variable evaluada fue el número de estrías totales/9 cm² a los 28 días de la primera aplicación de los tratamientos en dos áreas (apical y media) de la sección derecha de la hoja 0 al momento de iniciar la aplicación de los tratamientos. Sucesivamente se efectuó la evaluación en la hoja siguiente (en posición -1 al momento de iniciar las aplicaciones) transcurridos 22 días desde que estuvo completamente expandida. Las mediciones del número de estrías fueron promediadas para cada tratamiento.

La información fue procesada a través de un análisis de varianza y una prueba de Dunnett para comparar los tratamientos con el testigo. También se efectuaron contrastes entre grupos de tratamientos para determinar el efecto de los sustratos solos y en combinación con la bacteria.

3.4.2. Efecto de sustratos y bacterias antagonistas sobre la severidad de la enfermedad en campo.

El ensayo se efectuó desde el 10 de Mayo hasta el 1 de Noviembre de 1995, comprendidos desde el trasplante del material vegetal en campo hasta la última evaluación de los tratamientos, respectivamente.

3.4.2.1. Material vegetal

Se utilizaron plantas de banano variedad Gran Enano aclimatadas en macetas durante cuatro meses y trasplantadas en una parcela próxima a la plantación comercial de la EARTH (Anexo 7), siendo expuestas al inóculo natural de *M. fijiensis* durante su crecimiento.

3.4.2.2. Características físico-químicas del suelo

Se efectuaron análisis de suelo (químico y físico) para comparar los requerimientos del cultivo con las características de la parcela (Cuadro 2). Estos análisis fueron realizados en los laboratorios de suelos del CATIE y de fertilidad de suelos y nutrición mineral de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA), localizados en Turrialba y La Rita de Guápiles, respectivamente.

Cuadro 2. Resultados del análisis de suelo en la parcela de campo¹

pH agua	Ca	Mg	K	Acidez	P	Fe	Cu	Zn	Mn	M.O %	N ² %
	(cmol (+) / L)					(mg / L)					
4,84	4,3	1,28	0,26	0,24	36	575	14	2,9	26	6,13	0,3
Arena %	Limo %		Arcilla %		Textura ²						
39,8	42,6		17,6		Franco						

¹ Laboratorio de análisis químico-suelos y foliares, CORBANA S A , La Rita, Guápiles

² Laboratorio de suelos. CATIE, Turrialba

3.4.2.3. Manejo agronómico de la parcela experimental

Se aplicó un sistema de siembra hexagonal con una distancia de siembra de 2,2 m entre plantas en cada parcela. Las plantas fueron fertilizadas al momento del trasplante con 20 g de fórmula completa NPK 10-30-10 (en el fondo del hoyo), a los 15 días después del trasplante (ddt) con sulfato de magnesio ($MgSO_4$) a una dosis de 60 g/pl dispersados en la rodaja o platón. A los 45 días después del trasplante se efectuó una fertilización nitrogenada (NPK 60-0-0) a una dosis de 50 g/pl. Posteriormente se mantuvo un ciclo mensual de fertilización con fórmula completa.

Se realizaron deshierbas periódicas y se establecieron drenajes secundarios y terciarios (gavetas) dentro de la parcela para bajar el nivel freático y favorecer el crecimiento del cultivo.

Las plantas recibieron medidas sanitarias en las hojas bajas afectadas por la enfermedad (despunte), eliminándose la hoja cuando el nivel de infección alcanzaba el 33% del área foliar.

3.4.2.4. Condiciones pluviométricas y densidad de inóculo en la parcela

Se registró la precipitación semanal durante el período del ensayo con un pluviógrafo mecánico Wilh Lambrecht con registro mínimo de 0,1 mm de lámina de agua por hora, a una altura de 1,3 m del suelo desde la cubeta de captación.

La densidad de inóculo en la plantación expresada como concentración de ascosporas en el aire se determinó utilizando una trampa de esporas volumétrica tipo Hirst (Burkard Manufacturing Co Ltd, Rickmansworth, Inglaterra) de registro semanal, accionada por una batería de 12 V. La trampa fue montada sobre una plataforma de madera nivelada a una altura de 2 m, quedando la abertura de succión a 2,45 m de altura.

Para la recolección de las esporas en la trampa se utilizó una cinta transparente (mylenex) cubierta con una capa adhesiva de una mezcla de gelvatol (35 g), glicerol (50 mL), fenol (2 g) y agua destilada (100 mL). La cinta fue reemplazada semanalmente para efectuar el registro del nivel de inóculo durante dicho periodo.

Los registros de precipitación y esporas se efectuaron a partir de la primera semana de aplicación de los tratamientos.

Para efectuar el conteo de esporas se procedió dividiendo la cinta en secciones diarias (7 en total) y se fijaron sobre portaobjetos. Las lecturas se realizaron con microscopio compuesto a 200 aumentos en un área de muestreo de 1 mm² por campo óptico (Anexo 9).

3.4.2.5. Material experimental

Se utilizó la cepa *S. marcescens* R1 bajo similares condiciones de manipulación que en los ensayos de invernadero (punto 3.3.2.2).

Se utilizaron los sustratos melaza al 1,0% (p/v), quitina coloidal al 4,5% (p/v), y ambos en mezcla. El pH de las soluciones de sustratos fue ajustado entre 7 y 8 para las aplicaciones.

Fue incluido un tratamiento de fungicida con los productos mancozeb al 80%, propiconazol al 25,3%, tridemorf al 75%, y aceite agrícola en rotación.

3.4.2.6. Tratamientos evaluados y diseño experimental

Se aplicaron 6 tratamientos, el testigo, uso de fungicida, quitina y los restantes que incluyeron la inoculación de la bacteria en combinación con quitina, melaza y quitina+melaza.

La relación de tratamientos fue como sigue:

- | | |
|--------------|--------------------------|
| 1. Testigo | 4. Quitina + R1 |
| 2. Fungicida | 5. Melaza + R1 |
| 3. Quitina | 6. Quitina + melaza + R1 |

Se aplicó un diseño en bloques completos al azar (DBCA) con parcelas de nueve plantas y cuatro repeticiones por tratamiento.

Las plantas fueron establecidas a una densidad de 2,2 m x 2,2 m para un área por parcela útil de 43,56 m², con una separación de 3 m entre parcelas de un mismo bloque y de 4 m entre bloques

3.4.2.7. Procedimiento general

Para aplicar los tratamientos se utilizaron bombas de aspersión manual de 5 L de capacidad (Indústria e Comércio Guarany S.A., Brasil), cubriendo el haz y el envés de las hojas.

Los sustratos fueron aplicados semanalmente a partir de los 2,5 meses del trasplante en campo (17 de Agosto de 1995), y la bacteria fue aplicada mensualmente en los tratamientos correspondientes

El tratamiento con fungicida fue realizado cada 15 días en la secuencia mancozeb+aceite, propiconazol+aceite y tridemorf a las dosis comerciales.

3.4.2.8. Evaluación de tratamientos y análisis estadístico

A partir de la cuarta semana de aplicaciones cuando las plantas presentaban 4-5 hojas que habían recibido tratamiento desde el inicio, se dio comienzo a las evaluaciones

Se evaluó la severidad de la sigatoka negra semanalmente, utilizando la metodología de Stover modificada por Gauhl (1989), basada en la estimación visual del área foliar afectada en todas las hojas de la planta, a excepción de la hoja candela/bandera y las hojas agobiadas, de acuerdo al manejo comercial de la plantación (Anexo 9).

En esta escala se establecen 6 grados correspondientes al porcentaje de tejido foliar afectado (Cuadro 3).

-Cuadro 3. Escala de grados de infección y área foliar afectada para evaluar la severidad de la sigatoka negra *.

Grado	Area foliar afectada	Porcentaje
0	Sin síntoma	0%
1	Hasta 10 manchas por hoja	<1%
2	Manchas en menos del 5% del área	1-5%
3	Manchas de 6-15% del área	6-15%
4	Manchas de 16-33% del área	16-33%
5	Manchas de 34-50% del área	34-50%
6	Manchas en más del 50% del área	> 50%

* Modificado de Gauhl, 1990

En el ensayo se efectuó la evaluación desde la hoja en posición 1 hasta la hoja que estaba recibiendo tratamiento desde el momento de su emisión (hoja en posición 1 cuando se iniciaron los tratamientos).

Con la información obtenida se determinó el índice de enfermedad (IE). Este índice se calcula como la sumatoria de los productos del porcentaje de hojas de cada grado por el grado respectivo en la escala, dividido el total entre 100.

Gráficamente:

$$IE = \frac{\sum (N \times R)}{100}$$

donde $N = \% \text{ de hojas de cada grado}$
 $R = \text{grado respectivo}$

Los resultados fueron procesados calculando el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) para cada tratamiento durante el periodo de estudio.

Se analizaron los datos por medio de un análisis de varianza para el parámetro estimado y una prueba de contrastes ortogonales entre grupos de tratamientos.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. SELECCION DE SUSTRATOS *in vitro*

4.1.1. Efecto de sustratos sobre multiplicación de bacterias antagonistas

Para la selección de los sustratos a probar a nivel de invernadero y campo se fijó como criterio de decisión la respuesta mostrada por las bacterias en crecimiento y en actividad quitinolítica. Por tanto, se diseñó esta prueba *in vitro* para seleccionar las mejores opciones para la multiplicación de las cepas.

4.1.1.1. Efecto sobre *S. marcescens* R1

El extracto de hoja mostró el mejor efecto en la multiplicación *in vitro* de *S. marcescens* R1. De los restantes tratamientos, leche, melaza, leche+melaza, leche+almidón y abono+melaza mostraron densidades cercanas a los 2×10^7 ufc/mL siendo los mejores después del extracto (Fig. 1A).

El agua destilada estéril (ADE) se mostró como el sustrato menos favorable para el crecimiento de la población bacteriana, al obtenerse los menores valores de crecimiento de la bacteria con este tratamiento (Fig. 1A). La prueba de Dunnett evidenció diferencias significativas al 5% entre este tratamiento (testigo) y el resto de los sustratos utilizados (Anexo 9), demostrando el efecto positivo de los sustratos en la multiplicación de la cepa. El ADE contiene todavía algunos minerales que pueden propiciar el crecimiento bacteriano (Hebert y French 1982), sin embargo fue un control adecuado para comparar el efecto de los sustratos.

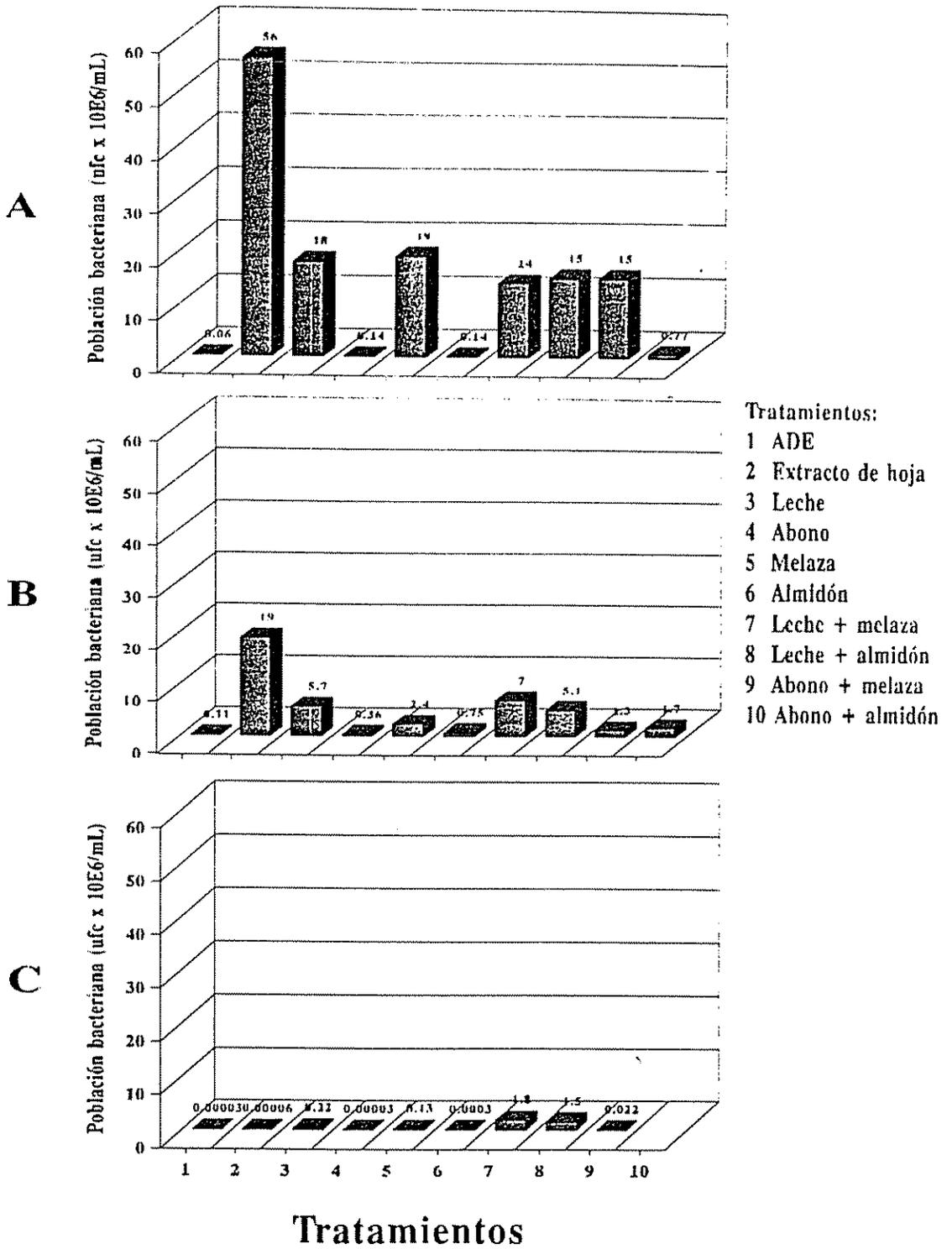


Figura 1. Efecto de diferentes sustratos sobre la multiplicación *in vitro* de: A) *S. marcescens* R1, B) *S. entomophila* A100, y C) *B. cereus* A30.

El efecto del extracto de hoja mostró diferencias altamente significativas (1%) con relación al efecto del resto de los sustratos por la prueba de contrastes ortogonales (Cuadro 4) *S. marcescens* R1 fue aislada de la filosfera de banano (González 1995), por lo tanto su mayor nivel de multiplicación en el extracto se debió a la exposición a factores nutricionales de su medio natural con un efecto reducido de los factores limitantes para su crecimiento

Cuadro 4. Resultados del análisis de varianza y contrastes ortogonales entre los sustratos para la multiplicación *in vitro* de *S. marcescens* R1.

F.V	GL	SC	CM	Prob>F
Tratamientos	9	175,7839	19,5315	0,0001 **
Contrastes				
Lec-Ab vs Mel-Alm	1	0,0072	0,0072	0,4347ns
Extracto vs todos	1	28,8456	28,8456	0,0001**
Leche vs Abono	1	35,8323	35,8323	0,0001**
Melaza vs Almidón	1	35,9582	35,9582	0,0001**
Lec vs Lec+Mel-Lec+Alm	1	0,0696	0,0696	0,0219*
Ab vs Ab+Mel-Ab+Alm	1	5,4127	5,4127	0,0001**
Leche vs melaza	1	0,0042	0,0042	0,5467ns
Error experimental	20	0,2253	0,0113	
Total	29	176,0092	R ² = 0,99	CV = 0,96

Lec=Leche, Ab=Abono, Mel=Melaza, Alm=Almidón

** = altamente significativo al 1%

* = significativo al 5%

ns = no significativo

La leche mostró mejor efecto que el abono, igual tendencia se obtuvo entre la melaza y el almidón, con mejor respuesta al derivado de la caña de azúcar (Fig. 1A).

Las pruebas mostraron diferencias altamente significativas entre la leche y el abono foliar, obteniéndose muy bajas poblaciones bacterianas con este último. La melaza también mostró diferencias altamente significativas con el almidón (Cuadro 4).

Con el uso de leche o melaza se obtuvieron niveles poblacionales similares; pero fueron bajos para el abono foliar y el almidón. Al comparar los grupos de tratamientos la prueba de contrastes no mostró diferencias significativas entre el grupo de sustratos

fuentes de nitrógeno (leche y abono) y los fuentes de carbono (melaza y almidón de yuca); la respuesta no fue consistente para ningún grupo

El promedio de ufc/mL de la bacteria para la leche fue superior con relación a la mezcla del compuesto con melaza o almidón. Los contrastes mostraron diferencias significativas (5%) entre la leche sola y las mezclas

La respuesta al abono fue mejor cuando se utilizó en mezcla que cuando se usó solo. Los análisis mostraron diferencias altamente significativas con la densidad poblacional obtenida en las mezclas con melaza o almidón y el compuesto solo

La respuesta de la bacteria fue similar para leche y melaza (Fig. 1A), y los contrastes no mostraron diferencias significativas entre estos sustratos.

4.1.1.2. Efecto sobre *S. entomophila* A100

La mejor respuesta en multiplicación se obtuvo con el extracto de hoja, seguido de la leche, leche+melaza y melaza+abono. La melaza sola no mostró mejor respuesta que en mezcla (Fig. 1B)

La prueba de Dunnett mostró diferencias significativas en la multiplicación de la bacteria entre el control (ADE) y los otros sustratos (Anexo 10)

Al igual que en la primera prueba, los promedios de ufc/mL fueron mayores para leche y melaza con relación al abono y el almidón, respectivamente. El grupo de sustratos fuentes de nitrógeno no mostró diferencias significativas para la respuesta de la bacteria en relación con el grupo de sustratos fuentes de carbono, a través de la prueba de contrastes (Cuadro 5).

La cepa *S. entomophila* A100 presentó similitud con *S. marcescens* R1 en su respuesta al extracto, con el cual se obtuvieron las densidades más altas. El extracto de hoja mostró diferencias altamente significativas (1%) con el resto de los sustratos.

La leche y la melaza se mostraron como los mejores sustratos después del extracto de hojas. La respuesta al sustrato de leche evidenció diferencias altamente significativas con el abono foliar, y la melaza con el almidón (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados del análisis de varianza y contrastes ortogonales entre los sustratos para la multiplicación *in vitro* de *S. entomophila* A100.

F V	GL	SC	CM	Prob>F
Tratamientos	9	63,5356	63,5356	0,0001**
Contrastes				
Lec-Ab vs Mel-Alm	1	0,0339	0,0339	0,4215ns
Extracto vs todos	1	18,2021	18,2021	0,0001**
Leche vs Abono	1	11,4150	11,4150	0,0001**
Melaza vs Almidón	1	2,0912	2,0912	0,0001**
Lec vs Lec+Mel-Lec+Alm	1	0,0051	0,0051	0,7542ns
Ab vs Ab+Mel-Ab+Alm	1	3,8727	3,8727	0,0001**
Leche vs melaza	1	1,2023	1,2023	0,0001**
Error experimental	20	1,0072	1,0072	
Total	29	64,5428	R ² = 0,98	CV = 2,13

Lec=Leche, Ab=Abono, Mel=Melaza, Alm=Almidón

** = altamente significativo al 1%

* = significativo al 5%

ns = no significativo

La prueba no detectó diferencias significativas entre la leche sola y en mezcla. Sin embargo, con la mezcla leche+melaza se alcanzó una densidad promedio de 7×10^6 ufc/mL (el segundo mejor). Las mezclas de abono con melaza o almidón fueron significativamente mejores que el abono solo.

La respuesta al extracto de hoja en primer grado, y a leche, melaza, y las mezclas de leche con melaza o almidón en segundo lugar, mostraron una tendencia positiva y similar a la obtenida con *S. marcescens* R1.

4.1.1.3. Efecto sobre *B. cereus* A30

Las diferencias entre los valores promedio de la población bacteriana entre el ADE y los otros sustratos fueron menores con relación a las pruebas anteriores (Fig. 1C). La multiplicación de A30 mostró diferencias significativas por la prueba de Dunnett entre el control y los demás sustratos, a excepción de los sustratos extracto de hoja, abono foliar y abono+almidón (Anexo 11). La población bacteriana obtenida con estos últimos fue estadísticamente similar a la lograda con el uso de ADE.

La respuesta al extracto de hoja de banano fue menor que la mostrada por las cepas del género *Serratia*

La prueba de contrastes no encontró diferencias significativas entre los sustratos fuentes de nitrógeno y aquellos fuentes de carbono (Cuadro 6)

Cuadro 6. Resultados del análisis de varianza y contrastes ortogonales entre los sustratos para la multiplicación *in vitro* de *B. cereus* A30.

F V	G L	S C	C M.	Prob>F
Tratamientos	9	578,4039	64,2671	0,0001**
Contrastes				
Lec-Ab vs Mel-Alm	1	0,5947	0,4957	0,1769ns
Extracto vs todos	1	49,5980	49,5980	0,0001**
Leche vs Abono	1	104,4772	104,4772	0,0001**
Melaza vs Almidón	1	65,4658	65,4658	0,0001**
Lec vs Lec+Mel-Lec+ Alm	1	8,0501	8,0501	0,0001**
Ab vs Ab+Mel-Ab+Alm	1	64,7451	64,7451	0,0001**
Leche vs melaza	1	0,2702	0,2702	0,3566ns
Error experimental	20	6,0698	0,3035	
Total	29	584,4737	R ² = 0,99	C V = 12,43

Lec=Leche, Ab=Abono, Mel=Melaza, Alm=Almidón

** = altamente significativo al 1%

* = significativo al 5%

ns = no significativo

La diferencia en la respuesta a la leche fue altamente significativa (1%) con relación al abono foliar; igual diferencia se obtuvo entre la melaza y el almidón. Esta respuesta fue consistente con la obtenida en las otras cepas, donde la leche y la melaza fueron mejores para la multiplicación de las bacterias que el abono y el almidón, respectivamente.

La densidad bacteriana obtenida con la leche no fue significativamente diferente a la obtenida con la melaza. Se detectaron diferencias altamente significativas con el uso de leche sola y en mezcla. Las poblaciones obtenidas con las mezclas de estos compuestos fueron mayores.

Se encontraron diferencias altamente significativas entre el abono solo y en mezcla con melaza o almidón. También la mezcla resultó mejor.

En general, los valores de multiplicación logrados con los diferentes sustratos en A30 fueron sensiblemente menores a los obtenidos en las cepas de *Serratia*.

Bajo las condiciones en que se efectuó la prueba, se manifestaron favorablemente la leche y la melaza (común para los tres microorganismos), con los cuales se obtuvo respuesta positiva tanto solos como en mezcla

El efecto del almidón como sustrato solo fue menor que el de leche o melaza. La composición de carbohidratos (con moléculas de amilosa y amilopectina con enlaces α -1->4 y α -1->6 de d-glucosa) propiciaron una metabolización más lenta por las bacterias, debiendo hidrolizar el almidón a unidades de maltosa y luego esta a glucosa (Stephenson 1949), y además que este sustrato proporciona factores de crecimiento en menor concentración (Anexos 1, 2 y 3) con relación a la leche y la melaza

La tendencia en la multiplicación de las bacterias como respuesta al uso de los sustratos fue similar para las tres cepas con una diferencia para el extracto de hoja con A30. Al parecer, en el extracto se evidenciaron factores limitantes del crecimiento del organismo (o carencia de los requeridos), y que contrastaron con la respuesta positiva mostrada por las bacterias del género *Serratia*, para las cuales no mostró limitaciones de tipo nutricional en relación con los otros sustratos

Como se ha comprobado la presencia de *Bacillus* sp. quitinolíticos en la filosfera de banano (González, Bustamante, Okumoto y González, sin publicar), esta última respuesta sugiere la necesidad de conocer la composición química de los exudados foliares en banano y su influencia en la comunidad microbial benéfica de la filosfera

Los menores niveles poblacionales obtenidos en A30 pueden relacionarse con su tendencia a formar endosporas que les permiten resistir condiciones ambientales adversas como alta temperatura y desecación, lo que diferenciaría a este de las *Serratia* sp., las cuales garantizarían su supervivencia en la superficie multiplicándose a altas densidades.

Otra relación con la baja respuesta de A30 es que en los medios artificiales utilizados para propiciar su crecimiento (ASM 1984) los requerimientos de carbohidratos son sensiblemente superiores a los del cultivo de *S. marcescens* (por ej.). Por tanto, serían necesarias mayores concentraciones de los sustratos para obtener una respuesta en multiplicación similar a las *Serratia*. Estando ligados estos altos requerimientos a la demanda de energía para la formación de endosporas.

Las bacterias heterótrofas (no autótrofas) obtienen su energía de la oxidación o desaminación de compuestos orgánicos simples (ASM 1984). Estos compuestos son utilizados como fuente de energía y de material orgánico para generar sus componentes celulares.

En estas pruebas la melaza fue utilizada como fuente de carbohidratos y la sacarosa (sucrosa), dextrosa y levulosa constituyen los azúcares de mayor proporción en el compuesto (DGETA 1978). La leche aunque fue utilizada como fuente de proteínas, también es una fuente importante de carbohidratos (38% en la leche íntegra y 5,4% en la descremada) y de otros compuestos con función como factores de crecimiento (vitaminas, minerales, etc.), a excepción de A30 que no requiere vitaminas para su crecimiento (Buchanan y Gibbons 1974).

La similitud en la respuesta de los microorganismos a la leche y la melaza sugiere que los carbohidratos fueron suficientes para proporcionar factores bioquímicos necesarios para el crecimiento bacteriano, complementados con los compuestos nitrogenados, vitaminas y minerales. Sin embargo, la mejor respuesta mostrada por R1 y A100 al extracto de hoja indica que existieron otros factores nutricionales que no fueron proporcionados en clase y/o cantidad por ninguno de aquellos sustratos.

Estos resultados, orientan el efecto hacia la utilización de carbohidratos en mayor proporción, lo que coincide con lo documentado a nivel de la filosfera: mayor proporción de carbohidratos que aminoácidos (Chet *et al* 1973, Morris y Rouse 1985).

La respuesta casi nula mostrada por los microorganismos al abono foliar pudo tener relación con un bajo contenido de carbohidratos (a diferencia de la leche, melaza y almidón) en su composición. Sin embargo, tomando en cuenta que estos organismos fungieron como indicadores de la respuesta de la comunidad bacteriana, es necesario determinar el efecto de este producto sobre la comunidad microbiana de los cultivos donde se está aplicando en forma comercial, y poder descartar la predisposición de la planta a patógenos por disminución de la población microbiana responsable del balance ecológico a nivel de la filosfera.

4.1.2. Efecto de sustratos sobre habilidad quitinolítica de las bacterias antagonistas

En los trabajos de Okumoto y Bustamar te (1993a y 1993b) y González (1995), se seleccionaron en laboratorio como posibles antagonistas los organismos cultivados en medio AQ o ANQ que produjeran un halo transparente alrededor de la colonia (degradación de la quitina) que los identificaba como productores de quitinasas. Esta característica se definió como habilidad quitinolítica *in vitro*.

Debido a que los microorganismos sometidos a una dieta con ciertos sustratos *in vitro* pudieran ver minimizada esta habilidad (Okumoto y Bustamante 1994, sin publicar), se diseñó esta prueba para evaluar el efecto de los sustratos sobre los organismos.

En esta prueba todas las colonias provenientes de los diferentes sustratos mostraron la formación del halo transparente a las 48 horas de incubación.

La longitud del halo quitinolítico fue medida a las 96 horas de siembra y se observaron pequeñas diferencias en promedio entre los tratamientos, con la menor magnitud para las colonias provenientes del almidón y la mezcla de abono con melaza o almidón (Fig 2). Se encontraron diferencias significativas (prueba de Dunnett) con respecto al testigo (quitina) solo para los tratamientos mencionados (Anexo 12).

Esta prueba se basa en la existencia de una relación entre el diámetro de la zona clarificada (halo) en el medio y la actividad de las quitinasas (Reid y Ogrydziak 1981), lo que se ha utilizado para comparar el nivel de actividad enzimática entre microorganismos. En nuestro caso se utilizó la longitud del halo por las diferencias en diámetro mostradas por las colonias.

Estos resultados coincidieron con la tendencia obtenida en las pruebas de multiplicación de los microorganismos, donde el abono foliar y el almidón fueron los menos favorables.

Sustratos

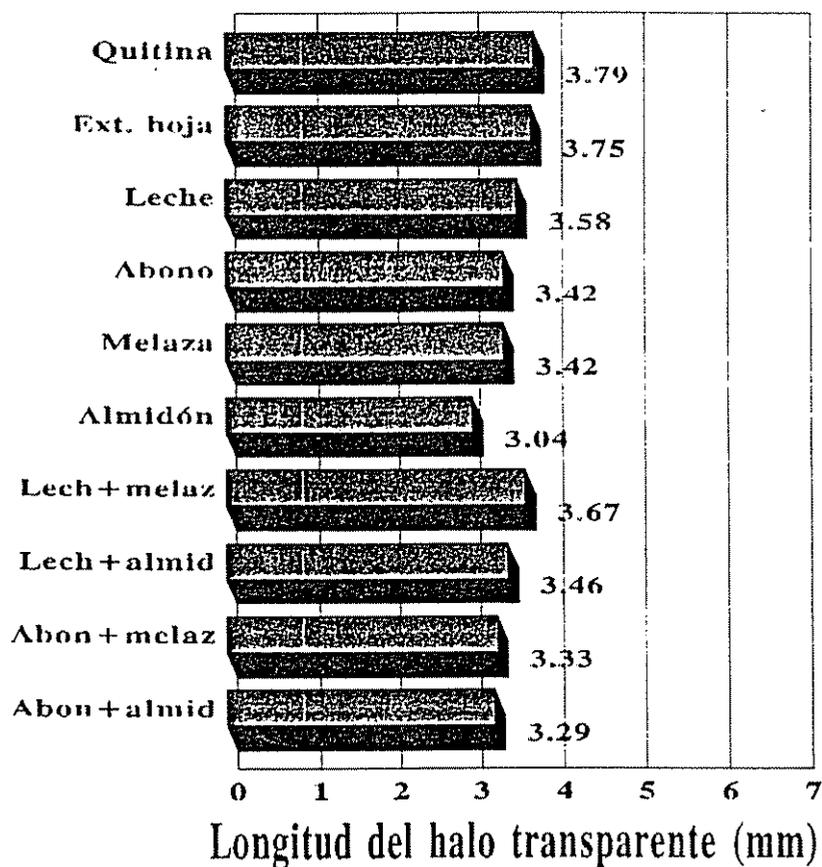


Figura 2. Efecto de diferentes sustratos sobre habilidad quitinolítica *in vitro* de *S. marcescens* R1 MIP-CATIE, a los cuatro días de cultivo en medio agar quitina (AQ).

Uno de los mecanismos posiblemente involucrados en la actividad antagónica de las bacterias R1, A30 y A100 a *M. fijiensis* es la producción de quitinasas que provocan lisis de las paredes celulares del hongo, compuestas en mayor proporción de quitina y β -1,3 glucano (Griffin 1994). Por tanto, el manejo de estos microorganismos con fines de control biológico debe garantizar la persistencia de esta habilidad en el tiempo.

También se evidenciaron algunas diferencias en la pigmentación de las colonias con relación al sustrato utilizado. La pigmentación es consecuencia de la fuente nutricional (Buchanan y Gibbons 1974) y favorece la protección del organismo contra la radiación ultravioleta (Starr *et al* 1981). La colonia proveniente del sustrato con base en almidón fue la menos pigmentada.

Por no encontrarse diferencias estadísticamente significativas con el testigo, se consideró que en el resto de los tratamientos no se afectó la habilidad quitinolítica *in vitro* de la bacteria.

Los resultados obtenidos orientaron el proceso de selección de sustratos hacia la prueba de multiplicación (prueba anterior). Se escogieron los sustratos leche, melaza y la combinación de ambos por su similitud en efecto positivo sobre los microorganismos.

Aunque los resultados no mostraron efecto de algunos sustratos sobre la habilidad quitinolítica *in vitro* de la bacteria, no se puede descartar que la exposición del organismo a tales compuestos en campo a largo plazo pueda causar disminución en la actividad enzimática del mismo.

4.1.3. Efecto de la concentración de los sustratos sobre la multiplicación de los microorganismos antagonistas

La selección de los mejores sustratos a nivel de laboratorio planteó para su prueba en invernadero una determinación preliminar de la mejor concentración de aquellos que garantizara su efecto positivo y permitiera bajo el efecto de las condiciones ambientales la acción sobre los antagonistas.

Tomando en cuenta esos aspectos, esta prueba tuvo por objetivo determinar la mejor concentración de los sustratos seleccionados para la multiplicación de los antagonistas, probando concentraciones de fácil preparación en campo

4.1.3.1. Efecto de leche

Los niveles de multiplicación alcanzados mostraron pocas diferencias entre el efecto promedio de las diferentes concentraciones del sustrato (Fig 3A).

Analizando la tendencia del efecto con relación a la concentración, la prueba no mostró diferencias significativas para la tendencia lineal. La tendencia cuadrática fue altamente significativa con un coeficiente de determinación (R^2) de 0,99 y un coeficiente de variación (C.V.) de 0,86, y todos los parámetros del modelo significativos, ajustándose el efecto a una respuesta cuadrática (Cuadro 7)

La multiplicación bacteriana alcanzó los valores más altos con la concentración del 0,1% para $2,5 \times 10^7$ ufc/mL.

Cuadro 7. Resultados del análisis de varianza y efectos de la concentración de leche sobre la multiplicación de *S. marcescens* R1.

Efecto	Grado de significancia	R^2	C V
Lineal	ns		
Cuadrático	**	0,99	0,86
a	**		
b	**		
c	**		

** = altamente significativo al 1%

* = significativo al 5%

ns = no significativo

a, b y c: parámetros del modelo

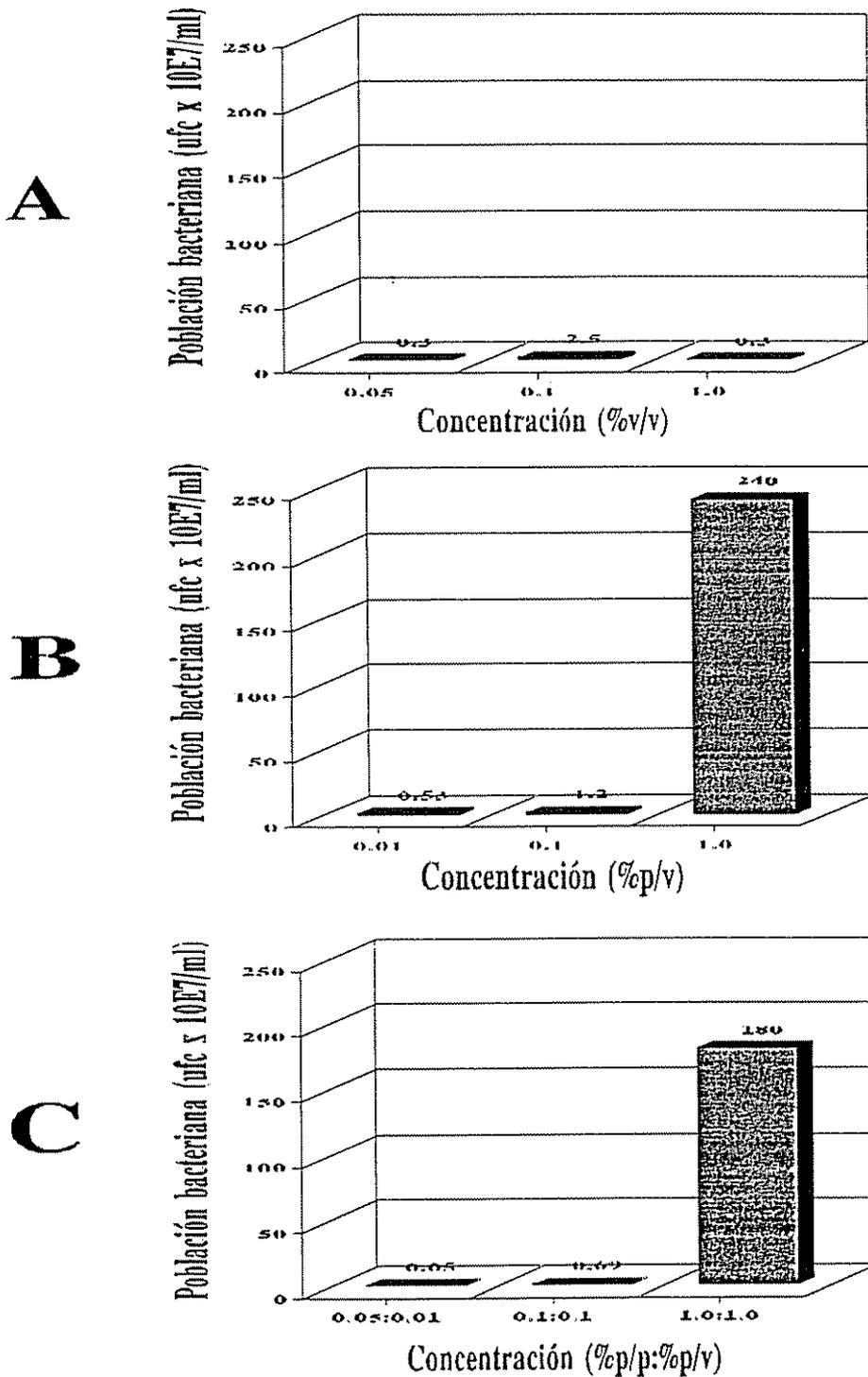


Figura 3. Efecto de diferentes concentraciones de: A) leche, B) melaza, y C) leche+melaza sobre multiplicación *in vitro* de *S. marcescens* R1 MIP-CATIE.

A la concentración del 1,0% la densidad poblacional de la bacteria decayó a valores similares que la menor concentración del sustrato. En consecuencia, hubo una tendencia cuadrática significativa en la multiplicación de la bacteria, esto es, un incremento en la multiplicación de la bacteria al aumentar la concentración del sustrato y luego una disminución en la multiplicación con el siguiente incremento de la concentración del sustrato.

4.1.3.2. Efecto de melaza

La mejor concentración correspondió al 1,0% alcanzando la población bacteriana una densidad de $2,4 \times 10^9$ ufc/mL (Fig. 3B). La prueba mostró diferencias altamente significativas para la tendencia lineal y la cuadrática (Cuadro 8).

La tendencia fue hacia una relación lineal entre el incremento en la multiplicación del antagonista con los incrementos en la concentración del sustrato.

El coeficiente de determinación para la respuesta lineal fue similar al obtenido en la tendencia cuadrática, pero en esta última no fueron significativos todos los parámetros. Por tanto, la respuesta se ajustó al modelo lineal.

Cuadro 8. Resultados del análisis de varianza y efectos de la concentración de melaza sobre la multiplicación de *S. marcescens* R1.

Efecto	Grado de significancia	R ²	C.V
Lineal	**	0,99	1,79
a	**		
b	**		
Cuadrático	**	0,99	1,39
a	**		
b	**		
c	ns		

** = altamente significativo al 1%

* = significativo al 5%

ns = no significativo

a,b y c: parámetros del modelo

El mayor nivel de multiplicación obtenido con la concentración del 1,0% fue equivalente al utilizado en inoculaciones de bacterias en altas concentraciones (10^9 ufc/mL), lo cual convierte a este sustrato en un medio líquido con potencial para la multiplicación masiva de la bacteria antagonista como sustituto del caldo nutritivo (ASM 1984).

Con la aplicación de melaza al follaje de nabo y chile, Higa y Wididana (1991) obtuvieron incrementos significativos en la comunidad microbial existente en la filosfera, con aumentos en el número de bacterias, actinomicetes y hongos. Por tanto, la aplicación de este compuesto diluido podría tener un efecto benéfico sobre la comunidad microbial además del efecto positivo comprobado sobre la población antagonista.

4.1.3.3. Efecto de leche + melaza

Al igual que en la prueba anterior, el mejor efecto se observó con la concentración al 1,0% (Fig 3C) para una densidad poblacional de $1,8 \times 10^9$ ufc/mL.

La prueba mostró diferencias altamente significativas para las tendencias lineal y cuadrática. Esta última tendencia se ajustó mejor a la respuesta de la bacteria por explicarla en mayor grado y por la significancia de los parámetros (Cuadro 9)

Cuadro 9. Resultados del análisis de varianza y efectos de la concentración de leche+melaza sobre la multiplicación de *S. marcescens* R1.

Efecto	Grado de significancia	R ²	C.V
Lineal	**	0,923	6,429
a	**		
b	**		
Cuadrático	**	0,997	1,295
a	**		
b	**		
c	**		

** = altamente significativo al 1%

* = significativo al 5%

ns = no significativo

a,b y c: parámetros del modelo

Aún ocurriendo un incremento positivo en la multiplicación de la bacteria con relación al aumento en la concentración del sustrato, este incremento no fue significativamente lineal (Fig 3C) como en el caso de la multiplicación por efecto de la melaza. En esta prueba se mostró un incremento progresivo en la multiplicación en relación con el incremento de la concentración del sustrato.

Estableciendo relaciones entre las pruebas, se pudo apreciar que los sustratos a una concentración del 1% produjeron los mayores incrementos a excepción de la leche. En esta última, al 1% se redujo la multiplicación de R1. Este mismo efecto relativamente inhibitorio de la leche, se observó en la respuesta de la bacteria a la mezcla leche+melaza, obteniéndose una menor densidad bacteriana que la obtenida con melaza sola. Sin embargo, la riqueza nutricional de la leche la convierte en un sustrato favorable para la estimular la comunidad microbial total.

La concentración más adecuada para melaza y leche+melaza correspondió a 1,0%. En el caso de la leche fue la de 0,1%, pero las diferencias en respuesta entre las concentraciones fue muy baja y el nivel alcanzado con leche al 1% estuvo sobre las 10^6 ufc/mL, por tanto se consideró valedero utilizar esta concentración para las posteriores pruebas con los sustratos, considerando la facilidad en la preparación de la solución y la persistencia del sustrato bajo el efecto de las condiciones climáticas en campo.

4.2. SELECCIÓN DE SUSTRATOS EN INVERNADERO

4.2.1. Efecto de sustratos sobre población de antagonistas

En esta prueba se comparó la respuesta de la bacteria antagonista R1 a los sustratos aplicados, a través de la población bacteriana recuperada de las hojas previamente inoculadas.

En la Fig. 4 se muestran los resultados de los muestreos efectuados y las relaciones de densidad poblacional de la bacteria recuperada por tratamiento. En los tratamientos de leche, melaza y en la mezcla de ambos se obtuvieron unidades bacterianas; en el resto de los tratamientos la población bajó a niveles no detectables por las técnicas usadas.

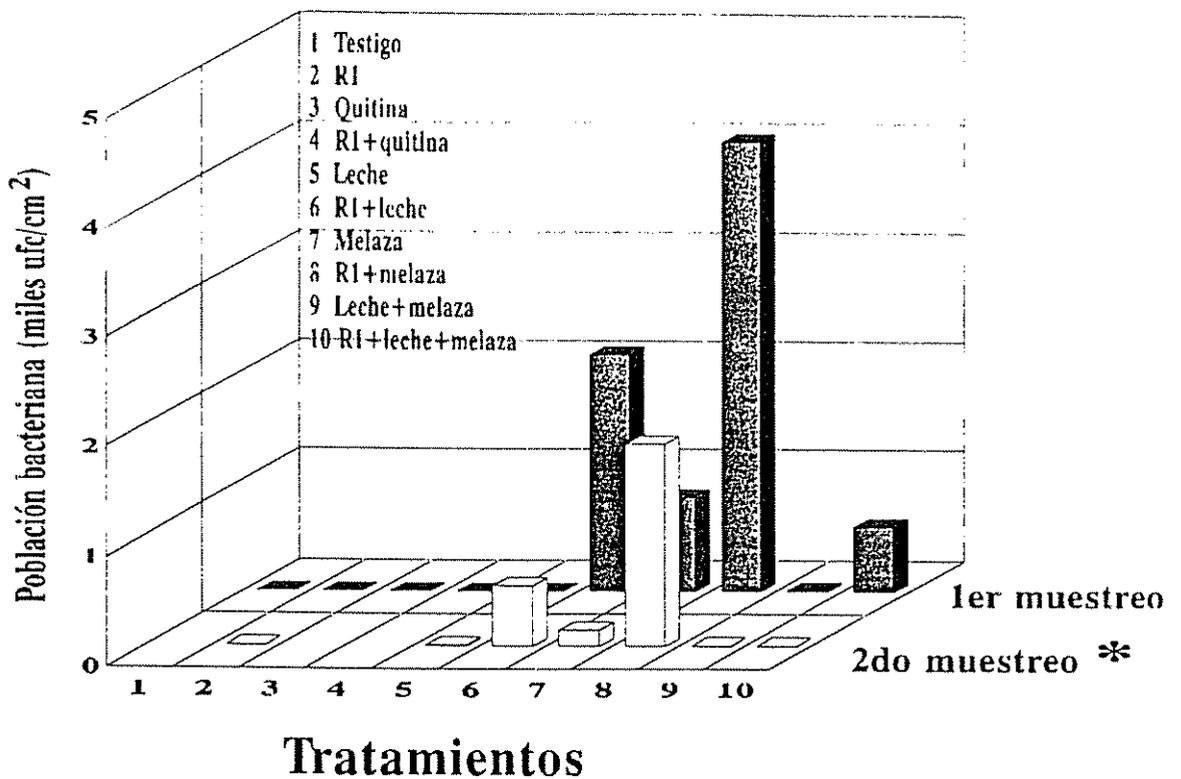


Figura 4. Efecto de sustratos sobre *S. marcescens* R1 en plantas de banano en invernadero, a los 10 días (1er muestreo) y 15 días (2do muestreo) después de la inoculación de la bacteria (ddi).

*Los tratamientos 1,3 y 4 no fueron muestreados.

En el primer muestreo se detectó la bacteria en los tratamientos leche+R1, melaza, melaza+R1, leche+melaza y leche+melaza+R1. El análisis de varianza no detectó diferencias significativas (al 5%) entre tratamientos para la variable evaluada (Cuadro 10).

Los resultados de los conteos de colonias entre repeticiones de los tratamientos mostraron mucha heterogeneidad en los valores de la variable, lo que se reflejó en los coeficientes de determinación ($R^2=0,49$) y de variación (C.V.=1256,7), factores que no permitieron detectar diferencias estadísticas entre los tratamientos (Anexo 13)

La baja recuperación de la bacteria en la primera evaluación determinó la exclusión del testigo y los tratamientos con quitina en el segundo muestreo, efectuado sobre la hoja 2 al momento de inocular la cepa (Fig 4).

Cuadro 10. Análisis de varianza del efecto de sustratos sobre *S. marcescens*, 10 días después de la inoculación de la bacteria (ddi) en plantas de banano en invernadero.

F V	G L	S C	C M	Prob>F
Repeticiones (tiempo)	2	4,0405	2,0202	0,4045ns
Tratamientos	9	32,2961	3,3885	0,1637ns
Error experimental	18	38,1868	2,1215	
Total	29	74,5233	$R^2= 0,49$	C V =1256,7

** = altamente significativo al 1%

* = significativo al 5%

ns = no significativo

El análisis de varianza en el segundo muestreo (efectuado 15 días después de la inoculación de la bacteria) mostró una respuesta similar al primer muestreo, no detectándose diferencias significativas (al 5%) entre tratamientos (Cuadro 11). La recuperación de la cepa R1 fue menor que en el primer muestreo.

Cuadro 11. Análisis de varianza del efecto de sustratos sobre *S. marcescens*, 15 días después de la inoculación de la bacteria en plantas de banano en invernadero.

F V	G L.	S C	C M.	Prob>F
Repeticiones (tiempo)	2	7,4756	3,7378	0,1918ns
Tratamientos	6	21,0626	3,5104	0,1850ns
Error experimental	12	23,1359	1,9665	
Total	20	52,1359	R ² = 0,55	C V =1931,4

** = altamente significativo al 1%

* = significativo al 5%

ns = no significativo

Los registros de temperatura y humedad relativa a las 6:00, 12:00 y 18:00 horas en casa de mallas se presentan en la Fig. 5, junto con los valores de campo (estación CATIE) durante los días del estudio.

La temperatura tuvo una tendencia similar en las dos condiciones, sin embargo, en casa de mallas las temperaturas altas (a las 12:00 horas) superaron en más de 2 grados a las registradas en campo. Esto tiene relación con el conocido efecto invernadero, donde las longitudes de onda larga con menor energía y más calor inducen el aumento de temperatura dentro de la edificación.

La humedad relativa presentó mayores contrastes entre la casa de mallas y el ambiente exterior. Aunque hubo un período en el cual no fue posible registrar la H.R. en campo, generalmente a las 6:00 y 18:00 horas se alcanzaron valores cercanos a la saturación, mientras que en casa de mallas las condiciones fueron menos variables y sin alcanzar el 90% de humedad relativa.

La mayor variabilidad en los parámetros meteorológicos se presentó a nivel de campo, sin embargo los valores más propicios para la supervivencia de microorganismos sobre la hoja, especialmente la humedad relativa, se presentaron en dicha condición.

En los dos muestreos se obtuvo la mayor recuperación bacteriana en los tratamientos aplicados con melaza y leche. La bacteria se recuperó de plantas que no fueron inoculadas con el organismo (Fig. 4) cuando se aplicaron aquellos sustratos

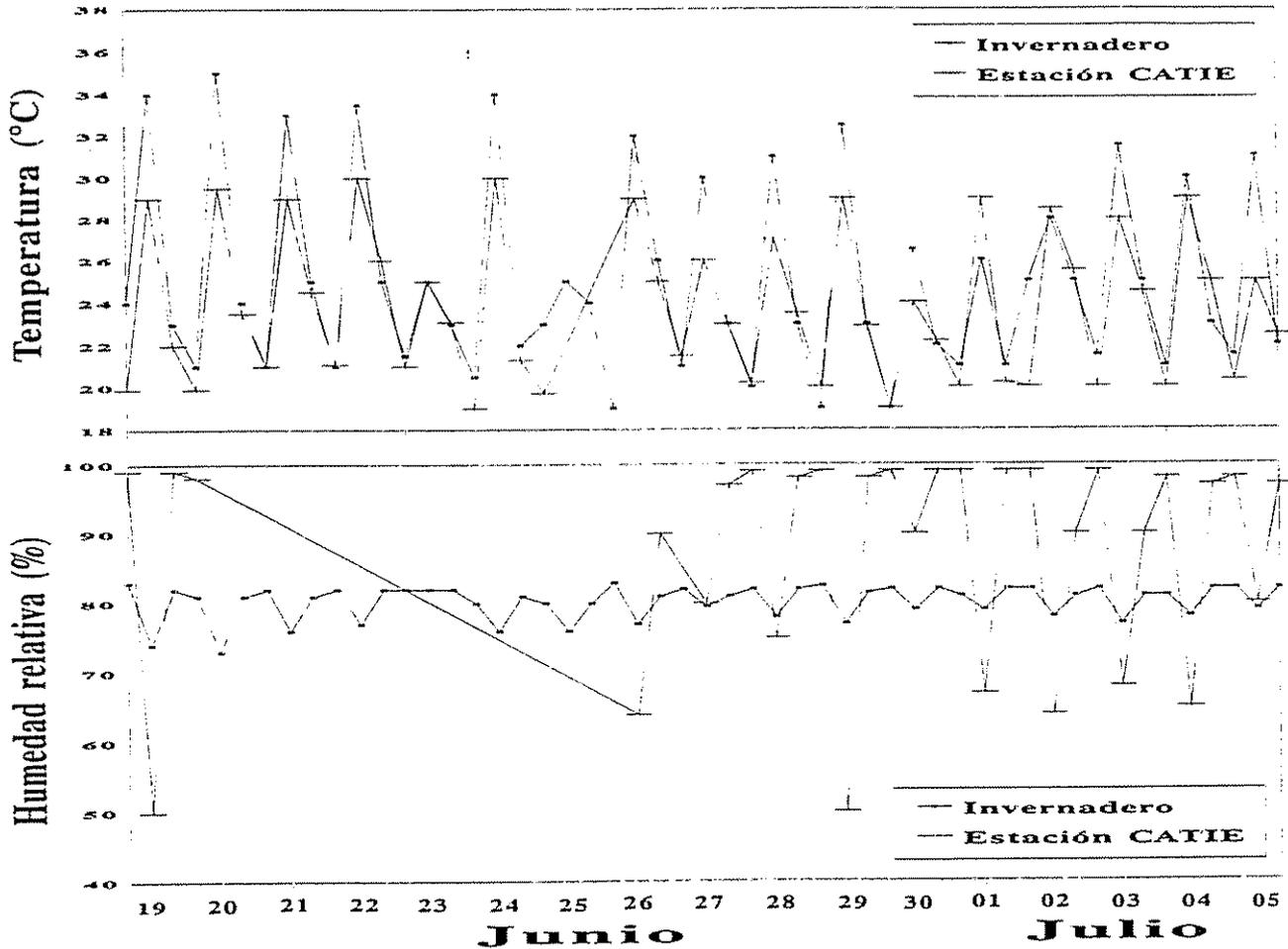


Figura 5. Condiciones de temperatura y humedad relativa en casa de mallas y campo (estación CATIE) a las 6:00, 12:00 y 18:00 horas durante los días del estudio.

* No se obtuvieron registros de H.R. en campo desde el 20 hasta el 26-06.

Aparentemente se presentaron factores limitantes del crecimiento bacteriano en las plantas, los cuales fueron superados en parte con la aplicación de los sustratos mencionados. Esta hipótesis surge porque en los otros tratamientos no se detectó la bacteria inclusive en los que se inoculó directamente (R1 y quitina+R1)

Además, dichas limitaciones pudieron asociarse con las condiciones climáticas (temperatura y H.R.) como se muestra en la Fig 5

Hubo mucha heterogeneidad entre los valores de recuperación de la bacteriana, lo que no confirió consistencia en las respuestas, y mostró un comportamiento errático del organismo en condiciones de casa de mallas

Sin embargo, la tendencia mostrada por el ensayo guarda relación con otras pruebas efectuadas con plantas en invernadero con riego al suelo de la maceta y plantas expuestas al efecto directo de las condiciones de campo (Bustamante, González, Ruiz y Gamboa, sin publicar), donde se detectó la bacteria a los siete y quince días después de la inoculación de plantas en campo con la cepa R1, pero en las plantas de invernadero también inoculadas con la bacteria su detección posterior fue prácticamente nula

El lavado de las hojas en esta investigación se efectuó con agua destilada estéril (ADE), pudiendo influir en la baja recuperación de la población bacteriana afectada por cambios en el pH de la solución. Existen soluciones alternativas a utilizar en los lavados, cuyo uso dependerá de los objetivos del trabajo. En este caso, la utilización de solución buffer (pH 7) es una alternativa para mejorar la sensibilidad del método.

El riego en las plantas de invernadero se dirigió al suelo de la maceta, lo cual pudo permitir la concentración de exudados y/o metabolitos microbianos sobre la superficie foliar que podrían afectar al antagonista, y que en campo serían lavados por la lluvia o disminuidos en concentración con la humectación de la hoja. También, pueden producirse diferencias en la anatomía superficial de la hoja por efecto de las condiciones de campo, que favorecerían el establecimiento de la bacteria en las plantas.

En trabajos efectuados sobre la fluctuación de la comunidad microbiana en la filofera de banano en diferentes zonas productoras de Costa Rica (González, Bustamante, Okumoto y González, sin publicar) se encontró que las poblaciones de *Serratia sp.* fueron significativamente menores en períodos de sequía que en períodos de lluvias, lo que indica la presencia de factores inhibidores del establecimiento de los organismos antagonistas que

disminuyen en importancia cuando ocurren las precipitaciones. González (1995) efectuó los muestreos para seleccionar organismos antagonistas a *M. fijiensis* en época lluviosa.

Graham (1995), estudió el efecto de la humectación de la hoja y la sombra sobre la supervivencia de *Xanthomonas campestris* pv *citrumelo* (*Xcc*) en hojas de cítricos. Determinó que la sombra y el riego prolongaron la supervivencia de la bacteria, mientras que después de ser expuestas las plantas algunas horas a intensa radiación y sin riego, *Xcc* bajó a niveles no detectables. La rehúmedación de hojas con riego seguidos de períodos secos de algunas horas, permitió mantener las poblaciones de *Xcc*, aunque a niveles bajos, confirmando el papel de la lluvia, el rocío y el riego en la parte aérea en la supervivencia de *Xcc*.

4.2.2. Efecto de sustratos sobre comunidad microbiana de la filosfera

Los crecimientos microbianos en medio AQ fueron enumerados sin considerar las colonias de la cepa R1. Se diferenciaron aquellos por morfología y crecimiento y se codificaron de acuerdo al orden de ocurrencia en el proceso de conteo.

Fueron contabilizados 8 hongos y 11 bacterias. De los hongos, se identificaron crecimientos de *Fusarium* sp. y de *Cladosporium* sp., basados en las características de sus estructuras reproductivas de importancia taxonómica. Del grupo bacteriano, 10 presentaron reacción positiva a la prueba de KOH al 3% y solo una mostró reacción negativa.

El medio agar quitina AQ fue desarrollado para el aislamiento y enumeración de actinomicetes del suelo (Lingappa y Lookwood 1962), y se ha estado utilizando para el aislamiento y selección de organismos quitinolíticos de la microflora epífita. En esta prueba, ninguno de los crecimientos observados presentó actividad quitinolítica a las 96 horas de incubación en el medio.

Con base en esta caracterización preliminar se determinó el índice de diversidad de la comunidad microbiana por cada tratamiento, los cuales se presentan en la Fig 6.

El mayor índice lo presentaron la aplicación de leche sola y en segundo lugar, la mezcla leche+melaza. El tratamiento de melaza+R1 mostró el menor índice.

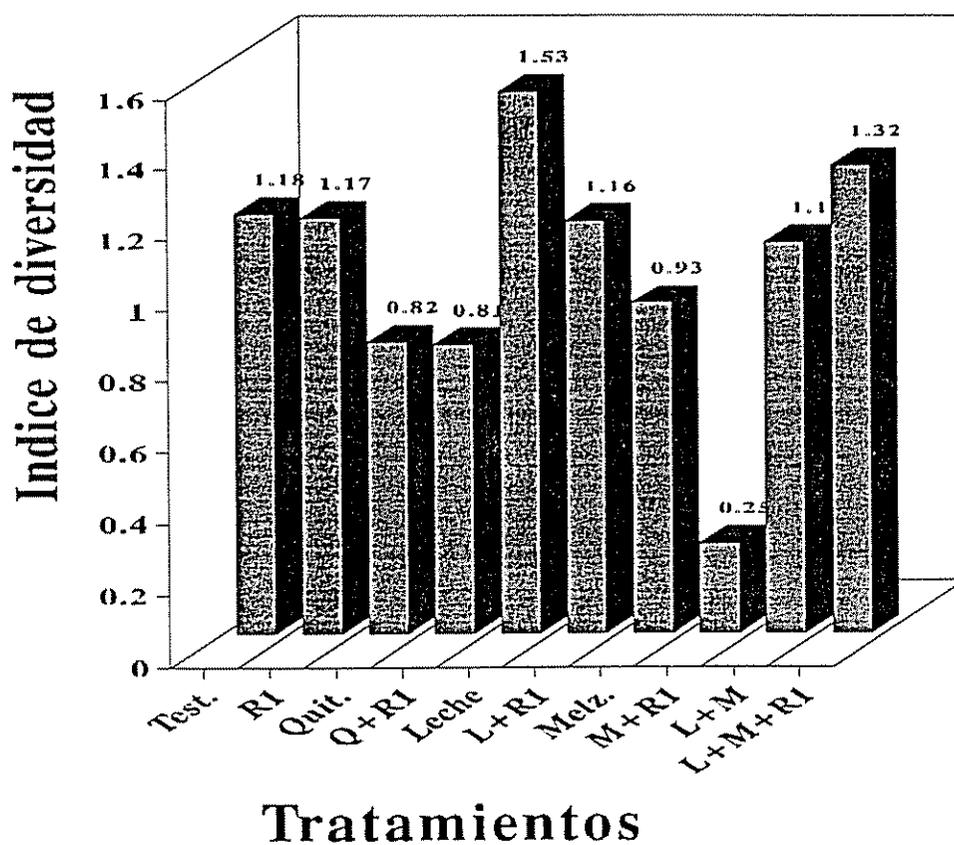


Figura 6. Valores de diversidad de la comunidad microbiana diferente a *S. marcescens* R1 por tratamiento, aislada de la filosfera de banano en medio agar quitina (AQ).

Se encontraron diferencias estadísticamente significativas a través de la prueba de Dunnett entre el testigo y el tratamiento melaza+R1, mostrando este último los valores más bajos. El resto de los tratamientos no mostraron diferencias estadísticas con el testigo (Anexo 14)

Los contrastes ortogonales detectaron diferencias significativas entre el tratamiento de R1 con melaza+R1 (Cuadro 12).

Se detectaron diferencias significativas (5%) entre el grupo de tratamientos con leche y el grupo con melaza, mostrando un mejor efecto el último. Sin embargo, no se encontraron diferencias estadísticas entre el uso de la bacteria sola y en combinación con los sustratos.

Cuadro 12. Análisis de varianza y contrastes ortogonales entre los índices de diversidad¹ de la comunidad microbiana de la filosfera de banano en invernadero bajo diferentes tratamientos.

F V	GL	SC	CM	Prob>F
Repeticiones(tiempo)	2	0,1648	0,1648	0,2631ns
Tratamientos	9	0,3694	0,3694	0,0165**
Contrastes				
R1 vs quitina+ R1	1	0,1997	0,1997	0,2032ns
R1 vs leche+R1	1	0,0005	0,0005	0,9494ns
R1 vs melaza+R1	1	1,2667	1,2667	0,0038**
R1 vs lec+mel+R1	1	0,0331	0,0331	0,5974ns
Leche vs melaza	1	1,7018	1,7018	0,0012**
Error experimental	18	2,0610	0,1145	
Total	29	5,7151	R²= 0,64	CV = 32,9

¹Índice de diversidad de Shannon

Lec=Leche, Mel=Melaza

** = altamente significativo al 1%

* = significativo al 5%

ns = no significativo

En esta prueba, los tratamientos con melaza y con quitina fueron los que mostraron en promedio los menores índices de diversidad en la comunidad. Mientras tanto, la

aplicación de leche, leche+melaza, la cepa R1 y el testigo mostraron los índices promedio más altos.

En el primer ensayo de invernadero, melaza, leche, y leche+melaza mostraron la mejor tendencia para la supervivencia del antagonista en casa de mallas. La mayor recuperación se obtuvo con melaza+R1. Al presentarse este último tratamiento como el de menor diversidad microbiana, parece que fue favorable para la cepa antagonista y corrigió en parte las imitaciones por competencia o metabolitos microbianos que afectaron a la bacteria en condiciones de casa de mallas.

En el caso de leche y leche+melaza con relación a la prueba anterior de invernadero, se recuperó también población de R1 pero en menor grado, lo que sugiere que a diferencia de la melaza, la aplicación de leche favoreció no solo a la cepa antagonista, sino también el establecimiento de una comunidad microbiana más diversa.

La aplicación de quitina se mostró poco promisorio para su uso como sustrato de R1, pero con menor efecto sobre la comunidad microbiana que la melaza.

De todos los sustratos, al compararlos con el testigo, solo la leche se mostró con efecto sobre la diversidad microbiana, lo cual puede relacionarse con su riqueza nutricional ya descrita (Anexos 1,2 y 3).

4.2.3. Efecto de sustratos y bacterias sobre la severidad de la sigatoka negra en invernadero.

El tratamiento con fungicida mostró los menores niveles de enfermedad con relación al testigo sin aplicación y al resto de los tratamientos (Fig. 7). La prueba de Dunnett mostró diferencias significativas (al 5%) entre el testigo y los tratamientos de fungicida, melaza+R1 y leche+melaza+R1. El resto de los tratamientos mostraron niveles de enfermedad estadísticamente similares al testigo (Anexo 15).

La prueba de contrastes mostró diferencias altamente significativas (1%) entre el tratamiento fungicida y el resto de los tratamientos (Cuadro 13).

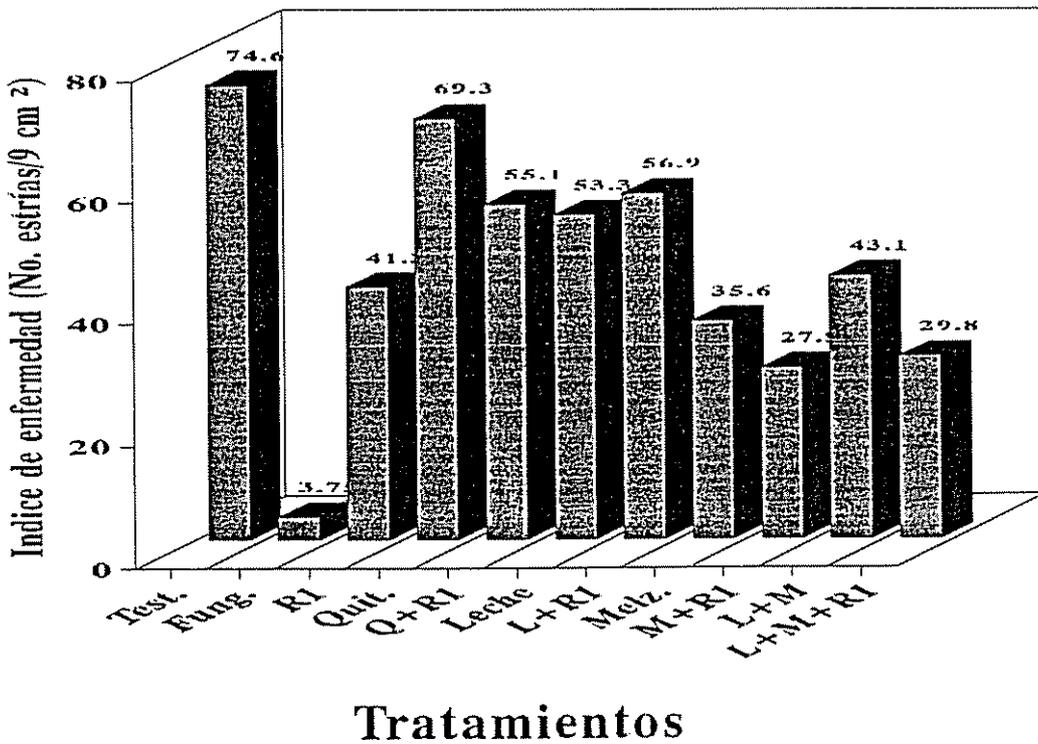


Figura 7. Efecto de sustratos y *S. marcescens* R1 sobre la severidad de la sigatoka negra en plantas de banano de 5 meses de edad en invernadero.

Cuadro 13. Resultados del análisis de varianza y contrastes ortogonales entre tratamientos sobre la sigatoka negra en plantas de banano en invernadero.

F V	G L	S C	C M	Prob>F
Repeticiones	2	867,2694	433,6346	0,2242ns
Tratamientos	10	12334,4021	1233,4401	0,0018**
Contrastes				
Con fung vs sin fung	1	5508,4184	5508,4184	0,0002**
R1 vs quitina+R1	1	284,9794	284,9794	0,3155ns
R1 vs leche+R1	1	364,2604	364,2604	0,2581ns
R1 vs melaza+R1	1	270,0104	270,0104	0,3282ns
R1 vs lec+mel+R1	1	201,2604	201,2604	0,3972ns
Leche vs melaza	1	1636,8352	1636,8352	0,0228*
Error experimental	20	5377,2042	268,8601	
Total	32	18578,8738	R ² = 0.71	C V = 36,8

Lec=Leche, Mel=Melaza

** = altamente significativo al 1%

* = significativo al 5%

ns = no significativo

La prueba se efectuó bajo condiciones de inoculación natural de *M. fijiensis* debido a los problemas asociados con el lento crecimiento del patógeno en medio artificial que no permiten garantizar suficiente inóculo para efectuar aplicaciones controladas (Pasberg-Gauhl 1991)

Debido a que las condiciones de manejo de las plantas en esta prueba (previas a la exposición) fueron similares a las del primer ensayo de invernadero, la baja actividad de control de los sustratos puede explicarse por las limitaciones que tuvo para su establecimiento la población antagonista inoculada, para lo cual, los tratamientos que incluyeron melaza fueron los más favorables.

La mezcla leche+melaza mostró una tendencia de control positiva, lo que indica en parte la ocurrencia de antagonismo y/o de metabolitos microbianos perjudiciales para el agente de control.

Fuera de las hojas evaluadas se presentó una respuesta que creó dificultades para atribuir las diferencias encontradas al efecto de los tratamientos y/o a otros factores. Las

dos hojas próximas superiores a las hojas aplicadas presentaron una infección más severa. Esto ocurrió en todas las plantas de los diferentes tratamientos

Pasberg-Gauhl (1991) y González (1995) procedieron de forma similar que en este ensayo, exponiendo plantas de banano de invernadero por 2 y 7 días, respectivamente, al inóculo natural de sigatoka negra y no informaron sobre la ocurrencia de un fenómeno similar. En contraste, para esta prueba las plantas fueron expuestas por 12 días para garantizar su inoculación con el patógeno

Aparentemente las plantas fueron sometidas por mucho tiempo a un factor de estrés (adaptación) al trasladarse de invernadero a campo, donde por acción de luz, CO₂ y/o deficiencia hídrica (Cabrera 1988), se forzó a un cierre estomático que limitó la penetración del patógeno en las hojas inoculadas. Las hojas nuevas, con posiblemente mayor número de estomas que en las hojas de mayor edad, fueron emitidas en condiciones en que la planta se encontraba adaptada al medio y con actividad estomática normal, siendo más favorable para la penetración del hongo. De allí que los niveles de infección hayan sido mayores en las hojas emitidas en condiciones de adaptación de la planta que de alguna forma fueron más susceptibles.

Sin embargo, al no encontrarse diferencias estadísticas entre el testigo y los tratamientos con sustratos y bacterias, pudo ser que el efecto de los tratamientos no se observara debido a la diseminación de la bacteria entre las plantas,

Con base en los resultados obtenidos, para la siguiente fase (campo) se decidió probar la melaza como sustrato para el control de la enfermedad en plantas manejadas comercialmente. También se consideró incluir en dicha prueba el uso de quitina, ya que este sustrato en otros trabajos con mayor tiempo de estudio y mayor número de aplicaciones ha tenido efectos positivos en el control de enfermedades

La combinación del antagonista con los sustratos no resultó diferente en efecto que la aplicación del antagonista solo, lo cual requeriría una confirmación con evaluaciones sobre plantas adaptadas a las condiciones de campo

4.3. APLICACION DE SUSTRATOS EN CAMPO

4.3.1. Efecto de sustratos y bacterias sobre la severidad de la enfermedad en plantas de banano en macetas

En el ensayo de invernadero (punto 3 3 3.) donde se probaron los sustratos por su efecto sobre la sigatoka negra, se obtuvieron pocas diferencias entre los sustratos con el menor índice de enfermedad para el tratamiento de melaza+R1. Sin embargo, la mayor infección manifiesta en las hojas superiores que no recibieron tratamiento propició la realización de un ensayo en el cual se trabajara con las plantas adaptadas a las condiciones de campo para confirmar los resultados obtenidos en ensayos previos.

Como en la prueba de invernadero, el tratamiento con fungicida presentó el menor índice de enfermedad (Fig. 8). En segundo lugar, se manifestaron como tratamientos efectivos en el control de la enfermedad leche+R1 y R1 sola. La prueba de Dunnett detectó diferencias significativas con el testigo solo para el tratamiento fungicida (Anexo 16).

Cuadro 14. Resultados del análisis de varianza y los contrastes ortogonales de la severidad de la sigatoka negra en plantas de banano en macetas expuestas en campo.

F V	GL	S C	C M	Prob>F
Repeticiones	2	0,2693	0,1347	0,5703ns
Tratamientos	10	31,8510	3,1851	0,0001**
Contrastes				
Con fung vs sin fung	1	26,3707	26,3707	0,0001**
R1 vs quitina+R1	1	0,0251	0,0251	0,7785ns
R1 vs leche+R1	1	0,0048	0,0048	0,9025ns
R1 vs melaza+R1	1	0,9280	0,9280	0,0984ns
R1 vs lec+mel+R1	1	0,5778	0,5778	0,1865ns
Leche vs melaza	1	2,8388	2,8388	0,0023**
Fung vs. leche+R1	1	10,6056	10,6056	0,0001**
Error experimental	20	4,6627	0,2331	
Total	32	36,7830	R ² = 0,87	C V = 20,1

Lec=Leche, Mel=Melaza

** = altamente significativo al 1%

* = significativo al 5%

ns = no significativo

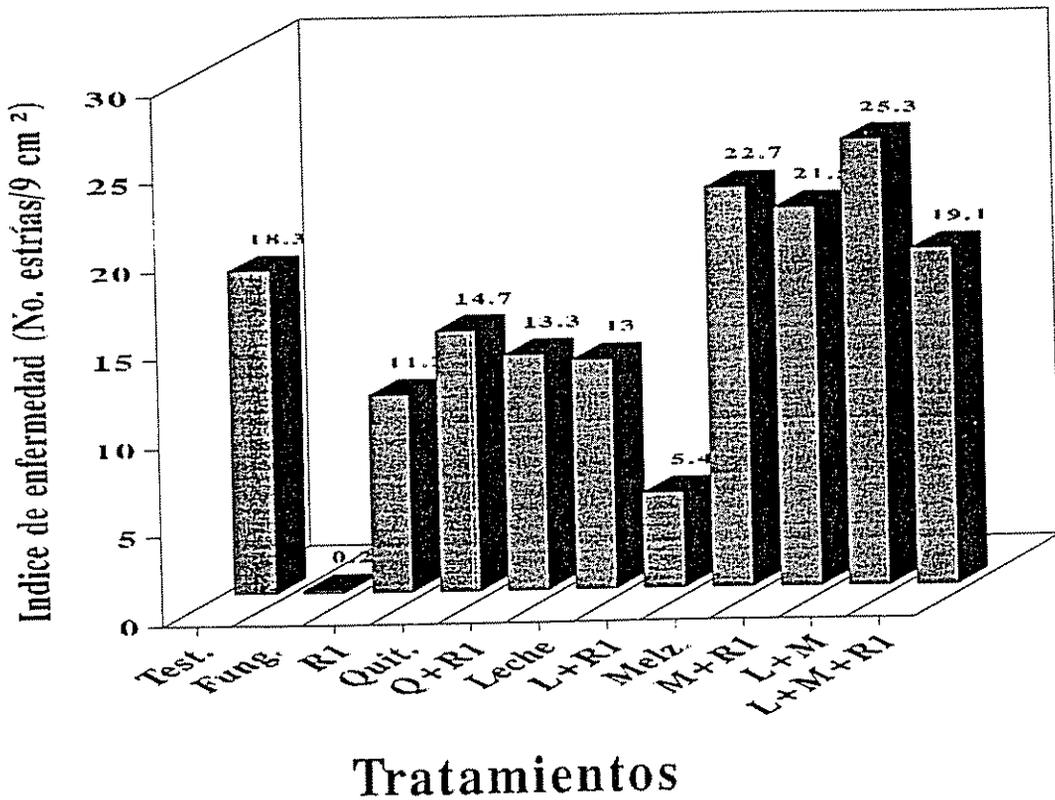


Figura 8. Efecto de sustratos y *S. marcescens* R1 sobre la severidad de la sigatoka negra en plantas en macetas, aclimatadas durante 45 días en campo.

A través de los contrastes ortogonales no se encontraron diferencias estadísticas entre la bacteria sola y en combinación con los sustratos (Cuadro 14)

La prueba de contrastes mostró diferencias altamente significativas (1%) entre los tratamientos con fungicida y sin fungicida, el fungicida resultó mejor; y entre el grupo de tratamientos con melaza y el grupo con leche. La leche sola y en combinación con la bacteria fue más efectiva que la melaza.

En las condiciones de manejo de las pruebas anteriores (ensayos 1 y 2 de invernadero) la melaza se había mostrado como el sustrato más promisorio por sus efectos positivos, aunque no de significancia estadística, sobre la bacteria antagonista y sobre la enfermedad

En las pruebas de invernadero se efectuó una aplicación de la bacteria y los sustratos con un intervalo entre aplicaciones de una semana (inoculación de la bacteria el primer día y aplicación del sustrato una semana después); mientras que en esta prueba se efectuaron aplicaciones simultáneas de la bacteria y los sustratos durante tres semanas

Aparentemente la melaza no tuvo efecto en controlar la enfermedad y muy por el contrario alcanzó un índice de enfermedad superior al testigo. La quitina mostró una mejor tendencia para el control, lo cual ya se ha documentado en otros trabajos (González 1995).

La efectividad de la leche pudo relacionarse con su riqueza nutricional para estimular la comunidad microbiana benéfica, una acción como barrera física y/o como portador de una microflora con posible actividad sobre la hoja; contrastando con la acción de la melaza bajo las condiciones de invernadero

4.3.2. Efecto de sustratos y bacterias antagonistas sobre la severidad de la enfermedad en campo.

4.3.2.1. Efecto de tratamientos sobre la sigatoka negra

El tratamiento con fungicidas presentó los menores valores de infección acumulada o desarrollo de la enfermedad expresada a través del ABCPE para el período de estudio (Cuadro 15 y Fig. 9).

Los tratamientos de quitina y quitina+melaza+R1 presentaron también menores valores promedio de ABCPE que el testigo

Cuadro 15. Valores promedio de área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) obtenidos para los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Promedio ABCPE ¹
Testigo	2,468
Fungicida	0,944
Quitina	2,179
Quitina + R1	2,519
Melaza + R1	2,581
Quitina + melaza + R1	2,088

¹ El ABCPE fue calculada como $((Y_i + Y_{i+1}) / 2)(T_{i+1} - T_i)$, donde Y_i = severidad de enfermedad en la i -ésima observación, T_i = tiempo en la i -ésima observación, y n = número total de observaciones

La prueba de Dunnett mostró diferencias significativas (5%) en el ABCPE con el testigo solo con el tratamiento de fungicidas, los demás tratamientos fueron estadísticamente similares a aquel (Anexo 17)

Los contrastes ortogonales solo determinaron diferencias altamente significativas (al 1%) entre el tratamiento con fungicidas y el resto de los tratamientos (Cuadro 16). No fueron significativos los contrastes entre el tratamiento quitina sin R1 y con R1, entre quitina+R1 y melaza+R1, ni entre estos tratamientos con el tratamiento quitina+melaza+R1. Sin embargo los valores promedio de ABCPE para éste último tratamiento fueron menores que los otros dos.

Las evaluaciones de la enfermedad se efectuaron sobre las hojas de la planta que habían recibido protección desde el momento de su emisión (hoja candela al momento de iniciar las aplicaciones) contando hacia arriba

La última aplicación de los tratamientos debió efectuarse en la tercera semana de evaluaciones de la enfermedad debido a que el ritmo de crecimiento de las plantas se convirtió en un factor desfavorable en el control de la deriva entre tratamientos, por el inicio del traslape entre hojas de plantas de parcelas vecinas

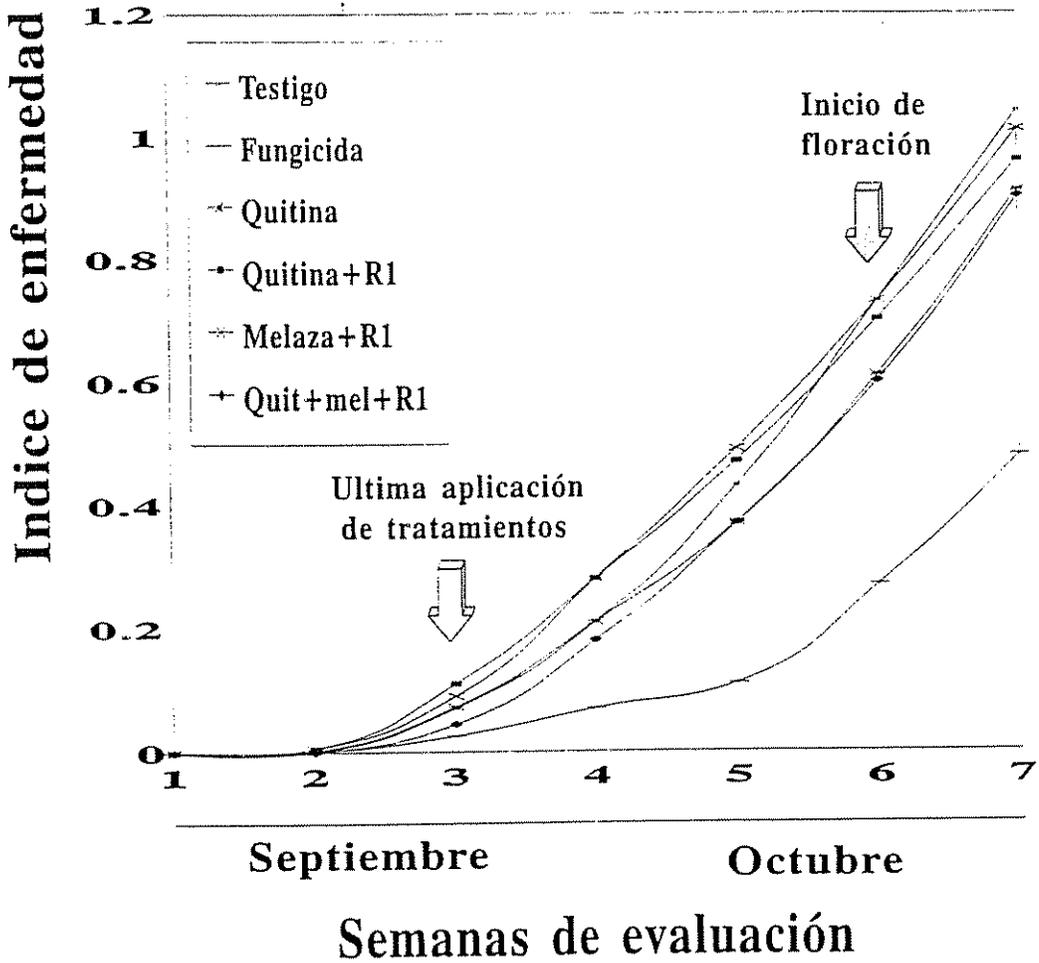


Figura 9. Efecto de tratamientos sobre el desarrollo de la sigatoka negra en banano, EARTH, Guácimo, Costa Rica.

Cuadro 16. Resultados del análisis de varianza y contrastes ortogonales de los valores de ABCPE para los tratamientos sobre la sigatoka negra.

F V	GL	SC	CM	Prob F
Repeticiones	3	1,5329	0,5110	0,1086 ns
Tratamientos	5	7,5201	1,5040	0,0014 **
Contrastes				
Fungicida vs resto	1	6,7498	6,7498	0,0001 **
Quitina vs Quitina+R1	1	0,2312	0,2312	0,3140 ns
Quitina+R1 vs Melaza+R1	1	0,0078	0,0078	0,8507 ns
Q+R1 o M+R1 vs Q+M+R1	1	0,5704	0,5704	0,1226 ns
Error experimental	15	3,1956	0,2130	
Total	23	12,2486	R ² = 0,74	C.V = 21,7

Q= quitina, M= melaza

**= altamente significativo al 1%

* = significativo al 5%

ns= no significativo

A partir de la sexta semana de evaluaciones, cuando las plantas cumplían aproximadamente 5 meses desde el trasplante, entraron en fase de parición, lo cual favorecía el aumento en el índice de enfermedad (IE) al detenerse la emisión de nuevas hojas, y lo que se reflejó en la Fig 9 en las últimas semanas de evaluación

Los registros de severidad finalizaron en la séptima semana cuando había un 20% de plantas paridas en la parcela

4.3.2.2. Condiciones pluviométricas y densidad de inóculo en la parcela

En la Fig 10A se presentan los valores semanales de precipitación registrados a partir de la primera semana de aplicación de los tratamientos

En la segunda y tercera semanas se presentaron problemas con el funcionamiento del pluviógrafo, no pudiéndose registrar los valores correspondientes a dicho período.

Los niveles de lluvia obtenidos en la parcela durante los meses de Agosto, Septiembre y Octubre fueron comparables con datos climáticos (de 10 años) de estaciones meteorológicas de la zona, donde los valores promediaron los 300 mm de lámina de lluvia

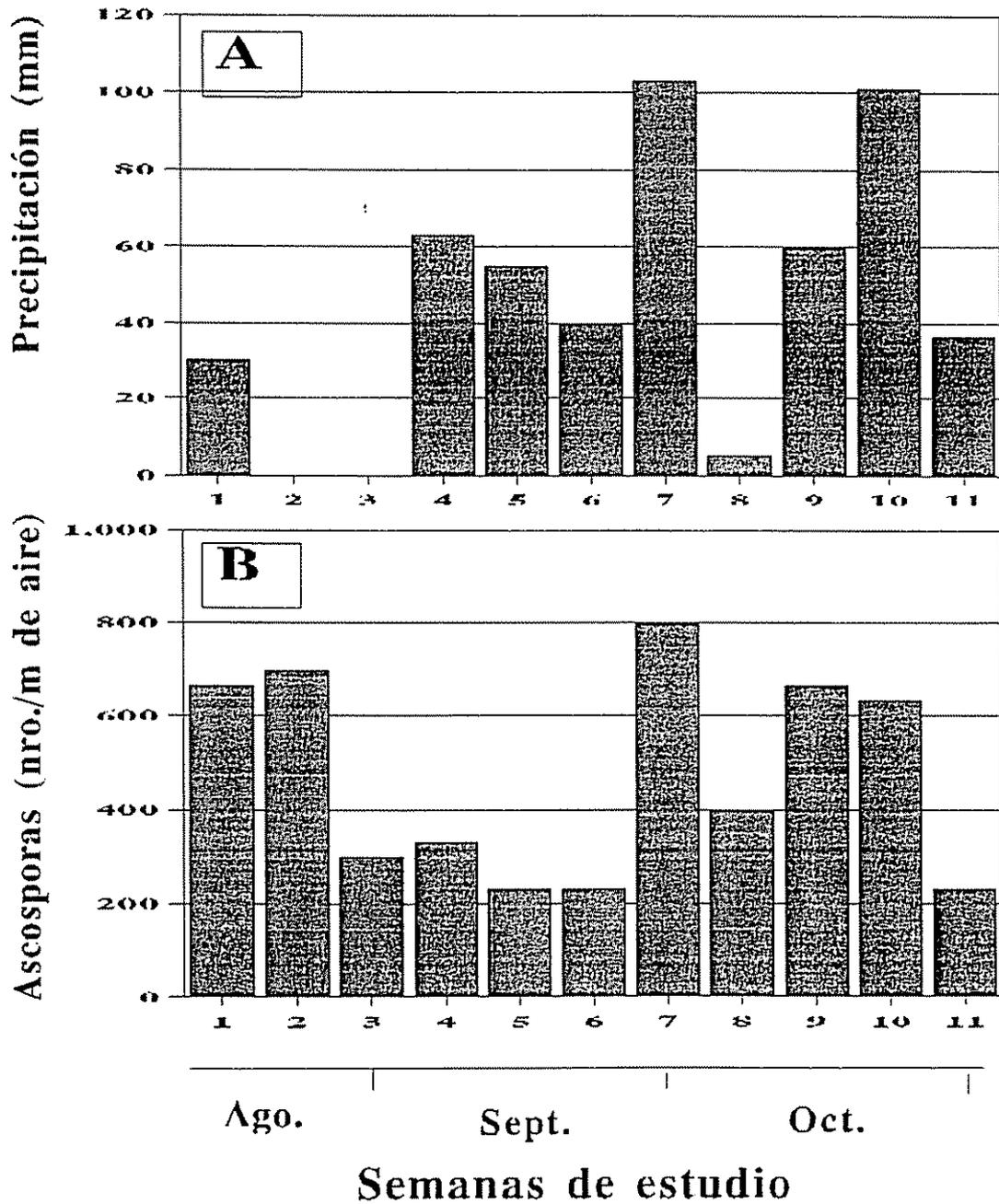


Figura 10. Registros semanales de: A) precipitación y B) concentración de ascosporas de *M. fijiensis* en la parcela de campo, EARTH, Guácimo, Costa Rica

mensual (López y Espinosa 1995), considerados adecuados para el cultivo del banano (Pardo 1984).

Los valores estimados de concentración de esporas de *M. fijiensis* durante el periodo de estudio, se presentan en la Fig 10B

La concentración de esporas registrada en la parcelas en Agosto, Septiembre y Octubre no sobrepasó el número de 1000 en ninguno de los meses. Los valores obtenidos fueron menores que los registrados por Gauhl (1990) en plátano para los mismos meses en la zona Este en 1985, donde se obtuvieron densidades de más de 2000 ascosporas/m³ de aire/semana

Cervantes (1995) estimó concentraciones de esporas por semana que promediaron las 1000, pero con registros menores de este valor en algunas semanas de los meses citados.

González (1995) efectuó sus ensayos de campo bajo alta presión de inóculo, con valores de concentración de ascosporas sobre los 10000 por m³ de aire por semana, y con baja intensidad de despunte y deshoja en la parcela

Los bajos niveles de inóculo en la parcela son atribuibles al manejo de la plantación para garantizar producción de carácter comercial. La eficiencia de la trampa, que puede ubicarse en el orden del 75% (Barlett y Bainbridge 1978), es otro factor que se debe considerar en las estimaciones de la concentración de las estructuras reproductivas del hongo.

Durante un período de tres semanas se efectuaron registros de la concentración de ascosporas en una zona de reciente establecimiento dentro de la plantación comercial bajo aplicación de fungicidas, comparándose las estimaciones con las registradas para el mismo período en el ensayo. Esta área en la plantación de la EARTH fue sembrada con material vegetal de origen similar al de las plantas de la parcela experimental y contaban para el momento de los registros con dos meses más de edad de establecimiento con relación a las plantas del ensayo (Cuadro 17).

Cuadro 17. Registros de concentración de ascosporas¹ en la parcela con relación a la existente en la plantación comercial de la EARTH.

Semanas de registro	En la parcela (ascosporas m ⁻³ aire)	En plantación comercial (ascosporas m ⁻³ aire)
28/09 al 04/10	399	798
05/10 al 11/10	665	698
12/10 al 18/10	632	2095

¹ Valores registrados con trampa volumétrica tipo Hirst (Burkard Manufacturing Co)

La estimación en las dos zonas indica que el inóculo en la plantación comercial se presentó siempre en mayor concentración que en el ensayo, para un mismo periodo de estudio

En el área comercial la actividad de deshoja y despunte fue más estricta que en el ensayo, y esta baja densidad de inóculo dentro de la parcela experimental podría sugerir también un efecto de los tratamientos sobre la emisión de estructuras reproductivas, que no se manifestó en la zona bajo aplicación de fungicidas

4.3.2.3. Características químicas del suelo

Con base en los trabajos efectuados por López y Solís (1991) para caracterizar los contenidos nutricionales de los suelos de las zonas Este y Oeste de la vertiente Atlántica, y la zona Sur de la vertiente del Pacífico, se compararon los valores de la parcela con los promedios establecidos para la zona Oeste (Cuadro 15), dentro de la cual se localiza la plantación de la EARTH.

La reacción del suelo (pH) en la parcela fue menor que el promedio para la zona, valores estos considerados como fuertemente ácidos

Los cationes Ca, Mg y K presentaron valores similares en relación con la zona, a excepción del K que fue sensiblemente menor al promedio (0,45). Se considera que en la zona Oeste los valores de Ca y Mg son bajos a muy bajos. La acidez extractable en la parcela (0,24) fue sensiblemente menor al promedio para la zona (1,19).

Cuadro 18. Caracterización química del suelo de la parcela con relación a las condiciones de la zona Oeste de la vertiente Atlántica.

Nutrimiento	Concentración	Valor en la parcela	Promedio en la zona ¹
Ca	(cmol (+) / L)	4,3	5,61
Mg	(cmol (+) / L)	1,28	1,61
K	(cmol (+) / L)	0,26	0,45
Acidez	(cmol (+) / L)	0,24	1,19
P	(mg / L)	36	15
Fe	(mg / L)	575	180
Cu	(mg / L)	14	7
Zn	(mg / L)	2,9	1,1
Mn	(mg / L)	26	25
pH	(agua)	4,84	5,33
M O	%	6,13	5,1

¹ Tomados de López y Solís (1991)

El contenido de materia orgánica (M O.) se correspondió con los valores generales (5,1) En la zona Oeste se presentan mayores valores de M O que en las zonas Este y Sur (López y Solís 1991)

Los contenidos de P, Fe, Cu y Zn en la parcela fueron mayores que los valores para la zona En diferentes trabajos (Jiménez 1972, Herrera 1989, López y Solís 1991) se ha indicado que la zona Oeste presenta los suelos de más baja fertilidad entre las principales zonas bananeras de Costa Rica

Tomando en cuenta las relaciones de equilibrio entre los elementos nutricionales del suelo, se compararon los valores de la parcela con los utilizados en Costa Rica para el cultivo del banano (Cuadro 16).

Cuadro 19. Relaciones de equilibrio K-Ca-Mg en el suelo de la parcela y las utilizadas para banano en Costa Rica.

Relación	Valor en la parcela	Valor para banano ¹
Ca / Mg	3,4	3,5-4,0
Ca / K	16,5	17,0-25,0
Mg / K	4,9	8,0-15,0
(Ca+Mg) / K	21,2	20,0-30,0
100 x K / (Ca+Mg+K)	4,5	3,0-5,0

¹ Tomados de López (1983)

Las relaciones de Ca/Mg y Ca/K se ubican en niveles críticos, especialmente la relación Mg/K, confirmando las afirmaciones sobre las condiciones nutricionales de los suelos en la zona Oeste, donde se presentan desbalances de Ca y Mg por los altos contenidos de K (López y Solís 1991)

Las evidencias encontradas en otros trabajos y este, han indicado consistentemente la posibilidad de diseminación del microorganismo hacia plantas no inoculadas directamente, limitando la detección de diferencias entre tratamientos

Tomando en cuenta que los niveles de inóculo se mantuvieron en valores que podrían considerarse bajos con relación a los registrados por González (1995), el efecto de los tratamientos con sustratos y bacterias pudo ser disminuído por acción de la deriva del microorganismo, favoreciendo al testigo a un nivel en que las diferencias con los otros tratamientos con menor efecto de control que el fungicida fueran no detectables.

Esta consideración surge de los resultados obtenidos por González (1995), donde los tratamientos con los agentes de control y quitina lograron controlar la enfermedad en un 45% en promedio con relación al testigo de la parcela experimental, pero al comparar los tratamientos con otra parcela próxima sin ningún tipo de control, se encontró que los tratamientos lograron reducir la severidad de la enfermedad en un 72% en promedio.

El efecto de deriva mencionado también pudo producirse a nivel de suelo por comunicación del nivel freático, ya que es conocida la acción de cepas de *S. marcescens* desde la rizosfera como inductores de crecimiento en plantas.

Basados en la posible acción de la quitina como barrera a la penetración del patógeno, como inductor de resistencia en las plantas y/o como estimulador de la actividad quitinolítica en la comunidad microbial, y el efecto comprobado de la melaza como sustrato para la multiplicación bacteriana, una formulación de estos compuestos con los antagonistas podría ser una alternativa para reducir los posibles riesgos asociados con la aplicación masiva y frecuente de microorganismos en el control de la sigatoka negra.

En la primera fase del trabajo, el efecto del sustrato de la superficie de la hoja de banano fue positivo para el crecimiento poblacional de las cepas antagonistas del género *Serratia*, mientras que leche y melaza resultaron con efecto positivo y común para todos los organismos antagonistas evaluados. Estos resultados mostraron la participación de los

carbohidratos como componentes de los exudados foliares y su necesaria inclusión en futuras formulaciones para mejorar la supervivencia de los microorganismos sobre la superficie foliar

Se efectuó un estudio preliminar de la concentración de los sustratos a utilizar en forma práctica, estudios posteriores deben considerar factores de tipo económico, de tipo biológico, etc , para proponer un nivel más ajustado y factible

La melaza resultó un sustrato promisorio para el crecimiento de los antagonistas y para el control de la enfermedad bajo las condiciones de invernadero, pero la repetición de la prueba en campo con una aplicación más comercial de los tratamientos, indicó que al parecer en condición de casa de mallas aquel sustrato produjo su efecto favoreciendo al antagonista en perjuicio de la comunidad microbiana, lo que a largo plazo podría resultar en condiciones más favorables para la acción del patógeno

La leche contrastó en efecto con la melaza, estimulando la diversidad microbiana en invernadero y la supervivencia de la población antagonista en menor grado. En la prueba con plantas en macetas en campo, la aplicación periódica de leche y de quitina durante tres semanas contribuyó a controlar la enfermedad.

A nivel de campo en siembras bajo similares condiciones de manejo que las comerciales, los sustratos no mostraron diferencias estadísticas en la enfermedad con relación a plantas sin protección. Sin embargo, la utilización de microorganismos vivos con posibilidad de diseminación o dispersión crean incertidumbre acerca de los efectos de los tratamientos probados.

La posibilidad de que los sustratos actúen como factores de crecimiento de la comunidad microbiana benéfica, restando importancia a la inoculación directa de los antagonistas sería la alternativa más recomendable para el uso de estos compuestos en el control de enfermedades.

Aunque los tratamientos fungicidas se han mostrado como los más efectivos en el control de la sigatoka negra, el efecto de estos compuestos sobre poblaciones de levaduras y hongos (Dickinson y Wallace 1976, Egdinton *et al* 1971) podría estar perjudicando la actividad de agentes de control ligada al balance ecológico microbiano, que es el fundamento de la aplicación de los sustratos en la superficie foliar.

5. CONCLUSIONES

1. El extracto de la superficie de la hoja de banano fue el mejor sustrato para la multiplicación *in vitro* de las bacterias del género *Serratia*: *S. marcescens* R1 y *S. entomophila* A100
2. La leche y la melaza fueron los mejores sustratos para la multiplicación *in vitro* de *Bacillus cereus* A30
3. La leche y la melaza fueron los sustratos comunes en efecto positivo sobre la multiplicación *in vitro* de las cepas antagonistas a *M. fijiensis*
4. La habilidad quitinolítica *in vitro* de *S. marcescens* R1 fue afectada con la exposición por 24 horas al almidón de yuca
5. La melaza al 1% (p/v) es una alternativa para la multiplicación en laboratorio de *S. marcescens* R1.
6. La leche al 1% (v/v) inhibió la multiplicación *in vitro* de *S. marcescens* R1
7. La melaza con *S. marcescens* R1 fue la mejor combinación sustrato+bacteria para controlar la sigatoka negra en casa de mallas
8. La leche y la quitina mostraron tendencia positiva como sustratos para el control de la sigatoka negra en plantas en macetas en campo
9. En la prueba de campo en una zona productora de banano, no se pudieron detectar diferencias en efecto sobre la sigatoka negra entre los sustratos y el testigo sin protección, debido al subsidio recibido por el testigo de los otros tratamientos.

- 10 En la prueba de campo se encontró una menor concentración de ascosporas de *M. fijiensis* en el ensayo de sustratos que en la plantación comercial bajo aplicación de fungicidas

- 11 En condiciones de casa de mallas y campo, el tratamiento fungicida fue el más efectivo en el control de la enfermedad

6. RECOMENDACIONES

- 1 Determinar la composición química de los exudados foliares de banano, para definir los factores de tipo nutricional que limitan el establecimiento de los microorganismos sobre la superficie.
- 2 Tomar en cuenta para la preparación futura de formulaciones con fines de control biológico en banano, las características de la leche o la melaza como sustratos, y la inclusión de quitina para garantizar la actividad de microorganismos quitinolíticos.
- 3 Determinar el mecanismo de acción de la quitina en las plantas, ya que es probable su acción como inductor de algunas respuestas fisiológicas que no han sido estudiadas en banano.
- 4 Definir un diseño a nivel de campo que permita la evaluación de tratamientos con uso de microorganismos sin que se produzca una acción de deriva en favor del testigo sin aplicación.
- 4 Efectuar una caracterización de las zonas de producción de banano en Costa Rica con relación a la comunidad microbiana de la filosfera, con énfasis en los organismos quitinolíticos, considerando su fluctuación poblacional durante el año y las condiciones de manejo en las plantaciones.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ALEXOPOULUS, C J ; MIMS, C W. 1979 Introductory Mycology. 3 ed. New York, Wiley 632 p.
- ALLAN, C ; HADWIGER, L. 1979 The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Experimental Mycology*, 3:285-287.
- AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY 1984 Manual of methods for general bacteriology. Washington, USA, ASM. 524 p
- ANDREWS, J H 1992. Biological control in the phyllosphere. *Annual Review of Phytopathology*, 30:603-635
- ATLAS, R. 1984. Use of microbial diversity measurements to assess environmental stress. *In* Current Perspectives in Microbial Ecology. M J Klug and C A Reddy eds. Proceedings of International Symposium of Microbial Ecology (3, August 7-12, 1983, Michigan). Washington, USA, ASM. 540-545 p
- BAKER, C ; THOMAS, C ; SASSER, M ; McFALL, J 1983 Inhibitory effect of *Bacillus subtilis* on *Uromyces phaseoli* and on development of rust pustules on bean leaves. *Phytopathology*, 73:1148-1152
- BARTLETT, J.; BAINBRIDGE, A 1978 Volumetric sampling of micro organism in the atmosphere. *In* Bartlett J.T and Bainbridge, A eds. Plant disease epidemiology. London, Blackwell Scientific. Publ. Seite. 23-30
- BASHI, E.; FOKKEMA, N J 1977. Environmental factors limiting growth of *Sporobolomyces roseus*, an antagonist of *Cochliobolus sativus* on wheat leaves. *Transactions of the British Mycological Society*, 68:17-25.
- BENHAMOU, N.; LAFONTAINE, P.; NICOLE, M. 1994. Induction of systemic resistance to Fusarium crown and root rot in tomato plants by seed treatment with chitosan. *Phytopathology*, 84(12):1432-1444
- BERNASCONI, P ; LOCHER, R.; PILET, P.; JOLLES, J ; JOLLES, P 1987. Purification and N-terminal amino-acid sequence of a basic lipoenzyme from *Parthenocissus quinquefolia* cultured *in vitro*. *Biochim. Biophys Acta*, 915:254-260.
- BLAKEMAN, J.P. 1972 Effect of plant age on inhibition of *Botrytis cinerea* spores by bacteria of beetroot leaves. *Physiological Plant Pathology*, 2:143-152.
- BLAKEMAN, J.P. 1985. Ecological succession of leaf surface microorganisms in relation to biological control. *In* C.E. Windels and S.E. Lindow, eds. Biological control of the phylloplane. St. Paul, Minnesota, APS. p 6-30.

- BLAKEMAN, J.P. 1993. Pathogens in the foliar environment. *Plant Pathology*, 42:479-493.
- ; BRODIE, I.D. 1976. Inhibition of pathogens by epiphytic bacteria on aerial plant surfaces. *In* Dickinson, C.H.; Preece, T.F., eds. *Microbiology of aerial plant surfaces*. London, Academic Press. p. 530-557.
- ; BRODIE, I.D. 1977. Competition for nutrients between epiphytic microorganisms and germination of spores of plant pathogens on beetroot leaves. *Physiological Plant Pathology*, 10:29-42.
- ; FOKKEMA, N.J. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annual Review of Phytopathology*, 20:167-192.
- BOL, J.; LINTHORST, H.; CORNELISSEN, B. 1990. Plant pathogenesis-related proteins induced by virus infection. *Annual Review of Phytopathology*, 28:113-138.
- BOLLER, T.; GEHRI, A.; MAUCH, F.; VÖGELI, U. 1983. Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties, and possible function. *Planta* 157:22-31.
- BORA, L.; GANGOPADHYAY, S.; CHAND, J. 1993. Biological control of bacterial leaf spot (*Xanthomonas campestris* pv. *vignaeradiatae* Dye) of mung bean with phylloplane antagonists. *Indian Journal of Mycology and Plant Pathology*, 23(2): 162-168.
- BOWLES, D.; GURR, S.; SCOLLAN, C.; ATKINSON, H.; HAMMOND-KOSACK, K. 1991. Local and systemic changes in plant gene expression following root infection by cyst nematodes. *In* Smith, C.J. ed. *Biochemistry and molecular biology of plant-pathogen interactions*. Oxford, Clarendon Press. p. 225-236.
- BRAVO, N.; VICTORIA, J. 1981. Posibilidades del control biológico de la moniliasis (*Moniliophthora roreri* Evans) del cacao. *Acta Agronómica (Col.)* 31(1/4):133-141.
- BRODIE, I.D.; BLAKEMAN, J.P. 1976. Competition for exogenous substrates *in vitro* by leaf surface micro-organisms and germination of conidia of *Botrytis cinerea*. *Physiological Plant Pathology*, 9: 227-239.
- BROEKAERT, W.; PARIJS, J.; ALLEN, A.; PEUMANS, W. 1988. Comparison of some molecular, enzymatic and antifungal properties of chitinases from thorn-apple, tobacco and wheat. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 33:319-331.
- BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.E. 1974. *Bergey's manual of determinative bacteriology* 8 ed. Baltimore, USA, Williams and Wilkins Co. 1246 p.
- BUREAU, E.; MARIN, D.; GUZMAN, J.A. 1992. El sistema de preaviso para el combate de la sigatoka negra en plátano y banano. Panamá, UPEB. 40 p.
- BUSTAMANTE, M.; LOPEZ, S. 1982. La sigatoka negra del plátano (*Musa* AAA y AAB) y su impacto económico en Centroamérica y sureste de México. México, SARH. 54 p.

- CABRERA, G 1988 Relaciones hídricas de las plantas. Departamento de Botánica, Cátedra de Fisiología Vegetal Maracay, Venezuela, UCV 166 p.
- CALVO, S ; VARGAS, E. 1989 Efecto de diferentes adherentes y formulaciones de una bacteria parasítica en el combate del ojo de gallo *Mycena citricolor* (Berk & Curt) Sacc. en el cafeto. Turrialba (C R.) 39(3):328-334.
- CARRERA, C. 1955. Melaza de caña de azúcar en la alimentación de bovinos de leche y carne. Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 78 p.
- CERVANTES, I. 1995. Influencia de las condiciones meteorológicas sobre el comportamiento de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en plátano (*Musa AAB*). Tesis Ing. Agr. Turrialba, Costa Rica, UCR 70 p.
- CHET, I ; ZILBERSTEIN, Y ; HENIS Y 1973 Chemotaxis of *Pseudomonas lachrymans* to plant extracts and to water droplets collected from the leaf surfaces of resistant and susceptible plants. *Physiological Plant Pathology*, 3:473-479.
- CHET, I ; ORDENTLICH, A ; SHAPIRA, R ; OPPENHEIM, A. 1990. Mechanisms of biocontrol of soil-borne plant pathogens by rhizobacteria. *Plant and soil*, 129:85-92.
- COLLINS, C.H. 1969. Métodos microbiológicos. Zaragoza, España. ACRIBIA. 410 p.
- COOK, R.J ; BAKER, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. Saint Paul, Minnesota, APS. 539 p.
- COOK, R.J. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 31:53-80.
- CORPORACION BANANERA NACIONAL. 1993. Sigatoka negra: un grave problema en los bananales de Costa Rica. Carta Informativa CORBANA (C R.) no. 9:1-2.
- DAUGROIS, J.; LAFITTE, C ; BARTHE, J.; TOUZE, A. 1990. Induction of β -1,3 glucanase and chitinase activity in compatible and incompatible interactions between *Colletotrichum lindemuthianum* and bean cultivars. *J. Phytopath.* 130:225-234.
- DAVIS, R.F.; BACKMAN, P.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; KOKALIS-BURELLE, N. 1992. Biological control of apple fruit disease by *Chaetoemium globosum* formulations containing cellulose. *Biological Control (USA)* no. 2:118-123.
- DEAN, R.; KUC, J. 1987. Immunization against disease: the plants fights backs. *In* Pegg, P.; Ayres, P.G. eds. *Fungal infections of plants*. Cambridge, U.K., Cambridge Univ Press. p. 383-410.
- DICKINSON, C.; WALLACE, B. 1976. Effects of late applications of foliar fungicides on activity of microorganisms on winter wheat flag leaves. *Transactions of the British Mycological Society*, 76:102-112.

- DIRECCION GENERAL DE EDUCACION EN TECNOLOGIA AGROPECUARIA. 1978. Elaboración de productos agrícolas. México, DGETA-Industrias rurales. SMEA-102. 137 p.
- DU MONTCEL, H ; HUGON, R. 1994. Amelioration genetique des bananiers cultives pour les consommations locales et pour l'exportation en vue de la resistance aux cercosporioses. Rapport Scientifique d'Avancement no 2. France. p. 122-131.
- EDGINTON, L ; KHEW, K ; BARRON, G. 1971. Fungi toxic spectrum of benzimidazole compounds. *Phytopathology*, 61:42-44.
- EL GHAOUTH, A ; WILSON, C ; WISNIEWSKI, M. 1995. Sugar analogs as potential fungicides for postharvest pathogens of apple and peach. *Plant Disease* 79(3):254-258.
- EL GHAOUTH, A ; ARUL, J. 1992. Potential use of chitosan in postharvest preservation of fresh fruits and vegetables. In Proc Int Symp Physiol. Basis Postharvest Technol. University of California, Davis, USA. p 50.
- EMMETT, R ; PARBERY, D. 1975. Appressoria. *Annual Review of Phytopathology*, 13:147-167.
- FOKKEMA, N.J. 1981. Fungal leaf saprophytes, beneficial or detrimental? In Blakeman, J.P., ed. *Microbial ecology of the phylloplane*. Londres, Academic Press. 640 p.
- FOURE, E. 1985. Black leaf streak disease of bananas and plantains (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), study of the symptoms and stages of the disease in Gabon. Paris, France, IRFA.
- FOURE, E. 1990. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et des plantains a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, au Cameroun. Caracterisation de la resistance au champ de bananiers appartenant a deviers grups genetiques. *Fruits* 45(4):339-345.
- FRENCH, E.; HEBERT, T. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. San José, Costa Rica, IICA. 289 p.
- GAUHL, F. 1990. Epidemiología y ecología de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet) en plátano (*Musa* sp), en Costa Rica. Trad Jaime Espinosa. Panamá, INIBAP. 126 p.
- GONZALEZ, M. 1987. Enfermedades del cultivo del banano. San José, Costa Rica, UCR-ASBANA. 102 p.
- GONZALEZ, R. 1995. Efecto de microorganismos quitinolíticos en el desarrollo de la sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Tesis M Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 94 p.

- GRAHAM, J 1995 Effect of leaf wetness and shade on survival of *Xanthomonas campestris* pv. *citrumelo* on citrus leaves In APS Annual Meeting (August 12-16, Pittsburg, Pensilvania) APS Abstract: 542
- GRIFFIN, D.H. 1994. Fungal Physiology 2 ed. New York, USA, Wiley-Liss 458 p
- GRIMONT, P.A.; GRIMONT, F. 1978 The genus *Serratia* Annu Rev Microbiol. 32:221-248
- HADDAD, O.; BOSQUE, M.; OSORIO, J.; CHAVEZ, L. 1992 Sigatoka negra: medidas de prevención y control FONAIAP Divulga (Ven.) no 40:44-45.
- HAMMERSCHMIDT, R.; KUC, J. 1995. Induced resistance to disease in plants. Netherlands, Kluwer Academic 182 p
- HEROLD, A.; LEWIS, D. 1977 Mannose and green plants: occurrence, physiology and metabolism, and use as a tool to study the role of orthophosphate New Phytologist 79:1-40
- HERRERA, W. 1989. Fertilidad actual de los suelos cultivados de banano (*Musa AAA*) en la zona Atlántica de Costa Rica. In Reunión ACORBAT (9., 1989, Mérida, Venezuela) San José, Costa Rica, CATIE Boletín técnico 121
- HIGA, T.; WIDIDANA, G. 1991 The concept and theories of Effective Microorganisms. In Parr, J.F.; Hornick, S.B. and C.E. Whitman eds. International Conference on Kyusei Nature farming (1., 1991) Washington, USA, USDA. p 118-124
- HIRANO, S.; NAGAO, N. 1989. Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on the growth of several phytopathogens Agric. Biol. Chem. (Jap) 53(11): 3065-3066
- HOBBELINK, H. 1994 La biotecnología y la agricultura en la perspectiva mundial. Biodiversidad (Esp) no 1:9-12
- INSTITUTO NACIONAL DE NUTRICION 1959 Tabla de composición de alimentos colombianos. Bogotá, Colombia, INN. 79 p
- JACKSON, T.; PEARSON, J.; CALLAGHAN, M.; TOWNSEND, R.; YOUNG, S.; GLARE, T.; GARNHAM, M.; WILLOCKS, M.; MAHANTY, H. 1993. Development of Invade™, a bacterial product for control of grass grub (*Costelytra zealandica*) in New Zealand pastures. In S.A. Corey, D.J. Dall and W.M. Milne (eds.) Pest control and sustainable agriculture. Australia, CSIRO p. 259-260.
- JACKSON, T.; PEARSON, J.; STUCKI, G.; 1986. Control of the grass grub *Costelytra zealandica* (White) (Coleoptera: Scarabidae), by application of the bacteria *Serratia* spp. causing honey disease. Bulletin of Entomological Research 76:69-76
- JACOBSEN, B.; BACKMAN, P. 1993. Biological and cultural plant disease controls: alternatives and supplements to chemicals in IPM systems. Plant Disease, 77(3):311-315.

- JIMENEZ, J.; ACOSTA, N.; FERNANDEZ, R. 1989. Efecto de insecticidas y fungicidas sobre la actividad biológica de preparaciones de *Bacillus thuringiensis*. Ciencia y Técnica en la Agricultura (Cuba) 12(1):45-5.
- JIMENEZ, J.; GALINDO, J.; RAMIREZ, C. 1985. Estudios sobre combate biológico de *Mycosphaerella fijiensis* var *difformis* mediante bacterias epifitas. In Reunión ACORBAT (7., 1985, San José, Costa Rica). Memorias. Turrialba, Costa Rica, CATIE. Serie técnica, Boletín técnico no. 121. 503 p.
- JIMENEZ, T. 1972. Génesis, clasificación y capacidad de uso de algunos suelos de la región Atlántica de Costa Rica. Tesis Ing Agr. San José, Costa Rica, UCR. 180 p.
- JOHNSON, K. 1994. Dose-response relationships and inundative biological control. Phytopathology, 84(8):780-784.
- JOOSTEN, M.; DE WIT, O. 1989. Identification of several pathogenesis related-proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* as 1,3- β glucanases and chitinases. Plant Physiology, 89:945-951.
- JOSHI, R.; CADAPAN, E.; HEINRICHS, E. 1987. Natural enemies of rice folder, *Cnapahlocrocis medinalis* Guenee (Pyralidae: Lepidoptera), a critical review (1913-1983). Agricultural Reviews (Philippines) 8(1):22-34.
- KASKA, M. 1976. The toxicity of extracellular proteases of the bacterium *Serratia marcescens* for larvae of greater wax moth, *Galleria mellonella*. J. Invertebr. Pathol. 27:271.
- KOKALIS-BURELLE, N.; BACKMAN, D.; RODRIGUEZ-KABANA, R.; PLOPER, L. 1992. Potential for biological control of early leafspot of peanut using *Bacillus cereus* and chitin as foliar amendments. Biological Control (USA) no. 2:321-328.
- KUC, J. 1981. Multiple mechanisms, reaction rates, and induced resistance in plants. In Staples R.C.; Toeniessen G.H. eds. Plant Disease Control. New York, John Wiley. p. 259-272.
- KUC, J. 1982. Induced immunity to plant disease. BioScience 32(11):854-860.
- KUMAR, R.; GUPTA, J. 1976. Variations in amino acid and organic acid contents in the leaf leachates of potato varieties. Indian Phytopathology (Abstr.) 29:106.
- LARA Y LARA, P. 1977. Diferentes niveles de melaza y urea en el ensilaje de caña de azúcar (*Saccharum officinarum* L.). Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 72 p.
- LINDOW, S.E. 1988. Lack of correlation between in vitro antibiosis with antagonism of ice nucleation active bacteria on leaf surfaces by non-ice nucleation active bacteria. Phytopathology, 78:444-450.
- LINGAPPA, Y.; LOCKWOOD, J. 1962. Chitin media for selective isolation and culture of actinomycetes. Phytopathology, 52: 317-323.

- LINHORST, H J 1991 Pathogenesis-related proteins of plants Crit Rev Plant Sci, 10:123-150.
- LOPEZ, C 1983 Diagnóstico del estado nutricional de plantaciones bananeras ASBANA (C R) 6(19): 13-16.
- LOPEZ, A.; ESPINOSA, J 1995 Manual de nutrición y fertilización del banano Quito, Ecuador, INPOFOS-CORBANA 82 p
- LOPEZ, A.; SOLIS, P. 1991. Contenidos e interacciones de los nutrimentos en tres zonas bananeras de Costa Rica CORBANA (C R) 15(36):25-33
- LORITO, M.; HARMAN, G.; HAYES, C.; BROADWAY, R.; TRONSMO, S.; WOO, S.; DI PIETRO, A 1993. Chitinolytic enzymes produced by *Trichoderma harzianum* antifungal activity of purified endochitinase and chitobiosidase Phytopathology, 83(3):302-307.
- LORITO, M.; HAYES, C.; DI PIETRO, A.; WOO, S.; HARMAN, G 1994. Purification, characterization, and synergistic activity of a glucan 1,3- β -glucosidase and an N-acetyl- β -glucosaminidase for *Trichoderma harzianum* Phytopathology, 84(4):398-405.
- LYSENKO, O 1976. Chitinase of *Serratia marcescens* and its toxicity to insects. J. Invertebr. Pathol. 27:385-386.
- MAISS, E. 1987 Use of resistance induction through culture filtrates of *Stachybotrys chartarum* (Ehrenb ex Link) Hughes and *Bacillus subtilis* (Ehrenburg) Cohn against virus diseases under commercial conditions of crop production. Archiv für Phytopathologie und pflanzenschutz, 4:275-283.
- MARIN, D.; ROMERO C.; R. 1993 El combate de la sigatoka negra Boletín no. 4 San José, Costa Rica, CORBANA. 22 p.
- MAUCH, F.; MAUCH-MANI, B.; BOLLER, T. 1988. Antifungal hydrolases in pea tissue II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β -1,3 glucanase. Plant Physiology, 88:936-942.
- MEREDITH, D.; LAWRENCE, J. 1969. Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. Transactions of the British Mycological Society, 52(3):459-476.
- MEREDITH, D.S; LAWRENCE, J.; FIRMAN, D. 1973. Ascospores release and dispersal in black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*). Transactions of the British Mycological Society, 60(3):547-554.
- MITCHELL, R.; ALEXANDER, M. 1961. The mycolytic phenomenon and biological control of *Fusarium* in soil. Nature, 190:109-110.

- MOLANO, J ; POLACHECK, I; DURAN, A ; CABIB, E. 1979 An endochitanase from weath germ Journal Biol Chem , 254:4901-4907 .
- MORGAN, J ; TUKEY, H. 1964. Characterization of leachate from plant foliage. Plant Physiology, 39:590-593
- MORRIS, C.E ; ROUSE, D.I. 1985 Role of nutrients in regulating epiphytic bacterial populations *In* Windels, C.E ; Lindow, S.E , eds Biological control of the phylloplane St. Paul, Minnesota, APS p. 63-82
- MORRISON, F.B. 1991. Compendio de alimentación del ganado México, Limusa 721 p
- MOURICHON, X. 1994. *Mycosphaerella fijiensis*: diversity and possibilities
- OKUMOTO, S ; BUSTAMANTE, E. 1993a Efecto de enmiendas foliares sobre el desarrollo del tizón temprano causado por *Alternaria solani* y sobre la población bacteriana en tomate (*Lycopersicon esculentum* MILL). Manejo Integrado de Plagas (C.R.) no 28:1-6
- OKUMOTO, S ; BUSTAMANTE, E. 1993b Selección *in vitro* de bacterias antagónicas a *Alternaria solani* Manejo Integrado de Plagas (C.R.) no 28:7-10
- ORDENTLICH, A.; ELAD, Y ; CHET, I. 1987 Rhizosphere colonization by *Serratia marcescens* for the control of *Sclerotium rolfsii* Soil Biology and Biochemistry, 19(6):747-751.
- ORDENTLICH, A.; ELAD, T ; CHET, I. 1988 The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii* Phytopathology, 78:84-88
- ORGANIZACION DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA AGRICULTURA Y LA ALIMENTACION 1955. Tablas de composición de alimentos (minerales y vitaminas). Roma, Italia, FAO. Estudios FAO sobre nutrición no. 11. 118 p
- 1972. La leche y los productos lácteos en la nutrición humana. Roma, Italia, FAO. Estudios FAO sobre nutrición no. 27. 80 p
- 1980. Los carbohidratos en la nutrición humana. Roma, Italia, FAO. Estudios FAO: alimentación y nutrición no. 15. 105 p
- PARDO, J. 1984. El cultivo del banano. San José, Costa Rica, EUNED. Serie Cultivos Mayores no. 7. 74 p.
- PASBERG-GAUHL, C. 1991. Symptom development of black sigatoka leaf spot on young or adult banana and plantain plants after natural inoculation. *In* C.S. Gold and B. Gemmill eds. Biological and integrated control of highland bananas and plantain pest and diseases. (12-14 Nov., 1991, Cotonou, Benin) Proceedings. Ibadah, Nigeria, IITA. 454 p.

- PLOPER, L.; BACKMAN, P.; CUNNINGHAM, S.; MARTIN, M. 1991. Effect of chitin amendments and added chitinolytic microorganisms and foliar disease of tomato. *In* APS Annual Meeting (1991, Saint Luis) Missouri, USA, APS
- PONS, N. 1989. Taxonomy of *Cercospora* and related genera. *In* Sigatoka leaf spot diseases of bananas (1989, San José, Costa Rica) Proceedings Eds R H Stover; R.A Fullerton. San José, Costa Rica, INIBAP 374 p
- RASMUSSEN, U.; BOJSEN, K.; COLLINGE, D. 1992a Cloning and characterization of chitinase enzymes from healthy and *Verticillium albo-atrum*-infected tomato plants and from *V. albo-atrum* Physiological Plant Pathology, 21:389-409.
- RASMUSSEN, U.; GIESE, H.; MIKKELSEN, J. 1992b Induction and purification of chitinase in *Brassica napus* L spp *oleifera* infected with *Phoma lingam* Planta 187:328-334
- REID, J.; OGRYDZIAK, D. 1981. Chitinase-overproducing mutant of *Serratia marcescens*. Applied and Environmental Microbiology, 41(3):664-669
- RIVERA, J. 1992. Interferencia de *Bacillus thuringiensis* y quitina en el sistema café-Hemileia vastratrix Berk & Br. Tesis M Sc Turrialba, Costa Rica, CATIE 60 p.
- RODRIGUEZ, L. 1995. Antagonismo endofítico de microorganismos a *Mycosphaerella fijiensis* en plátano y *Alternaria solani* en tomate. Tesis M Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. (en prensa)
- ROGER, G.; BLAKEMAN, J.P. 1984 Microbial colonization and uptake of ¹⁴C label on leaf of sycamore. Transactions of the British Mycological Society, 82:45-51.
- ROWE, P.; ROSALES, F. 1994. Musa Breeding at FHIA. *In* Global Conference of the International Musa Testing Program (1., 27-30 April, Honduras). Proceedings. Ed D.R. Jones. Montpellier, France, INIBAP. p. 117-129.
- SAIKIA, P.; CHOWDHURY, H. 1993. Phylloplane microflora for the control of bacterial leaf blight of rice caused by *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. Indian Phytopathology, 46(3):218-223.
- SAUMA, J. 1995. CORBANA preocupada por baja productividad bananera del país La República. San José, Costa Rica. 23 de marzo. p 5C
- SCHMIDT, D. 1988. Prevention of bacterial wilt of grasses by phylloplane bacteria. Journal of Phytopathology, 122:253-260.
- SINHA, A.; CHOWDHURY, A.; DAS, A. 1993. Chitosan induces resistance in crop plants against their fungal pathogens. Indian Phytopathology, 46(4):411-414.
- SOTO, M. 1985. Bananos, cultivo y comercialización. San José, Costa Rica, UCR. 648 p.

- SOUTHWOOD, T R 1978 Ecological methods 2 ed London, U K , Chapman and Hall 524 p.
- STARR, M ; GRIMONT, P ; GRIMONT, F ; STARR, P 1976 Caprylate-tallous agar medium for selectively isolating *Serratia* and its utility in the clinical laboratory Journal of Clinical Microbiology, 4(3):270-276
- STARR, M ; STOLP, H ; TRUPER, A ; SCHLEGEL, H 1981. The prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Vol. 2 New York, USA, Springer-Verlag. 388 p
- STEEL, R ; TORRIE, J 1985. Bioestadística: principios y procedimientos 2. ed México, McGraw Hill. 300 p
- STEPHENSON, M. 1949 Bacterial metabolism New York, USA, The MIT Press 398 p
- STOVER, R H. 1971. A proposed international scale for estimating intensity of banana leaf spot Tropical Agriculture, 48:185-186.
- 1978 Distribution and probable origin of *Mycosphaerella fijiensis* in southeast Asia. Tropical Agriculture, 55(1):65-69.
- 1987 Producción de plátano en presencia de sigatoka negra. Informe mensual UPEB (Pan.) no. 82:50-56
- ; DICKSON, J D. 1976 Banana leaf spot caused by *Mycosphaerella musicola* and *M. fijiensis* var *difformis*: A comparison of the first central american epidemics FAO Plant Prot. Bull , 24:36-42
- ; FULLERTON, R A. 1989. Sigatoka leaf spots of bananas. San José, Costa Rica, INIBAP. 373 p.
- SWINBURNE, T.R. 1976. Stimulants of germination and appressoria formation by *Colletotrichum musae* (Berk & Curt) Arx. in banana leachate Phytopath Z 87:74-90
- TOMASHOW, L ; WELLER, D. 1988. Role of a phenazine antibiotic from *Pseudomonas fluorescens* in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* Journal of Bacteriology, 170:3499-3508.
- TROUGHT, T ; JACKSON, T ; FRENCH, R. 1982. Incidence and transmission of a disease of grass grub (*Costelytra zealandica*) in Canterbur New Zealand Journal of Experimental Agriculture, 10:79-82.
- WHITTAKER, R.H. 1969. New concepts of kingdoms of organisms. Science, 103:150-160.
- WILSON, C ; EL GHAOUTH, A ; CHALUTZ, E ; DROBY, S ; STEVENS, C ; LU, Y ; KHAN, V ; ARUL, J. 1994. Potential of induced resistance to control postharvest diseases of fruits and vegetables. Plant Disease 78(9):837-844.

- WINDELS, E.; LINDOW, S. 1985. Biological control on the phylloplane. St Paul, Minnesota, APS. 169 p
- YARWOOD, C.E. 1973. Some principles in plant pathology II. *Phytopathology*: 1245-1246
- ZAVALETA-MEJIA, E.; VAN GUNDY, S. 1989a. Effect of the bacterium *Serratia marcescens* Bizio on *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood. *Revista Mexicana de Fitopatología* 7(2):178-187
- ZAVALETA-MEJIA, E.; VAN GUNDY, S. 1989b. Volatile toxicity of *Serratia marcescens* Bizio and other bacteria on the root-knot *Meloidogyne incognita* (Kofoid and White) Chitwood. *Revista Mexicana de Fitopatología* 7(2):188-194

A N E X O S

Anexo 1. Composición química total aproximada de los sustratos utilizados en los ensayos.

Componente	Leche íntegra	Leche descrem.	Melaza	Almidón de yuca
Proteínas	26%	8,3 g*	0-3%	0,1-0,2%
Grasas	26%	0,3 g*	0,1%	0,1%
Carbohidratos	37,5%**	13,5 g*	50-70%	88-90%
Mat. mineral	6,5%	----	----	0,3%

* Contenidos en 250 mL

**Principalmente lactosa

Anexo 2. Composición de minerales aproximada de los sustratos utilizados.

Componente	Leche íntegra	Leche descrem.	Melaza	Almidón de yuca
Calcio*	921	313**	527	50
Fósforo*	772	246**	165	15
Potasio	----	----	----	----
Sodio	----	----	----	----
Cloro	----	----	----	----
Azufre	----	----	----	----
Magnesio	----	----	----	----
Hierro*	0,8	0,3	22,5	5
Manganeso	----	----	----	----
Cobre	----	----	----	----

* mg en 100 g

**mg en 250 mL

FUENTE: INN, 1959, Tabla de composición de alimentos colombianos; FAO, 1995, Tabla de composición de alimentos; FAO, 1972, La leche y los productos lácteos en la nutrición humana; Woo-Tsuen Wu, 1960, Tabla de composición de alimentos para uso en América latina; FAO, 1979, Los carbohidratos en la nutrición humana; Cooperativa de productores de leche R L, Costa Rica.

Anexo 3. Composición de vitaminas aproximada de los sustratos utilizados

Componente	Leche integral	Leche descrem	Melaza	Almidón de yuca
Caroteno(mg/lb)	-----	-----	-----	-----
Riboflavina	1,4 ¹	0,4 ³	0,15 ⁴	-----
Niacina	0,6 ¹	0,2 ³	1,7 ⁴	0,1 ⁴
Vitamina A	2907UI ²	250 ⁴		
Vitamina D	200UI ²	1,25 ⁴		
Vitamina C		12,5 ³		
Complejo B				
Tiamina	0,2 ¹	0,1 ³	0,04 ⁴	
Biotina				
Colina				
Ac fólico				
Piridoxina				

² UI / 100 g

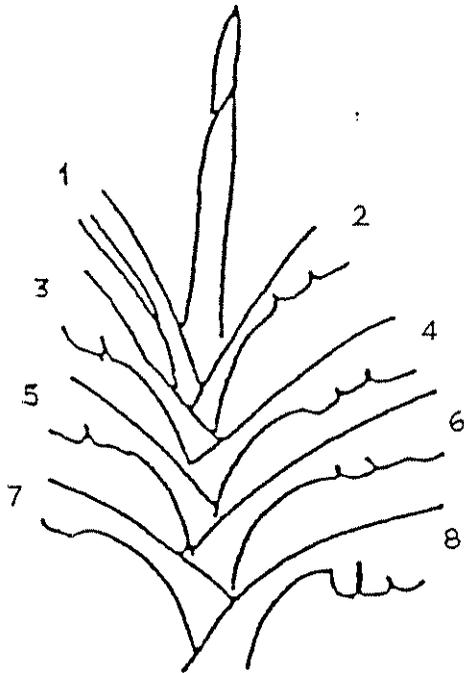
¹ mg / 100 g

³ mg / 250 mL

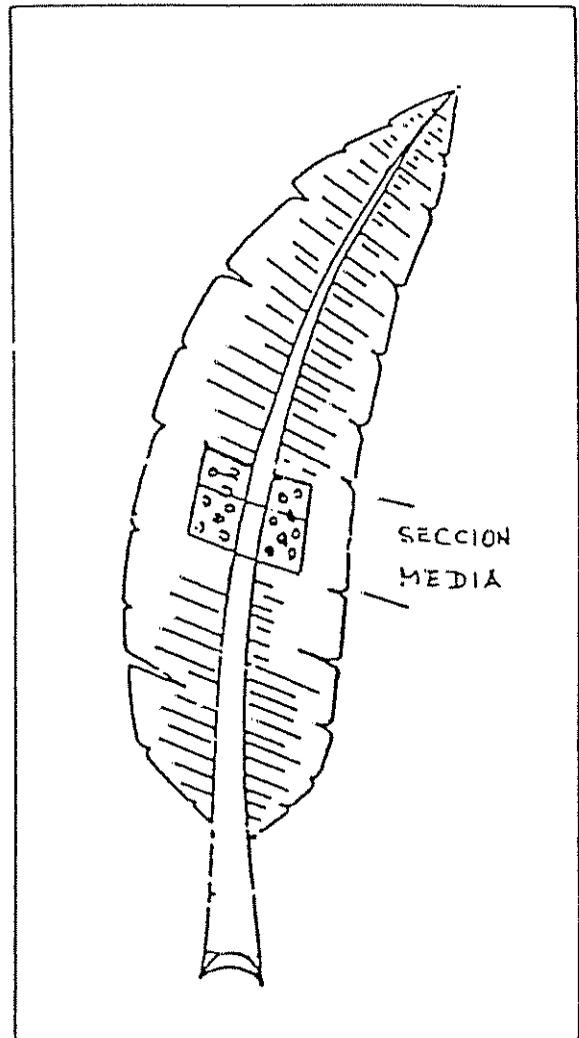
⁴ microgramos / 250 mL

FUENTE: VER ANEXOS 1 y 2.

Anexo 4. Diagrama del muestreo efectuado para la obtención del extracto de la superficie de la hoja de banano con los exudados.

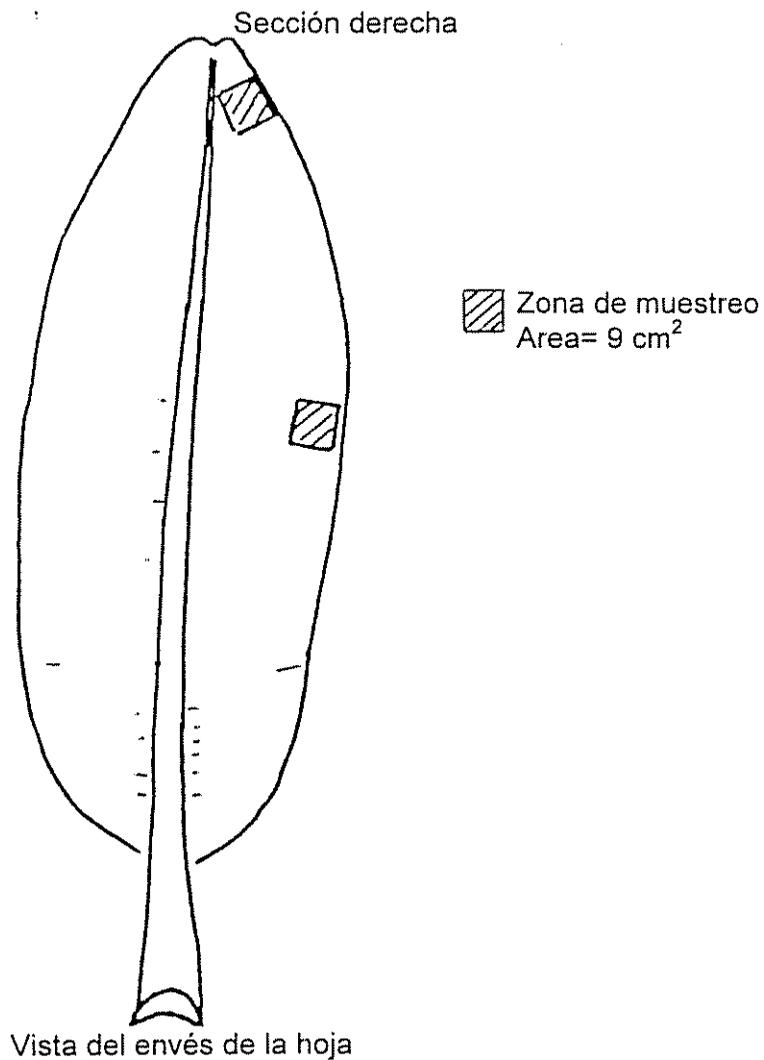


Conteo de hojas en la planta adulta

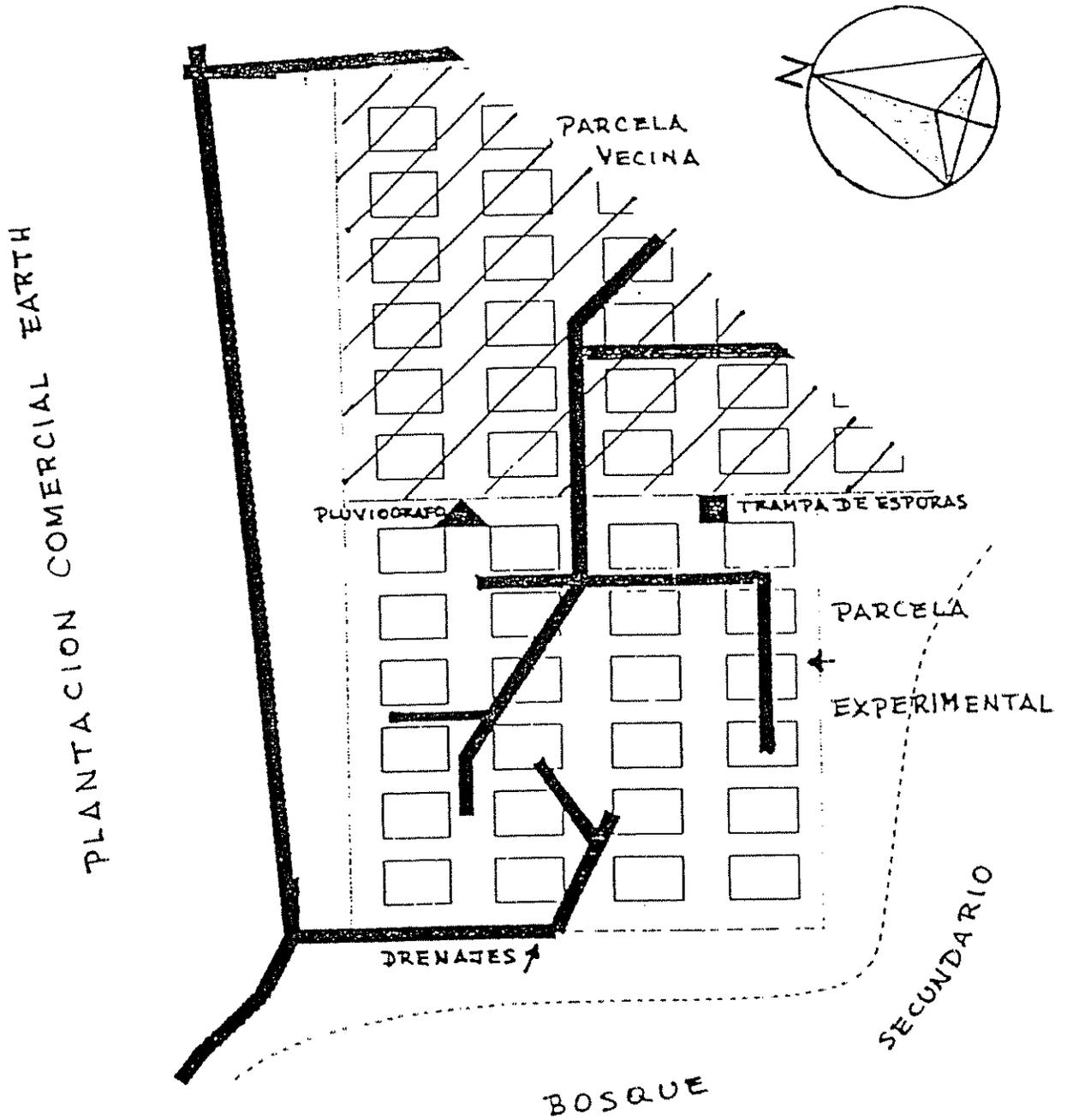


Sección de la hoja 4 y zona de muestreo

Anexo 5. Diagrama de muestreo de las hojas de banano para determinar el número de estrías totales de sigatoka negra.



Anexo 6. Croquis de la localización de la parcela de campo en EARTH, Guácimo, Costa Rica.



Anexo 7. Cálculos para estimar la concentración semanal de esporas de *M. fijiensis* utilizando la trampa volumétrica de esporas.

Diámetro del campo óptico en microscopio a 200 aumentos = 1,0 mm

Area del campo óptico = $(3,14 \times 0,5^2) = 0,7854 \text{ mm}^2$

Area de muestreo (5 campos leídos) = $(0,7854 \text{ mm}^2 \times 5) = 3,927 \text{ mm}^2$

Area total (1día) = $48 \text{ mm} \times 14 \text{ mm} = 672 \text{ mm}^2$

Estimación de esporas por día = $672 \text{ mm}^2 \text{ día}^{-1} / 3,927 \text{ mm}^2 = 171 \text{ esporas día}^{-1}$

Velocidad de succión de la trampa = $0,6 \text{ m}^3 \text{ aire . hora}^{-1} \times 24 \text{ horas día}^{-1}$
 $= 14,4 \text{ m}^3 \text{ aire día}^{-1}$

Estimación de esporas por m³ de aire por día
 $= 171 \text{ esporas día}^{-1} / 14,4 \text{ m}^3 \text{ aire día}^{-1}$
 $= 11,88 \text{ esporas m}^{-3}$

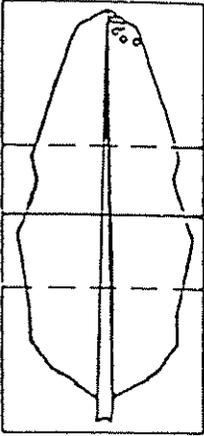
En los cinco campos ópticos, 1 espora contada representan 11,88 Para la cinta completa (área de 48 mm x 14 mm) = 14 campos ópticos

Factor de conversión = 5 campos leídos / 14 campos en total = 2,8

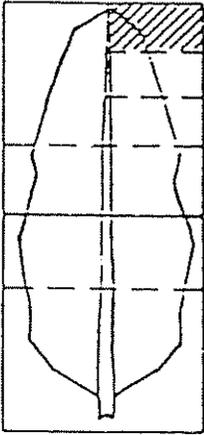
1 espora contada en la cinta (número de esporas en 5 campos leídos x 11,88 x 2,8) equivale a 33,264 esporas . m³ de aire día⁻¹

La concentración de ascosporas diaria registrada fue sumada hasta obtener la relativa a la semana de evaluación

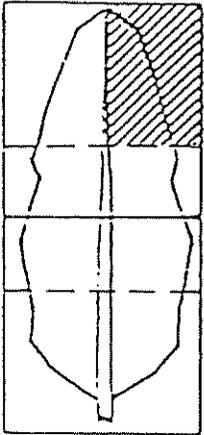
Anexo 8. Representación de los grados de área foliar afectada por la sigatoka negra en banano.



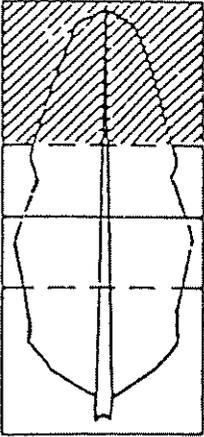
GRADO 1
(Hasta 10 manchas)



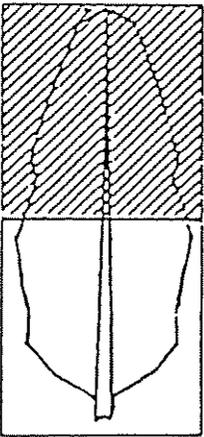
GRADO 2
(<5%)



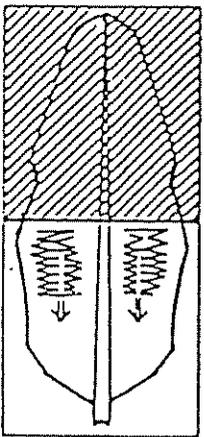
GRADO 3
(6-15%)



GRADO 4
(16-33%)



GRADO 5
(34-50%)



GRADO 6
(>50%)

Anexo 9. Resultados prueba de Dunnett del efecto de sustratos sobre *S. marcescens* R1.

Tratamiento	Significancia de diferencia con relación al testigo ¹
Extracto de hoja	**
Leche	**
Abono foliar	**
Melaza	**
Almidón de yuca	**
Leche+melaza	**
Leche+almidón	**
Abono+melaza	**
Abono+almidón	**

1 Testigo= agua destilada estéril (ADE)

** = significativo al 5%

ns= no significativo

Anexo 10. Resultados prueba de Dunnett del efecto de sustratos sobre *S. entomophila* A100.

Tratamiento	Significancia de diferencia con relación al testigo ¹
Extracto de hoja	**
Leche	**
Abono foliar	**
Melaza	**
Almidón de yuca	**
Leche+melaza	**
Leche+almidón	**
Abono+melaza	**
Abono+almidón	**

1 Testigo= agua destilada estéril (ADE)

** = significativo al 5%

ns= no significativo

Anexo 11. Resultados prueba de Dunnett del efecto de sustratos sobre *B. cereus* A30.

Tratamiento	Significancia de diferencia con relación al testigo ¹
Extracto de hoja	ns
Leche	**
Abono foliar	ns
Melaza	**
Almidón de yuca	**
Leche+melaza	**
Leche+almidón	**
Abono+melaza	**
Abono+almidón	ns

1 Testigo= agua destilada estéril (ADE)

** = significativo al 5%

ns= no significativo

Anexo 12. Resultados prueba de Dunnett del efecto de sustratos sobre habilidad quitinolítica de *S. marcescens* R1

Tratamiento	Significancia de diferencia con relación al testigo
Extracto de hoja	ns
Leche	ns
Abono foliar	ns
Melaza	ns
Almidón de yuca	**
Leche+melaza	ns
Leche+almidón	ns
Abono+melaza	**
Abono+almidón	**

1 Testigo= quitina al 0,2% (% p/v)

** = significativo al 5%

ns= no significativo

Anexo 13. Valores promedio y desviación de la densidad bacteriana de *S. marcescens* R1 recuperada de plantas en invernadero

Tratamiento	1er muestreo		2do muestreo	
	Prom.	Desv est	Prom.	Desv est
Testigo	0	0	----	----
R1	0	0	0	0
Quitina	0	0	----	----
Quitina+R1	0	0	----	----
Leche	0	0	0,11	0,19
Leche+R1	17	29,45	4,33	7,51
Melaza	6,67	6,65	1,11	1,19
Melaza+R1	32,23	27,96	13,44	22,99
Lec+mel	0,11	0,19	0	0
Lec+mel+R1	4,67	8,08	0	0

1 Testigo= quitina al 0,2% (% p/v)

** = significativo al 5%

ns= no significativo

Anexo 14. Resultados prueba de Dunnett del efecto de sustratos sobre la comunidad microbial en invernadero

Tratamiento	Significancia de diferencia con relación al testigo
R1	ns
Quitina	ns
Quitina+R1	ns
Leche	ns
Leche+R1	ns
Melaza	ns
Melaza+R1	**
Lec+mel	ns
Lec+mel+R1	ns

** = significativo al 5%

ns= no significativo

Anexo 15. Resultados prueba de Dunnett del efecto de sustratos sobre la sigatoka negra en plantas en casa de mallas

Tratamiento	Significancia de diferencia con relación al testigo
Fungicida	**
R1	ns
Quitina	ns
Quitina+R1	ns
Leche	ns
Leche+R1	ns
Melaza	ns
Melaza+R1	**
Lec+mel	ns
Lec+mel+R1	**

** = significativo al 5%

ns= no significativo

Anexo 16. Resultados prueba de Dunnett del efecto de sustratos sobre la sigatoka negra en plantas en macetas en campo

Tratamiento	Significancia de diferencia con relación al testigo
Fungicida	**
R1	ns
Quitina	ns
Quitina+R1	ns
Leche	ns
Leche+R1	ns
Melaza	ns
Melaza+R1	ns
Lec+mel	ns
Lec+mel+R1	ns

** = significativo al 5%

ns= no significativo

Anexo 17. Resultados prueba de Dunnett del efecto de sustratos sobre la sigatoka negra en plantación en campo.

Tratamiento	Significancia de diferencia con relación al testigo
Fungicida	**
Quitina	ns
Quitina+R1	ns
Melaza+R1	ns
Quitina+mel+R1	ns

** = significativo al 5%

ns= no significativo