



CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL
DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
ESCUELA DE POSGRADO

Efecto del biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos y
microorganismos benéficos sobre el desarrollo, productividad y
resistencia de las plantas, Turrialba, Costa Rica

por

Jérôme Henreaux

Tesis sometida a consideración de la Escuela de Posgrado
como requisito para optar por el grado de

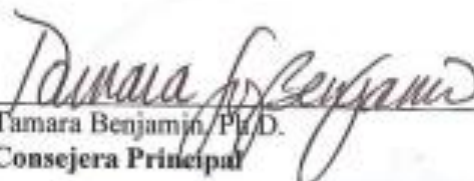
Magister Scientiae en Agricultura Ecológica

Turrialba, Costa Rica, 2012

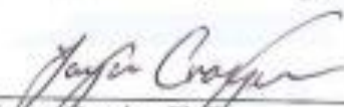
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por la División de Educación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del Estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE EN AGRICULTURA ECOLÓGICA

FIRMANTES:




Tamara Benjamín, Ph.D.
Consejera Principal




Jayne Crozier, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



Gabriela Soto, M.Sc.
Miembro Comité Consejero



Eduardo Hidalgo, M.Sc.
Miembro Comité Consejero



I. Miley González, Ph.D.
Decano de la Escuela de Posgrado



Jérôme Henreaux
Candidato

DEDICATORIA

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

A mi profesora consejera Tamara Benjamin, por su apoyo y motivación durante la realización de esta tesis, y sobre todo por su amistad y confianza.

A Jayne Crozier, Gabriela Soto y Eduardo Hidalgo, miembros del comité consejero, por todo el tiempo brindado, el conocimiento que me aportaron y los consejos para la elaboración y el buen desarrollo de la presente investigación.

Al proyecto MAP (Meso-American Agro-Environmental Project) para el financiamiento del proyecto MABIHO, en lo cual se incluyó la presente investigación.

A Sergio Vilchez, por sus acertados y valiosos consejos para el tratamiento estadístico de los datos.

A Claudio Arroyo, por su ayuda en la realización de la parcela experimental y su apoyo constante durante todo el año.

A Manrique Gonzalez por su apoyo logístico en los laboratorios.

Luis Quesada y los miembros del equipo de Mantenimiento del CATIE por su ayuda en la realización de la parcela.

A Lorena Torres, mi novia, por su apoyo, ayuda y consejos, durante estos dos años.

A mis amigos y compañeros del CATIE, por todos los buenos momentos compartidos, tanto al nivel académico y personal.

CONTENIDO

DEDICATORIA	II
AGRADECIMIENTOS	IV
CONTENIDO	V
RESUMEN	VIII
SUMMARY	X
ÍNDICE DE CUADROS	XI
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
LISTA DE UNIDADES, ABREVIATURAS Y SIGLAS	XIV
1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos del estudio	3
1.1.1 <i>Objetivo general</i>	3
1.1.2 <i>Objetivos específicos</i>	3
1.2 Hipótesis del estudio	3
2 MARCO CONCEPTUAL	4
2.1 Biocarbón.....	4
2.1.1 <i>Origen</i>	4
2.1.2 <i>Efecto del biocarbón sobre la fertilidad y estructura del suelo</i>	5
2.1.3 <i>Interacciones biocarbón- microorganismos</i>	6
2.1.4 <i>Los subproductos de pirólisis</i>	7
2.2 Los abonos orgánicos.....	8
2.3 Inducción de resistencia.....	9
2.3.1 <i>Aspectos generales</i>	9
2.3.2 <i>Los microorganismos antagonistas y promotores de crecimiento</i>	11
2.4 Tomate	13
2.4.1 <i>Enfermedades</i>	13

2.4.2	<i>La mosca blanca (Bemisia tabaci)</i>	14
2.5	Bibliografía	15
3	MATERIALES Y MÉTODOS	22
3.1.	Localización.....	22
3.2	Evaluación del crecimiento y de la producción de biomasa de plantas de tomate sometidas a la aplicación de biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos y microorganismos benéficos	22
3.2.1	<i>Material vegetativo y sustrato</i>	22
3.2.2	<i>Cultivo e inoculación de los microorganismos benéficos</i>	24
3.2.3	<i>Diseño experimental</i>	25
3.2.4	<i>VARIABLES EVALUADAS</i>	26
3.2.5	<i>Análisis de los datos</i>	26
3.3.	Efecto de la combinación de biocarbón con fertilizantes orgánicos y microorganismos benéficos sobre el comportamiento alimenticio de la mosca blanca (<i>Bemisia tabaci</i>).....	28
3.3.1.	<i>Material vegetativo, cría e infestación de mosca blanca</i>	28
3.3.2.	<i>VARIABLES EVALUADAS</i>	29
3.3.3.	<i>Análisis de datos</i>	29
3.4.	Inducción de resistencia sistémica y supresividad del biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos, fertilizantes sintéticos y microorganismos benéficos contra <i>Pseudomonas corrugata</i> en tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>).	31
3.4.1.	<i>Material vegetativo y sustratos</i>	31
3.4.2	<i>Cultivo de los microorganismos patógenos y benéficos</i>	32
3.4.3.	<i>Inoculación de los microorganismos fitopatógenos</i>	32
3.4.4.	<i>VARIABLES EVALUADAS</i>	33
3.4.5.	<i>Diseño experimental</i>	33
3.4.6.	<i>Análisis de los datos</i>	33
3.5	Experimento en campo: producción y resistencia contra enfermedades de plantas de pepino y tomate sometidas a la aplicación de biocarbón combinado con fertilizantes sintéticos, fertilizantes orgánicos y microorganismos benéficos	35
3.5.1.	<i>Material vegetativo, preparación de la parcela y sustratos</i>	35

3.5.2	<i>Diseño experimental</i>	36
3.5.3.	<i>Manejo de los cultivos</i>	37
3.5.4.	<i>VARIABLES EVALUADAS</i>	37
3.5.5.	<i>Análisis de los datos</i>	38
4	RESULTADOS	39
4.1.	Evaluación del crecimiento y de la producción de biomasa de plantas de tomate sometidas a la aplicación de biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos y microorganismos benéficos	39
4.2.	Efecto de la combinación de biocarbón con fertilizantes orgánicos y microorganismos benéficos sobre el comportamiento alimenticio de la mosca blanca (<i>Bemisia tabaci</i>).....	43
4.3	Inducción de resistencia sistémica y supresividad del biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos, fertilizantes sintéticos y microorganismos benéficos contra <i>Pseudomonas corrugata</i> en tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>)	46
4.4	Experimento en campo: producción y resistencia contra enfermedades de plantas de pepino y tomate sometidas a la aplicación de biocarbón combinado con fertilizantes sintéticos, fertilizantes orgánicos y microorganismos benéficos	49
4.4.1	<i>Producción de pepino</i>	49
2.4.2	<i>Actividad microbiana del suelo</i>	50
2.4.3	<i>Resistencia a la marchitez bacterial (<i>Pseudomonas syringae</i>)</i>	51
5	DISCUSIÓN	54
5.1	Evaluación del crecimiento y de la producción de biomasa de plantas de tomate sometidas a la aplicación de biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos y microorganismos benéficos	54
5.2	Efecto de la combinación de biocarbón con fertilizantes orgánicos y microorganismos benéficos sobre el comportamiento alimenticio de la mosca blanca (<i>Bemisia tabaci</i>).....	61
5.3	Inducción de resistencia sistémica del biocarbón combinados con fertilizantes orgánicos, fertilizantes sintéticos y microorganismos benéficos contra <i>Pseudomonas corrugata</i> en tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>).....	65
5.4	Experimento en campo: producción y resistencia contra enfermedades de plantas de pepino y tomate sometidas a la aplicación de biocarbón combinado con fertilizantes sintéticos, fertilizantes orgánicos y microorganismos benéficos	68
6	CONCLUSIONES	74
7	RECOMENDACIONES.....	75

8	BIBLIOGRAFÍA	77
	ANEXOS	88

RESUMEN

Este estudio evaluó el efecto de la aplicación de biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos (lombricompost y gallinaza) y microorganismos benéficos (*Bacillus subtilis* AB4410 y *Trichoderma harzianum* IMI 395248) sobre la productividad del pepino (*Cucumis sativus*) y las capacidades de desarrollo y de resistencia contra la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) y dos bacterias patógenas (*Ralstonia solanacearum* y *Pseudomonas corrugata*) en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*). Se encontraron interacciones entre el biocarbón y los microorganismos inoculados, que tuvieron impactos diversos sobre las plantas en función de los experimentos. La aplicación de biocarbón combinada con la inoculación de *B. subtilis* incrementó de un 13% el crecimiento de las plantas de tomate fertilizadas con lombricompost a lo largo de siete semanas de evaluación, y aumentó un 27% el peso seco de las plantas infectadas por *P. corrugata*. La inoculación con *T. harzianum* y su combinación con *B. subtilis* permitieron, en presencia de biocarbón, aumentar un 48% y 33% el peso seco de plantas de tomate fertilizadas con lombricompost. Se encontró una disminución significativa del número de moscas blancas con la aplicación de biocarbón en las plantas inoculadas con *B. subtilis* y su combinación con *T. harzianum*. La presencia de biocarbón en el suelo disminuyó significativamente la incidencia de *Ralstonia solanacearum* a lo largo del tiempo, con una mayor eficiencia en plantas fertilizadas con gallinaza. La co-inoculación con

T. harzianum y *B. subtilis* en plantas de pepino fertilizadas con gallinaza con biocarbón aumentó significativamente la producción de frutos, alcanzando una productividad estadísticamente igual a la fertilización sintética. La combinación de gallinaza con biocarbón fue particularmente eficiente y dio los mejores resultados de producción de biomasa en plantas de tomate infectadas por *P. corrugata*.

Palabras clave: biocarbón, fertilizantes orgánicos, gallinaza, lombricompost, control biológico, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, tomate, pepino, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas corrugata*, mosca blanca.

SUMMARY

This study evaluated the effects of biochar application combined with organic fertilizers (vermicompost and poultry manure) and beneficial microorganisms (*Trichoderma harzianum* IMI 395248 and *Bacillus subtilis* AB 4410) on the productivity of cucumber and the growth and resistance of tomato plants against whitefly (*Bemisia tabaci*) and two bacterial pathogens (*Ralstonia solanacearum* y *Pseudomonas corrugata*). Interactions between biochar and the inoculated microorganisms were found, showing different tendencies according to the experiment. Biochar combined with the inoculation of *B. subtilis* enhanced growth of tomato plants fertilized with vermicompost, with an average of 13% for the whole seven week experiment period, and increased the shoot dry weight of plants by 27% when challenged with *P. corrugata*. Inoculation of *T. harzianum* and combined inoculation of *T. harzianum* and *B. subtilis* showed an increase of 48 and 33% in shoot dry weight when biochar was added to soil. Decrease of the whitefly populations were observed in plants with biochar amended soil was inoculated with *B. subtilis*, and the effect was increased with the co-inoculation with both microorganisms. The addition of biochar amendments significantly decrease the incidence of disease caused by *R. solanacearum*, and the best results were found in plants fertilized with poultry manure. The combined inoculation of soil by *T. harzianum* and *B. subtilis* in cucumber plants fertilized with poultry manure and biochar increased fruits production significantly, showing results statistically similar to mineral fertilization. Plants fertilized with poultry manure showed a good response to the biochar amendment and significant stimulation of growth and biomass production.

Key words: biochar, organic fertilizers, poultry manure, vermicompost, biological control, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, tomato, cucumber, *Ralstonia solanacearum*, *Pseudomonas corrugata*, whitefly.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos utilizados en el experimento de crecimiento y producción de biomasa del tomate. Turrialba, Costa Rica, 2011.	23
Cuadro 2. Análisis químico del biocarbón y de los fertilizantes orgánicos empleados en el experimento de crecimiento y producción de biomasa del tomate. Turrialba, Costa Rica, 2011.	24
Cuadro 3. Presentación de los tratamientos evaluados en el experimento de inducción de resistencia sistémica y supresividad del biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos, sintético y microorganismos benéficos. Turrialba, Costa Rica.....	31
Cuadro 4. Descripción de los tratamientos utilizados en el experimento de evaluación en campo de la producción y resistencia contra enfermedades del pepino y tomate. Turrialba, Costa Rica, 2011.....	35
Cuadro 5. Promedio del número de ninfas contadas en tres discos circulares (3.3 cm de diámetro) de las hojas de plantas de tomate para los tratamientos evaluados. Las diferencias estadísticas (LSD, $p=0.05$) están representadas por letras distintas. Turrialba, Costa Rica, 2011.....	46
Cuadro 6. Severidad de la enfermedad causada por <i>P. corrugata</i> (necrosis medular) en plantas de tomate en presencia de biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos, fertilizantes sintéticos y microorganismos benéficos. Las diferencias estadísticas están simbolizadas por letras distintas. Turrialba, Costa Rica, 2011.....	48

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1: Disposición de las macetas en función del movimiento del sol (izquierda) y disposición de las macetas en las mesas (derecha) dentro del invernadero para el experimento de crecimiento y producción de biomasa del tomate. Turrialba, Costa Rica, 2011. 26
- Figura 2. Diseño del experimento de escogencia irrestricta representando cuatro círculos de macetas (cuatro bloques de 12 tratamientos), al centro de los cuales se ubicaron cuatro plantas de berenjena y una de tomate infestadas por moscas blancas. Turrialba, Costa Rica, 2011. 29
- Figura 3. Esquema del diseño experimental del experimento de campo, representando la parcela sembrada con plantas de tomate, donde cada tratamiento esta simbolizado por un color diferente. Turrialba, Costa Rica, 2011. 36
- Figura 4. Crecimiento promedio (expresado en porcentajes) en función de la semana después del trasplante (SDT) de las plantas de tomate sometidas a los diferentes tratamientos. Los gráficos comparan los testigos con y sin biocarbón (a); la gallinaza con y sin biocarbón (b); el lombricompost con y sin biocarbón (c); lombricompost + inoculación de *B. subtilis* con y sin biocarbón (d); lombricompost + inoculación de *T. harzianum* con y sin biocarbón (e); y lombricompost + combinación de *T. harzianum* y *B. subtilis* con y sin biocarbón (f). Letras distintas indican diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$). Turrialba, Costa Rica, 2011. 41
- Figura 5. Efecto del biocarbón sobre el peso seco (a) y el número de hojas (b) del tomate sometidas a los diferentes tratamientos. Las diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) están simbolizadas por letras distintas. Las barras de error representan los errores estandares. Turrialba, Costa Rica, 2011. 43
- Figura 6. Número promedio de adultos de *B. tabaco* posados en las plantas de tomate sometidas a la aplicación de biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos y microorganismos antagonistas 1 DDI (a), 2 DDI (b), 8 DDI (c) y 15 DDI (d). Las diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) están simbolizadas por letras diferentes. Las barras de errores representan los errores estándares. Turrialba, Costa Rica, 2011. 45
- Figura 7. Producción de biomasa foliar de plantas de tomates infectadas con *P. corrugata* en presencia de biocarbón combinado con fertilizantes minerales, orgánicos y microorganismos benéficos. Letras distintas representan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) y las barras de errores los errores estándares. Turrialba, Costa Rica, 2011. 47
- Figura 8. Producción de biomasa radicular de plantas de tomates infectadas con *P. corrugata* en presencia de biocarbón combinado con fertilizantes minerales, orgánicos y microorganismos benéficos. Letras distintas representan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) y las barras de errores los errores estándares. Turrialba, Costa Rica, 2011. 48
- Figura 9: Efecto del biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos, sintético y microorganismos benéficos sobre el rendimiento del pepino. Las diferencias estadísticas

($p \leq 0.05$) están simbolizadas por letras distintas y las barras de errores representan los errores estándares. Turrialba, Costa Rica, 2011. 50

Figura 10. Actividad microbiana de los sustratos con fertilizantes orgánicos, sintéticos y microorganismos benéficos en la parcela de producción de pepino. a) Biomasa microbiana; b) Amonificación anaeróbica; c) Respiración microbiana; d) Cociente metabólico. Turrialba, Costa Rica, 2011. 51

Figura 11. Incidencia de la marchitez bacterial en función de los días después del trasplante (DDT). Los gráficos ilustran el efecto del biocarbón en ausencia de fertilización (a), combinado con fertilización mineral (b) y con gallinaza y microorganismos benéficos (c). Las diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) están representadas con letras distintas. Las barras de errores representan los errores estándares. Turrialba, Costa Rica, 2011. 53

LISTA DE UNIDADES, ABREVIATURAS Y SIGLAS

CATIE: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza

CIA: Centro de Investigación Agronómica

CIC: Capacidad de Intercambio Catiónico

CICE: Capacidad de Intercambio Catiónico Efectiva

DDI: Días Después de la Infestación

DDT: Días Después del Trasplante

IRS: Inducción de Resistencia Sistemática

PDA: Potato Dextrose Agar

RSA: Resistencia Sistemática Adquirida

SDT: Semanas Después del Trasplante

UCR: Universidad de Costa Rica

1 INTRODUCCIÓN

El biocarbón, carbón vegetal producido por combustión de materia orgánica bajo condiciones de baja oxigenación, llamada pirólisis (Sohi *et al.* 2009), es objeto de mucha atención desde los últimos años. Sus propiedades, tanto a nivel de mitigación del cambio climático por la inmovilización del carbono como en el mejoramiento del suelo, han sido motivo de numerosas investigaciones.

Se ha demostrado que la aplicación de biocarbón a los suelos mejora la productividad de los cultivos y calidad de las plantas, efectos atribuidos a los aumentos de capacidad de intercambio catiónico (CIC), pH, cantidad de materia orgánica, retención de nutrientes, disminución de la lixiviación y el desarrollo y diversificación de las comunidades microbianas del suelo (Glaser *et al.* 2002; Lehmann *et al.* 2003; Steiner *et al.* 2004; Kolton *et al.* 2011). Sin embargo, pocos estudios se enfocaron en las capacidades de biocarbón para inducir resistencia en plantas contra plagas y enfermedades.

Elad *et al.* (2010) estudiaron el efecto de la aplicación de biocarbón sobre la inducción de resistencia sistémica de plantas de tomate y chile dulce contra dos patógenos fúngicos *Botrytis cinerea* y *Leveillula taurica* y a una ácaro (*Polyphagotarsonemus latus* Bank), y encontraron una disminución importante en la severidad de estas enfermedades y de los síntomas provocados por *P. latus*. Matsubara *et al.* (2002) observaron que la aplicación de biocarbón combinado a la inoculación de micorrizas arbusculares (*Glomus* sp.) indujeron una tolerancia creciente a *Fusarium oxysporum* en función de la cantidad de enmiendas utilizadas. Otros trabajos enfocados en los subproductos de la pirólisis (chikusaku-eki, mokusaku-eki o vinagre de madera) demostraron las propiedades de estos como fungicida, bactericida o repelente (Baimark y Niamsa 2009; Chalermisan y Peerapan 2009), mientras que los efectos de los butenolides y otros compuestos contenidos en el humo presentaron un efecto positivo marcado sobre la germinación y la producción de materia seca de diferentes plantas (Van Staden *et al.* 2006; Steiner *et al.* 2008a; Light *et al.* 2009).

Con base en las investigaciones descritas anteriormente, se puede hipotetizar que el biocarbón pueda inducir resistencia, tolerancia o supresividad por diferentes mecanismos tales como: (1) una mayor retención y distribución de nutrientes a las plantas (2) una estimulación poblaciones microbianas del suelo que inducen mayor resistencia, y (3) el efecto fungicida, bactericida y repelente de los compuestos resultando de la pirólisis.

En adición a su papel en la inducción de defensas, los microorganismos pueden acelerar la activación del biocarbón. Este material generalmente no induce cambios en el cultivo directamente después de su aplicación, pero requiere un tiempo de activación de algunos meses a unos años

(Steiner *et al.* 2007, Cheng y Lehmann 2009). En cambio, la *Terra Preta*, anthrosol que contiene grandes cantidades de carbón que fue encontrado en sitios donde vivieron importantes poblaciones precolombinas, tiene un efecto marcado y directo sobre las plantas, resultado de cientos de años de formación y evolución dando suelos ricos en materia orgánica, nutrientes y microorganismos (Glaser *et al.* 2001, Lehmann 2009). Kim *et al.* (2007) encontraron en este tipo de suelo 25% más especies de bacterias que en un suelo de bosque primario cercano, haciendo hincapié al papel de la diversidad y cantidad de microorganismos en las calidades de estos suelos. En base a esto se puede hipotetizar que los microorganismos tienen un papel importante en la activación del biocarbón.

Esta investigación propuso evaluar la capacidad de crecimiento y de resistencia contra plagas y enfermedades de plantas (tomate y pepino) sometidas a la aplicación de biocarbón en asociación con diferentes tipos de abono (gallinaza, lombricompost y fertilizante mineral) y microorganismos (*Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis* y la combinación de las dos especies). El estudio fue conformado por cuatro experimentos (los tres primeros en potes bajo invernadero y el cuarto en una parcela experimental): en el primero, se evaluó el crecimiento y producción de biomasa de plantas de tomate sometidas a 12 tratamientos: gallinaza sin y con biocarbón (G y GB), lombricompost sin y con biocarbón (L y LB), lombricompost + *Bacillus subtilis* sin y con biocarbón (S y SB), lombricompost + *Trichoderma harzianum* sin y con biocarbón (TR y TRB), lombricompost + *B. subtilis* y *T. harzianum* sin y con biocarbón (TRS y TRSB) y los testigos a los cuales no se aplicó ningún fertilizante sin y con biocarbón (T y B); en el segundo, se estudio el comportamiento alimenticio de la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) expuestas a plantas sometidas a los mismos tratamientos que en el primer experimento; en el tercero, el efecto de 14 tratamientos (los mismos tratamientos que el experimento anterior, a los cuales se añadió dos tratamientos con fertilización mineral, sin y con biocarbón¹) sobre plantas de tomate expuestas a la inoculación de la bacteria patógena *Pseudomonas corrugata* (agente causante de la necrosis medular) fue investigada; y en el cuarto experimento, se estudió el efecto de siete tratamientos (testigo, suelo + biocarbón, fertilización mineral con y sin biocarbón, gallinaza con y sin biocarbón, gallinaza + biocarbón + *T. harzianum* + *B. subtilis*) sobre la productividad del pepino y la resistencia del tomate a la marchitez bacterial (*Ralstonia solanacearum*).

¹ M y MB respectivamente

1.1 Objetivos del estudio

1.1.1 Objetivo general

Estudiar el efecto de la aplicación de biocarbón al suelo sobre las capacidades de desarrollo y defensa contra plagas y enfermedades de las plantas.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Estudiar la capacidad de diferentes combinaciones de biocarbón con microorganismos y fertilizantes orgánico y sintético para mejorar la producción de las plantas.

2. Estudiar el efecto de la aplicación de biocarbón inoculado con microorganismos benéficos sobre las capacidades de defensa de las plantas contra plagas y enfermedades.

3. Estudiar la combinación de biocarbón con diferentes tipos de fertilizantes (gallinaza, lombricompost y fertilizante mineral) sobre las capacidades de defensa de las plantas contra plagas y enfermedades.

1.2 Hipótesis del estudio

Las combinaciones de biocarbón con microorganismos y fertilizantes orgánicos inducen una mayor producción de las plantas.

La inoculación de microorganismos al suelo en presencia de biocarbón induce una mayor resistencia de las plantas contra plagas y enfermedades.

La combinación de biocarbón con abonos orgánicos induce una mayor resistencia de las plantas contra plagas y enfermedades.

2 MARCO CONCEPTUAL

2.1 Biocarbón

2.1.1 Origen

Terra Preta de Indio, o Amazonian Dark Earth, es un suelo de alta calidad encontrado en varias regiones de la Cuenca Amazónica (Brasil, Bolivia y Ecuador), en sitios donde vivieron importantes poblaciones precolombinas. *Terra Preta* significa “tierra negra” en portugués, debido a su color oscuro que la diferencia de los suelos pobres (Ferralsoles y Acrisoles) característicos de la región (Lehmann 2009; Sohi *et al.* 2009). La *Terra Preta* fue descrita por la primera vez en los países del Occidente en 1874 por Charles F. Hartt, las investigaciones sobre sus propiedades únicas iniciaron solamente durante la mitad del siglo veinte, demostrando su alta fertilidad expresada por una gran capacidad de retención de nutrientes como el nitrógeno, fósforo, potasio y calcio, una elevación de la Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC) y del pH, pero también por su mayor contenido en materia orgánica (Glaser 2001). Las investigaciones de Glaser *et al.* (2001) pusieron en evidencia la alta concentración en estos suelos de carbón vegetal (setenta veces más que en los suelos cercanos) resultado de la combustión incompleta de materiales orgánicos, factor clave en la persistencia de la materia orgánica. A partir de estas observaciones, se dieron inicio investigaciones sobre las propiedades del biocarbón y sus posibles aplicaciones en la agricultura contemporánea.

En Asia, el carbón vegetal (principalmente procesado a partir de desechos del cultivo de arroz, pero también de coco, palma de aceite y bambú) representó durante miles de años uno de los principales abonos utilizados por los agricultores. Es en Japón que fue descrito por la primera vez el uso de carbón en agricultura, en el libro “*Nogyo Zensho (Enciclopedia de Agricultura)*” escrito en 1697 por Yasusada Miyazaki, en donde se lo describe como “abono de fuego” o “abono de cenizas” (Ogawa y Okimori 2010). Se supone que su uso era igualmente común en Asia del Este, como lo confirma un texto antiguo encontrado en China en el cual se cita su descripción. La utilización de carbón en la agricultura dataría del principio de la siembra de arroz en Asia, ofreciendo una alternativa para la transformación de su cáscara que se descompone lentamente debido a su alto contenido en silicio (Ogawa y Okimori 2010).

Las facultades del biocarbón descritas anteriormente han sido confirmadas por un gran número de investigaciones sobre el efecto de su aplicación a diferentes tipos de suelos, bajo climas diversificados y para la producción de muchas variedades de plantas (Glaser *et al.* 2002; Chan *et al.* 2008; Graber *et al.* 2010; Major *et al.* 2010). Como se detalla a continuación, se demostró que la aplicación de biocarbón al suelo mejora sus características físicas y químicas, aumentando la retención de los nutrientes y favoreciendo la disponibilidad de estos para las plantas. También se describe cambios taxonómicos en las comunidades de microorganismos y estimulación de la

actividad microbiana del suelo en relación con la presencia de biocarbón, así como la implicación de los microorganismos benéficos y abonos orgánicos en la promoción de crecimiento e inducción de resistencia sistémica.

2.1.2. Efecto del biocarbón sobre la fertilidad y estructura del suelo

La incorporación de biocarbón al suelo aumenta su capacidad de fijación e intercambio de nutrientes impidiendo de esta manera su lixiviación, fenómeno característico de los suelos en los trópicos expuestos a grandes cantidades de precipitación (Lehmann *et al.* 2002). Los suelos sometidos a la aplicación de biocarbón presentan una mayor fijación y disponibilidad de macronutrientes y micronutrientes como el fósforo (P), potasio (K), calcio (Ca), zinc (Zn), cobre (Cu), boro (B) y molibdeno (Mo) asociada con una mayor retención (y entonces menor lixiviación) del nitrógeno (N) y la ausencia de lixiviación de magnesio (Mg) y calcio (Ca). Estos cambios están generalmente acompañado de un aumento del pH y una inmovilización de aluminio (Al) de la solución del suelo, proporcionando a las plantas una mayor disponibilidad de nutrientes, lo que optimiza su desarrollo (Glaser *et al.* 2002; Lehmann *et al.* 2002; Lehmann *et al.* 2003; Steiner *et al.* 2008c; Major *et al.* 2009; Major *et al.* 2010). La mayor retención de nutrientes se explica por un incremento de la superficie de intercambio debido a la porosidad del biocarbón, una mayor CIC, un aumento del ratio C:N y una menor pérdida de la materia orgánica (Glaser *et al.* 2002; Liang *et al.* 2006; Major *et al.* 2009). Es interesante especificar que el aumento de carbono en el suelo permite un mayor secuestro del nitrógeno, disminuyendo de esta manera la lixiviación y la desnitrificación, fuente de N₂ (gas de efecto invernadero importante), y asegurando la liberación paulatina de este para la planta (Steiner *et al.* 2008b; Deluca *et al.* 2009).

El mejoramiento de las propiedades químicas y físicas del suelo van a favorecer el desarrollo óptimo de las plantas, lo que permite la obtención de una mayor producción y mejores defensas contra plagas y enfermedades. Awmack y Leather (2002) demostraron que el mejoramiento del estado fisiológico de la planta afecta las estrategias de reproducción de los insectos herbívoros, particularmente la tasa de reproducción, la fecundidad y el tamaño de los huevos y la selección del área de oviposición. Los áfidos son particularmente sensibles a la calidad de las plantas, presentando tasas de reproducción mayores cuando la savia contiene alta concentración de aminoácidos (correspondiendo a un estado fisiológico débil o perturbado). El mejoramiento del estado fisiológico del vegetal induce generalmente la producción de hembras migratorias que se desplazan hacia el hospedero secundario, donde se reproducen asexualmente hasta que la calidad del hospedero primario disminuya. La calidad y cantidad de nutrientes, de lo cual depende la producción de fenoles y lípidos presentes en las plantas, pueden tener una influencia importante sobre las capacidades de daño de los herbívoros, como lo fue demostrado para *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) cuya porcentaje de eclosión de los huevos

disminuyó con la reducción de esteroides en la dieta (Awmack y Leather 2002). Además, una mejor nutrición, especialmente la mayor disponibilidad en potasio (K), zinc (Zn) y boro (B), induce una mayor resistencia y tolerancia de las plantas contra las plagas y enfermedades (Marschner 1997). Esta tendencia se puede igualmente justificar por una menor cantidad de nitrógeno en el suelo y en los tejidos de las plantas, lo que desfavorece el ataque por herbívoros y patógenos (Marschner 1997; Altieri y Nicholls 2003).

El aumento de la relación C:N de los suelos ocasionado por la aplicación de biocarbón genera una mayor concentración en carbono de la planta, principalmente en forma de lignina y celulosa, que forman una barrera que afecta a la capacidad de succión y la fertilidad de las plagas, así como la modificación de compuestos contenidos en la savia, podría influir sobre la resistencia de las plantas contra plagas y enfermedades. Se demostró que la aplicación de cantidades importantes de nitrógeno tienden a provocar la disminución de la espesura de la cutícula de las plantas, facilitando la nutrición de las plagas como la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) y el pulgón (*Myzus persicae*) cuyas poblaciones suelen aumentar (Jauset *et al.* 2000; Altieri y Nicholls 2003). Dos propiedades del biocarbón podrían influir sobre este mecanismo: (1) su alta retención de nutrientes, particularmente del nitrógeno, que permite disminuir las aplicaciones y así evitar una sobredosis de este mismo elemento; (2) el aumento de las concentraciones en carbono del suelo, resultado de la composición del material y de la liberación de compuestos como los grupos carboxilos, presentes en la superficie del biocarbón, y que aumentan la concentración del carbono de las plantas y favorecen la producción de lignina y celulosa.

2.1.3 Interacciones biocarbón- microorganismos

La incorporación de biocarbón al suelo induce el desarrollo de una mayor diversidad de microorganismos (Pietikäinen *et al.* 2000; Liang *et al.* 2010). Un aumento de la respiración basal del suelo, una mayor diversidad y crecimiento de las poblaciones de bacterias fueron observados en suelos tratados con carbón vegetal en varios estudios (Steiner *et al.* 2004; Steiner *et al.* 2008c; Major *et al.* 2009; O'neill *et al.* 2009). Estos suelos estimularon la colonización por micorrizas, el gran número de poros del biocarbón constituyeron un hábitat de calidad para estos organismos (Matsubara *et al.* 1995; Steiner *et al.* 2004; Warnock *et al.* 2007). También se demostró efectos positivos sobre otros microorganismos benéficos como *Rhizobium* sp. (Beck 1991; Rondon *et al.* 2006), *Trichoderma* spp. (Elad *et al.* 2010; Graber *et al.* 2010), y otras bacterias implicadas en la promoción del crecimiento e inducción de resistencia (como los actinomicetes entre otros) (Graber *et al.* 2010; Kolton *et al.* 2011). Steiner *et al.* (2008a) sugiere que ciertas sustancias resultado del proceso de pirólisis que se encuentran en la superficie del biocarbón (como el ácido acético, ácido fórmico, los formaldehidos, el metanol y xyacetaldéhididos), que en grandes cantidades pueden tener efectos biosidas, sirven de sustrato (cantidades menores) de carbono y energía para los microorganismos.

Los microorganismos tienen un papel primordial en la degradación del biocarbón. La metabolización por organismos heterótrofos es el principal mecanismo de descomposición de este material (DeLuca *et al.* 2009). Osipowicz *et al.* (1996) demostraron la implicación de seis hongos (*Poria vaporaria*, *Pholiota aurivella*, *Piptoporus betulinus*, *Fusarium culmorum*, *Marasmius scorodonius* y *Laetiporus sulphureus*) en el proceso de despolimerización de carbón vegetal, resultado de la acción de las enzimas secretadas por estos microorganismos. Los basidiomicetes especializados en la descomposición de madera y hojarasca parecen particularmente eficientes para la degradación del biocarbón (DeLuca *et al.* 2009), como lo demostraron Wengel *et al.* (2006) con *Schizophyllum commune*, que inoculado al biocarbón aumentó en un 11% la cantidad de carbono (C) orgánico originario de este material en el medio, lo que es explicado por la degradación de moléculas de alto peso molecular por el hongo.

2.1.4 Los subproductos de pirólisis

El proceso de pirólisis genera sustancias residuales contenidas en el humo producido por la combustión, que se pueden recuperar por mecanismos de condensación, lo cual forma un producto llamado “vinagre de madera” o *ácido piroleñoso*. Esta sustancia demostró su eficacia como fungicida, bactericida y repelente contra insectos por fumigación, debido a sus concentraciones en compuestos tales como el ácido acético, los formaldehídos, el metanol y los fenoles (Baimark y Niamsa 2009, Chalermisan y Peerapan 2009, Steiner *et al.* 2008a). Steiner *et al.* (2008a) demostraron el aumento de actividad microbiana de estas sustancias presentes en la superficie del biocarbón. Además, Light *et al.* (2009) y Van Staden *et al.* (2006) encontraron que el alto contenido en butenolidos del humo induce una mayor germinación de las semillas, una mayor producción de hojas y raíces, un tamaño de brotes mayor, así como un mayor porcentaje de sobrevivencia de diferentes plantas (tomate, frijol, oca, maíz, entre otros). Fischer y Bienkowski (1999) y Uvarov (2000) encontraron igualmente que los suelos expuestos al humo de producción de carbón vegetal en Polonia presentan una mayor biomasa microbiana.

Se puede suponer que las diferentes sustancias presentes en el humo se encuentran además en la superficie y en los poros del biocarbón. De esta manera, la aplicación de carbón vegetal a los cultivos podría inducir, por medio de estos compuestos, una mayor resistencia a plagas y enfermedades gracias al mejoramiento del estado fisiológico de las plantas o por su papel como pesticida. Como lo sugiere Graberet *et al.* (2010), es posible que estas sustancias puedan a la vez servir de sustrato para algunos tipos de microorganismos más resistentes, y tener un efecto bactericida o fungicida contra otros grupos de microorganismos más susceptibles.

2.2 Los abonos orgánicos

El precio alto de los fertilizantes sintéticos y la contaminación de las aguas superficiales y subterráneas por su lixiviación comprometen la sostenibilidad de la agricultura moderna, y grandes esfuerzos son necesarios para optimizar el reciclaje de los nutrientes y favorecer su permanencia en el agrosistema. Los abonos orgánicos representan una de las alternativas para mejorar la sostenibilidad y contribuir al buen equilibrio del sistema agrícola (Benzing 2001).

Numerosos estudios demostraron el incremento del crecimiento y de la producción relativos a la aplicación de abonos orgánicos, a veces con resultados superiores que los obtenidos con fertilización sintética (Atiyeh *et al.* 2001; Mendoza-Netzahual *et al.* 2003; Carrera *et al.* 2007; Demir *et al.* 2010). El efecto benéfico de estos fertilizantes se justifica, según los estudios, por varios factores tales como una disminución de la densidad relativa resultando de un aumento de la porosidad y de la aeración del suelo, optimización de la retención del agua, un aumento del CIC, una mayor mineralización debida a una alta actividad y biomasa microbiana y una alta actividad enzimática, supresión de patógenos y producción de sustancias reguladoras de crecimiento por estos mismos microorganismos (Van Bruggen 1995; Atiyeh *et al.* 2001; Birkhofer *et al.* 2008; Domínguez *et al.* 2010).

La aplicación de abonos orgánicos tales como excrementos animales y compost es la estrategia más documentada para aumentar la supresión de enfermedades del suelo (Alabouvette *et al.* 2004). Se atribuye a los abonos orgánicos como el compost, lombricompost o la gallinaza, un papel importante contra una gran diversidad de patógenos. Varios estudios demostraron la mayor incidencia de enfermedades como *Rhizoctonia solani*, *Verticilium dahliae*, *Phytophthora cinnamomi*, *Pythium arrhenomanes* (entre otros) en sistemas convencionales con fertilización mineral en comparación con sistemas de bajo insumos y orgánicos (Van Bruggen 1995). Stone *et al.* (2003) pusieron en evidencia las propiedades del compostaje de residuos originarios de fábricas de papel sobre diferentes enfermedades tales como *Pythium* sp. y *Phytophthora* spp. (entre otras) en plantas de caupí (*Vigna unguiculata*) y pepino (*Cucumis sativus*). Vallad *et al.* (2003) demostraron el efecto similar de este compost sobre *Pseudomonas syringae* en plantas de tomate y *Arabidopsis thaliana*. En ensayos a largo plazo, Birkhofer *et al.* (2008) encontraron una menor incidencia de plagas (principalmente áfidos) y una mayor abundancia de nematodos bacteriófagos, lombrices, arañas y microorganismos en sistemas donde se aplicó abonos orgánicos en comparación con las parcelas donde se usó fertilizante minerales y herbicidas.

La eficiencia en la supresión de enfermedades de los abonos orgánicos tiene una permanencia larga, como lo demostraron Saadi *et al.* (2010) quienes evaluaron la supresividad a través del tiempo de un compost de boñiga, tierra y residuos de plantas secas de tomate contra *Fusarium oxysporum* en laboratorio, y verificaron la constante eficiencia de este durante al menos

un año. En el cultivo de tomate, el lombricompost permitió obtener plantas de mayor tamaño (contenía reguladores de crecimiento), rendimiento, productos de mayor calidad, mayor resistencia y supresividad contra enfermedades y plagas como *Myzus persicae* (Atiyeh *et al.* 2001; Gutierrez-Miceli *et al.* 2007; Singh *et al.* 2008; Edwards *et al.* 2010). Considerando la alta capacidad de fijación de nutrientes del biocarbón, y su incidencia sobre la comunidad microbiana del suelo, el tipo de fertilización constituye un factor clave en la fertilidad y permanencia del suelo a lo largo del tiempo. La combinación de las propiedades de inducción de resistencia de los abonos orgánicos y del biocarbón con el efecto benéfico de estos sobre el ciclo de nutrientes, representa una oportunidad de interés para el mejoramiento de la sostenibilidad de los sistemas de producción agrícola.

2.3 Inducción de resistencia

2.3.1 Aspectos generales

Las plantas poseen diferentes tipos de mecanismos permitiéndoles combatir a plagas y enfermedades. Se pueden dividir en dos tipos: la resistencia basal, resultado de mecanismos constitutivos o pre-existentes; y la resistencia inducida, resultado de mecanismos inducibles o post-formados en respuesta al ataque del patógeno (Riveros 2010).

La resistencia basal implica un reconocimiento general, no específico, del patógeno por la planta, involucrando a receptores universales. Este fenómeno se caracteriza por la disminución del poder de infección de la enfermedad, el bloqueo de su establecimiento o su eliminación gracias a la presencia de barreras estructurales (fenómeno pasivo) o la producción de compuestos bioquímicos (fenómeno activo) (Walters y Heil 2007; Riveros 2010). Estos últimos pueden estar producidos de manera activa, o pueden ser almacenados como precursores inactivados que están activados por enzimas producidas por la planta en respuesta al ataque del patógeno o al daño físico provocados por insectos u otros a los tejidos vegetales (Riveros *et al.* 2010).

La resistencia de una planta contra un patógeno o un insecto puede también ser inducida por diferentes señales proveniente de microorganismos o del ambiente, permitiendo a esta reconocer el agente extraño y activar sus mecanismos de defensa (Walters y Heil 2007; Karban 2010; Riveros 2010). Este tipo de resistencia se califica de Resistencia Inducida (RI), y se puede dividir en dos grupos principales: Resistencia Sistémica Adquirida (RSA, o SAR por sus siglas en inglés) y Resistencia Sistemática Inducida (RSI, o SIR por sus siglas en inglés). Ambos RSA y RSI resultan de mecanismos de activación de resistencia que actúan contra una inoculación posterior o potencial de un patógeno, y se transmiten a toda la planta (sistémicas) mediante la señalización y transducción de una célula a otra en los tejidos de la planta (Van Loon 1997; Riveros 2010). Esta comunicación inter-celular está regulada por fitohormonas: el ácido salicílico, en ácido jasmónico y

el etileno. Estos compuestos, a más de ser reconocidos como reguladores del crecimiento, también han demostrado activar grupos de genes relacionados con la defensa (Riveros 2010, Van Loon 1997). En respuesta, las células producen una gama de moléculas destinadas a impedir el desarrollo del patógeno o el daño causado por el insecto, como compuestos de bajo peso molecular (las fitoalexinas), las proteínas relacionadas con la patogenicidad (proteínas PR) que incluyen las quitinasas, glucanasas y taumatinasas y enzimas oxidativas como las peroxidasas, o mediante mecanismos de lignificación o de respuesta hipersensible (RH) provocando la muerte programada de las células alrededor del patógeno (Harman *et al.* 2004; Riveros 2010). También se describe un tercer grupo llamado Resistencia Local Inducida (RLI o LIR por sus siglas en inglés), que tiene la particularidad de actuar exclusivamente de forma local y que, al contrario de la SAR, es específica a patógenos particulares (Riveros 2010).

La RSA y la RLI están generalmente asociadas con la producción de ácido salicílico (AS), fitohormona cuya producción coincide con la expresión de genes que codifican proteínas relacionadas con la patogenicidad (proteínas RP) y que tiene un papel importante en la defensa de las plantas contra enfermedades mediante la inhibición del crecimiento del hongo, la liberación de moléculas que son inductores endógenos de resistencia y el reforzamiento de las paredes celulares. (Riveros *et al.* 2010, Walters *et al.* 2007). En cuanto a la RSI, no involucra al AS o a las proteínas PR, pero depende de vías metabólicas reguladas por otras fitohormonas: el ácido jasmónico (AJ) y el etileno (E) (Yan *et al.* 2002; Vallad y Goodman 2004). Sin embargo, a pesar que estas asociaciones sean reportadas por numerosos autores, ciertos estudios demostraron que la RSI puede ser vinculada con la producción de AS (Vallad y Goodman 2004). Las diferencias entre RSA y RSI son relativamente oscuras y ciertos autores las consideran como sinónimos.

Los inductores de resistencia pueden ser abióticos (químicos, físicos o mecánicos) o bióticos (como por el mismo patógeno o un microorganismo benéfico), los cuales son clasificados en inductores endógenos (moléculas implicadas en las defensas están producidas dentro de la misma planta, en su parte intra e intercelular) y exógenos (la molécula se libera externamente). Ambos tipos de moléculas tienen el potencial de inducir la respuestas estructurales y bioquímicas (Riveros *et al.* 2010).

El papel del biocarbón en la inducción de resistencia sistémica de las plantas ha sido poco estudiado, y solo se describen dos estudios sobre el tema. Elad *et al.* (2010) observaron que la aplicación de 1 a 5% de biocarbón al sustrato de plantas de tomate y chile dulce disminuyó los daños debido a dos patógenos foliares (*Leveillula taurica* y *Botrytis cinérea*) y a un ácaro (*Polyphagotarsonemus latus*), sin encontrar diferencias significativas entre las diferentes dosis de aplicación del biocarbón. Los autores atribuyen al biocarbón un papel de inductor de resistencia, rechazando la posibilidad del efecto directo de sustancias presentes en la superficie de este material

debido a la distancia física entre este y el patógeno (la inoculación se realizó en la parte vegetativa de las plantas). También, Matsubara *et al.* (2002) demostraron que el biocarbón, en presencia de micorrizas arbuscular (*Glomus* sp.), tiene un efecto supresivo sobre *Fusarium oxysporum* en plantas de *Asparagus officinalis*. Estos estudios constituyen buenas bases para suponer un efecto positivo del biocarbón sobre las diferentes enfermedades y plagas estudiadas en este trabajo.

2.3.2 Los microorganismos antagonistas y promotores de crecimiento

Como se comentó anteriormente, el biocarbón constituye un sustrato ideal para el desarrollo de microorganismos, tanto bacterianos como fúngicos o micorrícicos. Muchos de estos microorganismos han sido utilizados en la agricultura, inoculados al sustrato o a las semillas antes de la siembra por sus facultades para aumentar la productividad de los cultivos (DeLuca *et al.* 2009). Los grupos utilizados son diversos, ya sean las bacterias fijadoras de nitrógeno simbióticos o no simbióticos, las rizobacterias promotoras de crecimiento como *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. o *Clostridium* spp., hongos saprofitos como *Trichoderma harzianum* o micorrizas (Vinale *et al.* 2008; Deluca *et al.* 2009).

Muchos de estos grupos de microorganismos se ven beneficiados por la aplicación de carbón vegetal, como lo observó Elad *et al.* (2010), quienes encontraron que las poblaciones de *Pseudomonas*, actinomicetes y *Trichoderma* spp. incrementaron significativamente por la aplicación de biocarbón.

- ***Trichoderma* spp.**

Trichoderma spp. es el hongo antagonista más aislado, estudiado y comercializado como biopesticida, biofertilizante y abono (Vinale *et al.* 2008), y representa a un 90% de las aplicaciones de hongo antagonista de fitopatógenos (Benítez *et al.* 2004). Este microorganismo puede incrementar la productividad de los cultivos gracias a la inducción de resistencia que ejerce sobre las plantas, la competición para la absorción de nutrientes y/o el espacio con los patógenos, pero también tiene la capacidad de atacarse directamente a estos por la secreción de enzimas líticas (como endoquitinasas y exoquitinasas), de antibióticos o por acoplamiento y enrollado al hongo patógeno (Ezziyani *et al.* 2004; Harman 2006; Roberti *et al.* 2008). Ya se demostró las facultades de *Trichoderma* spp. para inducir resistencia sistémica o localizada contra una gama amplia de patógenos tales como hongos (de los géneros *Rhizoctonia*, *Sclerotium*, *Pythium* y *Fusarium*, entre otros), oomicetes (*Phytophthora* spp. entre otros), bacterias y virus, colonizando la superficie de las raíces y penetrando dentro del epidermis y el córtex (Ezziyani *et al.* 2004, Harman 2006). Ezziyani *et al.* (2004) encontraron que la inoculación de semillas de chile dulce (*Capsicum annuum* L.) con *Trichoderma harzianum* permitió reducir en un 65% la incidencia de la “tristeza”, causada por *Phytophthora capsici*. La inducción de resistencia puede resultar de la producción de

enzimas extracelulares o por la inducción de secreción de compuestos secundarios tales como fitoalexinas y terpenoides (Harman 2006).

Los hongos saprófitos, que incluyen a *Trichoderma* spp., tienen un papel particularmente importante en la persistencia y la transformación del biocarbón por la capacidad de las hifas para colonizar los poros de biocarbón y la alta capacidad de producción de enzimas (DeLuca *et al.* 2009). Laborda *et al.* (1999) demostraron el papel de *Trichoderma* spp. y *Penicillium* spp. en la despolimerización o solubilización del biocarbón, asociado a la secreción de enzimas extracelulares tales como peroxidases, esterasas y fenoloxidasas.

- ***Bacillus* spp.**

Se evaluó que 25% de las bacterias de la rizósfera tiene un efecto benéfico sobre el crecimiento y las defensas de las plantas contra enfermedades (Walters y Heil 2007). El papel de las bacterias promotoras del crecimiento como *Bacillus* spp, *Pseudomonas* spp. *Azospirillum*, *Agrobacterium*, *Azotobacter*, *Arthrobacter*, *Alcaligenes*, *Rhizobium*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Beijerinckia*, *Klebsiella*, *Clostridium*, *Xanthomonas*, *Phyllobacterium* y *Paenibacillus* spp. para el control biológico es reconocido y demostrado por numerosos estudios (Walters y Heil 2007; Adesemoye *et al.* 2008). El aumento de crecimiento y la inducción de resistencia en las plantas se atribuyen a diferentes propiedades de estas bacterias como la solubilización de los minerales, el suministro directo de nutrientes (en particular nitrógeno), la quelación de los iones y a la producción de fitohormonas absorbidas por las raíces de las plantas, la supresión de microorganismos patógenos por competición o secreción de sustancias tóxicas y sideróforos (compuesto quelante de hierro) (Walters y Heil 2007; Herman *et al.* 2008).

El papel en el crecimiento y la inducción de resistencia contra hongos, bacterias y virus de *Bacillus subtilis* y otras especies del mismo género fue reportado por varios estudios (Adesemoye *et al.* 2008; Melnick *et al.* 2008; Liu *et al.* 2009). Adesemoye *et al.* (2008) demostraron que la inoculación de *B. subtilis* permite el aumento de materia seca de 31% para el tomate (*Lycopersicon esculentum*), 36% para la oca (*Abelmoschus esculentus*) y 83% para la espinaca africana (*Amaranthus* sp.) y un incremento de 80% de la germinación de las semillas de todas las especies en comparación al testigo sin aplicación. Kokalis–Burrelle y sus colegas (2002) demostraron la eficiencia de *B. subtilis* en el control de *Phytophthora* spp. sobre las plantas de tomate y chile dulce. El efecto benéfico de la inoculación de *B. subtilis* al sustrato de chile dulce fue reportado por Herman *et al.* (2008) contra el áfido *Myzus persicae*, las plantas presentaron tolerancia a la plaga en presencia de la bacteria y los rendimientos fueron estadísticamente iguales a los de las plantas tratadas con insecticida (imidacloprid).

2.4 Tomate

Hortaliza de frutos más importante de Costa Rica y de América Central, con una producción respectivamente de 45,479 y 3,218,720 MT toneladas en 2009 (Faostat 2009). El tomate generalmente presenta una fuerte incidencia de las plagas y enfermedades, haciendo de las cosechas menos rentables (Catie 1990). Particularmente sensible al ataque de microorganismos patógenos, el tomate se cultiva generalmente de manera convencional, lo que implica la aplicación de grandes cantidades de pesticidas. La búsqueda de nuevas alternativas que permitan reducir el uso de estos productos representa un reto de mayor importancia para disminuir la presión sobre el ambiente y la salud de las poblaciones productoras y consumidoras de esta fruta.

2.4.1 Enfermedades

El tomate es una de las plantas comerciales más afectadas por numerosos parásitos, ya sea hongos, bacterias o virus. Diferentes partes de la planta pueden ser afectadas por una amplia gama de patógenos, interfiriendo con los mecanismos de la fotosíntesis, absorción y traslocación de nutrientes y agua, la formación de los frutos o la maduración de estos en postcosecha. Hongos, bacterias y virus específicos o no, pueden desarrollarse en la superficie de las hojas, afectando el proceso de fotosíntesis, causando necrosis de los tejidos como antracnosis y manchas foliares. Los más frecuentes son *Alternaria* spp., *Botrytis cinérea*, *Phytophthora infestans*, *Pseudomonas siringae* pv tomato, virus del mosaico amarillo del tomate, virus del mosaico de tabaco, *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*, etc. (CATIE 1990).

En cuanto a los parásitos que interfieren con los procesos de absorción y translocación de los nutrientes y agua, se puede distinguir tres grupos de patógenos en función de los tejidos afectados: los hongos que provocan la pudrición de la base del tallo de las plántulas, que ataca a un amplio espectro de especies y de alta potencial patogénica y saprofítica (*Pythium aphanidermatum*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora parasítica*, *P. capsici*); los patógenos que infectan los tejidos corticales bien formados del tallo y la raíz, incluyendo organismos que atacan una gran variedad de especies (*Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii*, *Erwinia carotovora*); y los patógenos que causan el marchitamiento de las plantas debido a invasión de los haces vasculares (*Fusarium oxysporum* var. *lycopersici*, *Pseudomonas solanacearum*, *verticilium alboatrum*) (CATIE 1990).

- ***Pseudomonas corrugata***

Agente causal principal de la enfermedad llamada “pudrición medular”, la bacteria *P. corrugata* (Pseudomonadales: *Pseudomonadaceae*) se distribuye en todas las áreas de siembra del tomate del mundo, tanto en campo como bajo invernadero (Cirvilleri *et al.* 2008). El tomate es su principal huésped, pero el patógeno puede igualmente atacar, con menor intensidad, el chile dulce (*Capsicum annuum*), el crisantemo (*Chrysanthemum* spp.) y el geranio (*Geranium* spp.) (Bella *et*

al. 2003). Frecuentemente, los primeros síntomas son la clorosis de las hojas jóvenes, que aparecen generalmente después de la madurez de los primeros frutos, y la formación de lesiones necróticas en las hojas inferiores. Internamente, se observa una descoloración marrón y/o una necrosis de la cavidad medular y el colapso de este. Las plantas infectadas pueden igualmente desarrollar otros síntomas como la aparición de necrosis en el tallo, flujos de bacterias saliendo de heridas del tallo y la formación de raíces adventicias. (Scarlett *et al.* 1978; Cirvilleri *et al.* 2008). Los principales modos de dispersión son el agua de riego, las semillas y plántulas infectadas, los huéspedes secundarios, el salpique, la manipulación de las plantas, o por reciclaje de los nutrientes en sistemas hidropónicos (Cirvilleri *et al.* 2008; Kúdela *et al.* 2010). También se observó la colonización endofítica de las raíces de las plantas a partir de poblaciones naturalmente presentes en el suelo (Bella *et al.* 2003).

Para el control de la enfermedad, se recomienda evitar el exceso de nitrógeno, las podas excesivas y los daños mecánicos, especialmente cuando el follaje está húmedo (Cirvilleri *et al.* 2008). La aplicación compost podría igualmente ser una alternativa para disminuir la susceptibilidad de las plantas a la enfermedad, como lo describieron Vallad *et al.* (2003), quienes demostraron la inducción de resistencia del compost de residuos de producción de papel en plantas de *Arabidopsis thaliana* contra *Pseudomonas syringae*. Los autores atribuyen estos resultados a la estimulación de genes relacionados con la defensa por la vía dependiente del ácido salicílico, PR-1 y β -1,3-glucanasa, generalmente implicados en la resistencia sistémica adquirida (ver 2.3.1). El uso de microorganismos antagonistas y de abonos orgánicos para reducir el impacto de la pudrición medular, aunque poco documentada, representa una alternativa al uso de bactericidas.

2.4.2 La mosca blanca (*Bemisia tabaci*)

B. tabaci (Homoptera: Aleyrodidae), llamado “Mosca blanca”, es un insecto plaga que puede causar muchos daños en el cultivo de tomate (Jaramillo *et al.* 2007). Inicialmente se consideró como una plaga secundaria, pero se convirtió en la principal plaga agrícola mundial y constituye actualmente un problema de gran importancia en todo el continente americano. Esta plaga causa daños substanciales a las plantas por sus poblaciones desmesuradas, por promover el hongo *Cladosporium* sp, o como vector de virus (geminovirus en el caso del tomate) (Catie 1996; Hilje y Stansly 2008) (Hilje 1996, Hilje y Stansly 2008). Este insecto polífago se reproduce y alimenta en más de 600 especies de plantas diferentes perteneciendo a 74 familias, incluyendo 30 cultivos de importancia a través del mundo y es la causa de la pérdida de varios cientos de millones de dólares cada año (Hilje y Stansly 2008).

La mosca blanca puede estar presente durante todo el ciclo de la planta, pero el periodo crítico de susceptibilidad de la planta al geminovirus son los 50-60 días después de la germinación (Hilje y Stansly 2008). Para controlar a *Bemisia tabaci*, la aplicación de pesticidas es la práctica

más utilizada en Costa Rica (Araya *et al.* 2005). En el estudio de Araya *et al.* (2005), 100% de los agricultores consultados declararon recurrir al combate químico, entre otros piretroides (100%), organofosforados (87,5%), cloronicotilos (77,5%) y nereistoxinas (45,0%), lo que representa una fuerte contaminación del ambiente y un peligro importante para los agricultores. Pocos trabajos se realizaron sobre el enfoque de control biológico del insecto, y la búsqueda de nuevas alternativas al uso de agroquímicos es primordial para disminuir la incidencia de estos productos sobre el ambiente y la salud humana.

2.5 Bibliografía

- Adesemoye, AO; Obini, M; Ugoji, EO. 2008. Comparison of plant growth-promotion with *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis* in three vegetables. *Brazilian Journal of Microbiology* 39:423-426.
- Alabouvette, C; Backhouse, D; Steinberg, C; Donovan, NJ; Edel-Hermann, V; Burgess, LW. 2004. Microbial Diversity in Soil – Effects on Crop Health. *In* Schjøning, P; Elmholt, S; Christensen, BT. eds. 2004. *Managing Soil Quality: Challenges in Modern Agriculture*. CABI International. 212-138 p.
- Altieri, M; Nicholls, CI. 2003. Soil fertility management and insect pests: harmonizing soil and plant health in agroecosystems. *Soil and Tillage Research* 72(2):203-211.
- Araya, L; Carazo, E; Cartín, V. 2005. Diagnóstico del uso de insecticidas utilizados contra *Bemisia tabaci* (Gennadius) en tomate y chile en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 75: 68-76.
- Atiyeh, RM; Edwards, CA; Subler, S; Metzger, JD. 2001. Pig manure vermicompost as a component of a horticultural bedding plant medium: effects on physicochemical properties and plant growth. *Bioresource Technology* 78:11-20.
- Awmack, CS; Leather, SR. 2002. Host plant quality and fecundity in herbivorous insects. *Annu. Rev. Entomol.* 47:817-844.
- Baimark, Y; Niamsa, N. 2009. Study on wood vinegars for use as coagulating and antifungal agents on the production of natural rubber sheets. *Biomass and bioenergy* 33:994-998.
- Beck, DP. 1991. Suitability of charcoal-amended mineral soil as carrier for *Rhizobium* inoculants. *Soil Biology and Biochemistry* 23(1):41-44.
- Bella, P; Greco, S; Polizzi, G; Cirvilleri, G; Catara, V. 2003. Soil fitness and thermal sensitivity of *Pseudomonas corrugata* strains. *Proceedings of 6th International Symposium on Protected Cult.* Eds: G. La Malfa et al. *Acta Hort* 614, ISHS 2003:831-836.
- Benítez, T; Rincón, AM; Limón, MC; Codón, AC. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology* 7:249 - 260.
- Benzing, A. 2001. *Agricultura orgánica - fundamentos para la Región Andina*. Neckar-Verlag. Villingen-Schwenningen p. 682.

- Birkhofer, K; Bezemer, TM; Bloem, J; Bonkowski, M; Christensen, S; Dubois, D; Ekelund, F; Fließbach, A; Gunst, L; Hedlund, K; Mäder, P; Mikola, J; Robin, C; Setälä, H; Tatin-Froux, F; Van der Putten, WH; Scheu, S. 2008. Long-term organic farming fosters below and aboveground biota: Implications for soil quality, biological control and productivity. *Soil Biology and Biochemistry* 40(9):2297-2308.
- Carrera, LM; Buyer, JS; b, BV; Abdul-Baki, AA; Sikora, LJ; Teasdale, JR. 2007. Effects of cover crops, compost, and manure amendments on soil microbial community structure in tomato production systems. *applied soil ecology* 37:247-255.
- CATIE. 1990. Guía para el manejo integrado de plagas del cultivo de tomate. Programa de mejoramiento de cultivos tropicales. Proyecto Regional Manejo Integrado de Plagas. Turrialba, Costa Rica. 138 p.
- _____. 1996. Metodologías para el estudio y manejo de mosca blanca y geminivirus. Hilje, L. Turrialba, Costa Rica 150.
- Cirvilleri, G; Bella, P; Rosa, RL; Catara, V. 2008. Internalization and survival of *Pseudomonas corrugata* from flowers to fruits and seeds of tomato plants – identification, epidemiology and genomics. In Collmer, MBF; Iacobellis, NS; Mansfield, JW; Murillo, J; Schaad., NW; Ullrich, M. eds. 2008. *Pseudomonas syringae* pathovars and related pathogens. Springer. 73-79 p.
- Chalermnan, Y; Peerapan, S. 2009. Wood-vinegar: by product from rural charcoal kiln and its roles in plant protection. Rajamangala University of Technology Lanna, Chiang-Mai, Thailand. 167-174 p.
- Chan, KY; Zwieten, LV; Meszaros, I; Downie, A; Joseph, S. 2008. Using poultry litter biochars as soil amendments. *Australian Journal of Soil Research* 46:437- 444.
- DeLuca, TH; MacKenzie, MD; Gundale, MJ. 2009. Biochar effects on soil nutrient transformations. In Lehmann, J. ed. 2009. *Biochar for environmental management*. London, UK, Earthscan. 251-270 p.
- Demir, K; Sahin, O; Kadioglu, YK; Pilbeam, DJ; Gunes, A. 2010. Essential and non-essential element composition of tomato plants fertilized with poultry manure. *Scientia Horticulturae* 127(1):16-22.
- Domínguez, J; Lazcano, C; gómez-BranDón, M. 2010. Influencia del vermicompost en el crecimiento de las plantas, aportes para la elaboración de un concepto objetivo. *Acta Zoológica Mexicana Número Especial 2* 359-371.
- Edwards, CA; Arancon, NQ; Vasko-Bennett, M; Askar, A; Keeney, G; Little, B. 2010. Suppression of green peach aphid (*Myzus persicae*) (Sulz.), citrus mealybug (*Planococcus citri*) (Risso), and two spotted spider mite (*Tetranychus urticae*) (Koch.) attacks on tomatoes and cucumbers by aqueous extracts from vermicomposts. *Crop Protection* 29:80-93.
- Elad, Y; David, DR; Harel, YM; Borenshtein, M; Kalifa, HB; Silber, A; Graber, ER. 2010. Induction of systemic resistance in plants by biochar, a soil-applied carbon sequestering agent. *Phytopathology* 100(9):913-21.
- Ezziymani, M; Pérez, C; Sid-Ahmed, A; Emilia, M; Candela, M-E. 2004. *Trichoderma harzianum* como biofungicida para el biocontrol de *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annuum* L.). *Anales de Biología* 26:35-45.

- FAOSTAT 2009. Crops production (en Línea). Consultado el 2 noviembre 2011. Disponible en <http://faostat.fao.org/>
- Fischer, Z; Bienkowski, P. 1999. Some remarks about the effect of smoke from charcoal kilns on soil degradation. *Environmental Monitoring and Assessment* 58(3):349-358.
- Glaser, B; Haumaier, L; Guggenberger, G; Zech, W. 2001. The "*Tierra Preta*" phenomenon: a model for sustainable agriculture in the humid tropics. *Naturwissenschaften* 88(1):37-41.
- Glaser, B; Lehmann, J; Zech, W. 2002. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal - a review. *Biology and Fertility of Soils* 35(4):219-230.
- Graber, ER; Meller Harel, Y; Kolton, M; Cytryn, E; Silber, A; Rav David, D; Tsechansky, L; Borenshtein, M; Elad, Y. 2010. Biochar impact on development and productivity of pepper and tomato grown in fertigated soilless media. *Plant and Soil* 337(1-2):481-496.
- Gutierrez-Miceli, FA; Santiago-Borraz, J; Montes Molina, JA; Nafate, CC; Abud-Archila, M; Oliva Llaven, MA; Rincon-Rosales, R; Dendooven, L. 2007. Vermicompost as a soil supplement to improve growth, yield and fruit quality of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Bioresource Technology* 98(15):2781-2786.
- Harman, GE; Howell, CR; Viterbo, A; Chet, I; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews. Microbiology* 2(1):43-56.
- Harman, GE. 2006. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96(2):190-194.
- Herman, M; Nault, B; Smart, C. 2008. Effects of plant growth-promoting rhizobacteria on bell pepper production and green peach aphid infestations in New York. *Crop Protection* 27(6):996-1002.
- Hilje, L; Stansly, PA. 2008. Living ground covers for management of *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: *Aleyrodidae*) and tomato yellow mottle virus (ToYMoV) in Costa Rica. *Crop Protection* 27(1):10-16.
- Jaramillo, J; Rodriguez, V; Guzman, M; Zapata, M; Rengifo, T. 2007. Manual técnico: buenas prácticas agrícolas en la producción de tomate bajo condiciones protegidas. FAO-Gobernación de Antioquia-MANA-CORPOICA-Centro de Investigación "La Selva". Medellín, Colombia 331.
- Jauset, AM; Sarasua, MJ; Avilla, J; Albaj, R. 2000. Effect of nitrogen fertilization level applied to tomato on the greenhouse whitefly. *Crop Protection* 19 255-261.
- Karban, R. 2010. The ecology and evolution of induced resistance against herbivores. *Functional Ecology, journal compilation*:1-9.
- Kim, JS; Sparovek, G; Longo, RM; De Melo, WJ; Crowley, D. 2007. Bacterial diversity of terra preta and pristine forest soil from the Western Amazon. *Soil Biology & Biochemistry* 39(2):684-690.
- Kokalis-Burelle, N; C.S.Vavrina; E.N.Roskopf; R.A.Shelby. 2002. Field evaluation of plant growth-promoting Rhizobacteria amended transplant mixes and soil solarization for tomato and pepper production in Florida. *Plant and Soil* 238:257-266.

- Kolton, M; Harel, YM; Pasternak, Z; Graber, ER; Elad, Y; Cytryn, E. 2011. Impact of biochar application to soil on the root-associated bacterial community structure of fully developed greenhouse pepper plants. *Applied and Environmental Microbiology* 77(14):4924-4930.
- Kůdela, V; Krejzar, V; Pánková, I. 2010. *Pseudomonas corrugata* and *Pseudomonas marginalis* associated with the collapse of tomato plants in rockwool slab hydroponic culture. *Plant Protect. Sci.* 46(1):1-11.
- Laborda, F; Monistrol, I; Luna, N; Fernandez, M. 1999. Processes of liquefaction/solubilization of Spanish coals by microorganisms. *Appl. Microbiol. biotechnol.* 41(6):49-46.
- Lehmann, J; da Silva, J; Rondon, M; da Silva, C; J., G; Nehls, T; Steiner, C; Glaser, B. 2002. Slash-and-char: a feasible alternative for soil fertility management in the central Amazon? 7th World Congress of Soil Science. Bangkok, Thailand. 12 p.
- Lehmann, J; Pereira da Silva, J; Steiner, C; Nehls, T; Zech, W; Glaser, B. 2003. Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: fertilizer, manure and charcoal amendments. *Plant and Soil* 249(2):343-357.
- Lehmann, J. 2009. Terra Preta de Indio. *Encyclopedia of Soil Science* 1(1):1-4.
- Liang, B; Lehmann, J; Solomon, D; Kinyangi, J; Grossman, J; O'Neill, B; Skjemstad, JO; Thies, J; Luiza, FJ; Petersen, J; Neves, EG. 2006. Black carbon increases cation exchange capacity in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 70:1719-1730.
- Liang, B; Lehmann, J; Sohi, SP; Thies, JE; O'Neill, B; Trujillo, L; Gaunt, J; Solomon, D; Grossman, J; Neves, EG; Luizão, FJ. 2010. Black carbon affects the cycling of non-black carbon in soil. *Organic Geochemistry* 41(2):206-213.
- Light, M; Daws, M; Vanstaden, J. 2009. Smoke-derived butenolide: Towards understanding its biological effects. *South African Journal of Botany* 75(1):1-7.
- Liu, B; Qiao, H; Huang, L; Buchenauer, H; Han, Q; Kang, Z; Gong, Y. 2009. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. *Biological Control* 49(3):277-285.
- Major, J; Lehmann, J; Rondon, M; Goodale, C. 2009. Fate of soil-applied black carbon: downward migration, leaching and soil respiration. *Global Change Biology* 16:1366-1379.
- Major, J; Rondon, M; Molina, D; Riha, SJ; Lehmann, J. 2010. Maize yield and nutrition during 4 years after biochar application to a Colombian savanna oxisol. *Plant and Soil* 333(1-2):117-128.
- Marschner, H. 1997. Mineral nutrition of higher plants. Second ed. San Diego, Academic Press. p. 889.
- Matsubara, Y; Harada, T; Yakuwa, T. 1995. Effect of inoculation density of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores and addition of carbonized material to bed soil on growth of Welsh onion seedlings. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 64(3):549-554.

- Matsubara, Y; Hasegawa, N; Fukui, H. 2002. Incidence of *Fusarium* root rot in *Asparagus* seedlings infected with arbuscular mycorrhizal fungus as affected by several soil amendments. *Japanese Society for Horticultural Science* 71(3):370-374.
- Melnick, R; Zidack, N; Bailey, B; Maximova, S; Gultinan, M; Backman, P. 2008. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. *Biological Control* 46(1):46-56.
- Mendoza-Netzahual, H; Carrillo-Rodríguez, JC; Perales-Segovia, C; Ruiz-Vega, J. 2003. Evaluación de fuentes de fertilización orgánica para tomate de invernadero en Oaxaca, México. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 70:30-35.
- O'Neill, B; Grossman, J; Tsai, M; Gomes, J; Lehmann, J; Peterson, J; Neves, E; Thies, J. 2009. Bacterial community composition in brazilian anthrosols and adjacent soils characterized using culturing and molecular identification. *Microbial Ecology* 58(1):23-35.
- Ogawa, M; Okimori, Y. 2010. Pioneering works in biochar research, Japan. *Australian Journal of Soil Research* 48(6-7):489-500.
- Osipowicz, B; Jablofiski, L; Siewifiski, A; Augustyn, D; Rymkiewicz, A. 1996. Screening tests on the biodegradation of organic coal extract by selected fungi. *Bioresource Technology* 55:195-200.
- Pietikäinen, J; Kiikkilä, O; Fritze, H. 2000. Charcoal as a habitat for microbes and its effect on the microbial community of the underlying humus. *Oikos* 89(2):231-242.
- Riveros, AS. 2010. Inducción de resistencia en plantas: interacción planta-patógeno. Ibagué, Colombia, Universidad de Tolima. 238 p.
- Roberti, R; Veronesi, A; Cesari, A; Cascone, A; Di Berardino, I; Bertini, L; Caruso, C. 2008. Induction of PR proteins and resistance by the biocontrol agent *Clonostachys rosea* in wheat plants infected with *Fusarium culmorum*. *Plant Science* 175(3):339-347.
- Rondon, MA; Lehmann, J; Ramírez, J; Hurtado, M. 2006. Biological nitrogen fixation by common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) increases with bio-char additions. *Biology and Fertility of Soils* 43(6):699-708.
- Saadi, I; Laor, Y; Medina, S; Krassnovsky, A; Raviv, M. 2010. Compost suppressiveness against *Fusarium oxysporum* was not reduced after one-year storage under various moisture and temperature conditions. *Soil Biology and Biochemistry* 42(4):626-634.
- Scarlett, CM; Fletcher, JT; Roberts, P; Lelliott, RA. 1978. Tomato pith necrosis caused by *Pseudomonas corrugata* n. sp. *Annals of Applied Biology* 88(1):105-114.
- Singh, R; Sharma, RR; Kumar, S; Gupta, RK; Patil, RT. 2008. Vermicompost substitution influences growth, physiological disorders, fruit yield and quality of strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Bioresource Technology* 99(17):8507-8511.
- Sohi, S; Lopez-Capel, E; Krull, E; Bol, R. 2009. Biochar, climate change and soil: A review to guide future research. CSIRO Land and Water Science Report 05/09. p. 64.
- Steiner, C; Teixeira, WG; Lehmann, J; Zech, W. 2004. Microbial response to charcoal amendments of highly weathered soils and Amazonian Dark Earths in Central Amazonia *In* Glaser, B;

- Woods, WI. eds. 2004. Amazonian Dark Earth: explorations in space and time. Heidelberg, Springer Verlag. 195-212 p.
- Steiner, C; Das, KC; Garcia, M; Förster, B; Zech, W. 2008a. Charcoal and smoke extract stimulate the soil microbial community in a highly weathered xanthic Ferralsol. *Pedobiologia* 51(5-6):359-366.
- Steiner, C; Glaser, B; Teixeira, WG; Lehmann, J; Blum, WEH; Zech, W. 2008b. Nitrogen retention and plant uptake on a highly weathered central Amazonian Ferralsol amended with compost and charcoal. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science-Zeitschrift Fur Pflanzenernahrung Und Bodenkunde* 171(6):893-899.
- Steiner, C; Rodrigues de Arruda, M; Teixeira, WG; Zech, W. 2008c. Soil respiration curves as soil fertility indicators in perennial central Amazonian plantations treated with charcoal, and mineral or organic fertilisers. *Tropical Science*:13 p.
- Stone, AG; Vallad, GE; Cooperband, LR; Rotenberg, D; Darby, HM; James, RV; Stevenson, WR; Goodman, RM. 2003. Effect of Organic Amendments on Soilborne and Foliar Diseases in Field-Grown Snap Bean and Cucumber. *Plant Disease* 87(9):1037-1042.
- Uvarov, AV. 2000. Effects of smoke emissions from a charcoal kiln on the functioning of forest soil systems: a microcosm study. *Environmental Monitoring and Assessment* 60(3):337-357.
- Vallad, G. 2003. Plant foliar disease suppression mediated by composted forms of paper mill residuals exhibits molecular features of induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 63(2):65-77.
- Vallad, GE; Goodman, RM. 2004. Review & interpretation. Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture. *Crop Science* 44:1920-1934.
- van Bruggen, A. 1995. Plant disease severity in high-input compared to reduced-input and organic farming systems. *Plant disease* 79(10):976-984.
- Van Loon, LC. 1997. Induced resistance in plants and the role of pathogenesis-related proteins. *European Journal of Plant Pathology* 103:753-765.
- van Staden, J; Sparg, SG; Kulkarni, MG; Light, ME. 2006. Post-germination effects of the smoke-derived compound 3-methyl-2H-furo[2,3-c]pyran-2-one, and its potential as a preconditioning agent. *Field Crops Research* 98:98-105.
- Vinale, F; Sivasithamparam, K; Ghisalberti, E; Marra, R; Woo, S; Lorito, M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40(1):1-10.
- Walters, D; Heil, M. 2007. Costs and trade-offs associated with induced resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 71(1-3):3-17.
- Warnock, D; Lehmann, J; Kuyper, T; Rillig, M. 2007. Mycorrhizal responses to biochar in soil – concepts and mechanisms. *Plant and Soil* 300(1):9-20.
- Wengel, M; Kothe, E; Schmidt, CM; Heide, K; Gleixner, G. 2006. Degradation of organic matter from black shales and charcoal by the wood-rotting fungus *Schizophyllum commune* and release of DOC and heavy metals in the aqueous phase. *The Science of the total environment* 367(1):383-93.

Yan, Z; Reddy, MS; Ryu, C-M; McInroy, JA; Wilson, M; Kloepper, JW. 2002. Induced systemic protection against Tomato Late Blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytophology* 92(12):1329-1333.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización

El presente estudio se conformó por cuatro experimentos, tres de ellos se realizaron en los invernaderos de la unidad de entomología y control microbial del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), y el cuarto experimento se realizó en campo, en una parcela montada en la misma institución. El CATIE se ubica en el cantón Turrialba, provincia de Cartago, Costa Rica, a 9° 55' 21'' de Latitud Norte y 83° 39' 40'' de Longitud Oeste y a una altitud de 602 msnm. De acuerdo a los registros climáticos de la estación meteorológica del CATIE, la precipitación anual promedio es de 2698 mm, la humedad relativa promedio de 88% y la temperatura promedio es 21,8°C, con un mínimo de 18°C y un máximo de 27,5°C. En los invernaderos, la temperatura promedio fue de 28.03°C.

3.2 Evaluación del crecimiento y de la producción de biomasa de plantas de tomate sometidas a la aplicación de biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos y microorganismos benéficos

3.2.1 *Material vegetativo y sustrato*

Todas las plántulas utilizadas en la presente investigación fueron compradas a un proveedor local (Villaplants Costa Rica S.R.L., Cartago, Costa Rica). Las plántulas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) híbridos “Montaña Plus”, fueron seleccionadas por ser utilizadas en forma frecuente en la región, además de que al mantener un tamaño pequeño ofrecen mayores ventajas para su manejo. Un total de 140 plántulas fueron trasplantadas, 30 a 40 días después de la germinación, en macetas de plástico con una capacidad de 2 kg. Las plantas se mantuvieron bajo el invernadero durante todo el periodo de evaluación, a una temperatura promedio de 28°C. El riego se realizó por goteo tres veces al día, de esta manera se mantuvo un nivel adecuado de humedad del sustrato. Para efectos de control de la mosca blanca (*Bemisia tabaci*), se realizó dos pulverizaciones de una suspensión ajustada a 5×10^7 conidios/ml del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* (ECOcontrol B45 PM en forma de polvo, 20% ingredientes activos) y se ubicaron trampas adherentes de color amarillo entre cada línea de plantas.

El suelo utilizado en este experimento fue extraído del sector “Campo Gamma” ubicado en la Finca Experimental del CATIE, Turrialba. Este fue seleccionado por su baja calidad, caracterizada por un pH bajo, un contenido en nutrientes muy bajo y una textura arcillosa pronunciada (30.4% arena,

21.7% limo, 47.9% arcilla). Para una mejor aeración del sustrato, el suelo fue mezclado con cascara de arroz (0.4% del peso de suelo) y se agregó 0.03% de cal viva para subir el pH. En el Cuadro 1 se describen los diferentes tratamientos evaluados.

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos utilizados en el experimento de crecimiento y producción de biomasa del tomate. Turrialba, Costa Rica, 2011.

Tratamiento	Código
Testigo	T
Testigo + biocarbón	B
Gallinaza	G
Gallinaza + biocarbón	GB
Lombricompost	L
Lombricompost + biocarbón	LB
Lombricompost + <i>Trichoderma harzianum</i>	TR
Lombricompost + <i>T. harzianum</i> + biocarbón	TRB
Lombricompost + <i>Bacillus subtilis</i>	S
Lombricompost + <i>B. subtilis</i> + biocarbón	SB
Lombricompost + <i>T. harzianum</i> + <i>B. subtilis</i>	TRS
Lombricompost + <i>T. harzianum</i> + <i>B. subtilis</i> + biocarbón	TRSB

El biocarbón utilizado fue procesado en la península de Osa, en el sur-oeste de Costa Rica, a partir de plantas de bambú (*Bambusa vulgaris*). Este material fue producido en tres hornos de 220 litros con una capacidad productiva de 15-20 kg cada uno. El proceso de pirólisis inicio a una temperatura de 300°C después de un periodo de combustión de 1 a 3 horas en función del grado de humedad del bambú, y fue mantenido durante 45-75 minutos durante los cuales la temperatura alcanzó 450-500°C. La composición química del biocarbón obtenido fue determinada en el Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica (UCR), los resultados de este análisis se presentan en la cuadro 2. El biocarbón fue molido y tamizado de tal forma que se obtuvieron partículas finas con un tamaño máximo de 2 mm, permitiendo de esta manera una buena incorporación al suelo y la obtención de un sustrato de mayor área de intercambio catiónico. El biocarbón se aplicó en una dosis de 1% (peso sustrato).

El lombricompost utilizado fue comprado de la empresa Lombrítica S.A., ubicada en Cartago, Costa Rica, la cual provee un abono de calidad estandarizada en toda la región. El abono fue aplicado en una dosis igual al 25% del peso total del sustrato. La gallinaza fue comprada a un proveedor local (granja avícola GR, Chitaría, Turrialba, CR), y se aplicó a una dosis de 2% del peso del sustrato. Ambos abonos fueron mezclados hasta obtener sustratos homogéneos. Los análisis químicos de estos

abonos y del biocarbón se presentan en el Cuadro 2. Análisis de suelo de cada tratamiento fueron realizados por el Laboratorio de Análisis de Suelos, Tejidos Vegetal y Aguas del CATIE (ver Anexo 1).

Cuadro 2. Análisis químico del biocarbón y de los fertilizantes orgánicos empleados en el experimento de crecimiento y producción de biomasa del tomate. Turrialba, Costa Rica, 2011.

Características del biocarbón y los abonos				
		Biocarbón*	Lombricompost**	Gallinaza**
Elemento químico	Unidad	Valor	Valor	Valor
C	%	60,6	12,5	20,9
N	%	0.33	1	2
P	%	0.02	0,24	1,4
K	%	0.68	1,91	2,41
Ca	%	0.13	0,75	12.35
Mg	%	0.07	0,33	0,63
S	%	0.07	—	—
Cu	mg l ⁻¹	1	108	102
Zn	mg l ⁻¹	30	80	335
Mn	mg l ⁻¹	378	1062	833
Fe	mg l ⁻¹	383	4259	1556
B	mg l ⁻¹	2	—	—
pH (H ₂ O)	unidad pH	8,06	—	—

* análisis realizado en el Centro de Investigación Agronómica (CIA) de la Universidad de Costa Rica (UCR)

** análisis realizado en el Laboratorio de Análisis de Suelos, Tejido Vegetal y Aguas del CATIE

3.2.2 Cultivo e inoculación de los microorganismos benéficos

Dos cepas de microorganismos fueron utilizados en este estudio: (1) *Bacillus subtilis* AB4410, aislado en pastizales de Cartago y mantenida en los Laboratorios de Control Microbial del CATIE, y (2) *Trichoderma harzianum* IMI 395248, aislado por investigadores de CABI International en frutos de *Theobroma gileri* (Sterculiaceae) en Ecuador. Las suspensiones de estos microorganismos se prepararon en el laboratorio de control microbioal del CATIE.

Trichoderma harzianum

El ascomicete *T. harzianum* se cultivó en platos petri de 25 ml conteniendo Agar Papa Dextrosa (PDA) previamente autoclavado durante 40 minutos a 121°C. Después de un periodo de crecimiento del micelio de 10 días en cámaras de crecimiento continuo, a una temperatura constante de 26.5°C, los platos fueron expuestos 12 días a la luz solar con el objeto de inducir la producción de esporangios y esporas. Una vez que la esporulación terminó (presencia de una capa de color verde en la superficie del micelio), los platos se almacenaron a una temperatura de 4°C.

Una semana antes del trasplante, se preparó el inóculo a partir de un aislamiento almacenado anteriormente. Se lavó los conidios presentes en la superficie del micelio con agua destilada y se realizó un conteo con un hemocitómetro. La suspensión se ajustó a 10^6 conidios/ml. Una dosis de 100 ml de la suspensión de *T. harzianum* se aplicó directamente al sustrato (suelo + 25% de lombricompost). Las macetas inoculadas se cubrieron con sarán hasta el trasplante y fueron regadas periódicamente para conservar un alto grado de humedad necesario para el buen desarrollo del microorganismo.

Bacillus subtilis

La bacteria *B. subtilis* se cultivó en platos petri de 25 ml conteniendo Agar Nutritivo (3 g de extractos de res Bacto, 5 g de Bacto peptone y 15 g de Bacto agar) previamente autoclavado durante 40 minutos a 121°C. Se realizaron rayados a partir del aislamiento de base y después de un periodo de crecimiento de tres días, los platos se conservaron en refrigeración a 4°C.

Tres días antes del trasplante, se preparó el inóculo a partir de un aislamiento fresco (rayado realizado 3 días antes). Se lavó la superficie del medio cubierto por las colonias de bacterias con agua destilada y se realizó un conteo con un hemocitómetro. La suspensión se ajustó a 10^6 conidios/ml. Una dosis de 100 ml de la suspensión de *B. subtilis* se aplicó directamente al sustrato (suelo + 25% de lombricompost). Las macetas inoculadas se cubrieron con sarán hasta el trasplante y se conservó un alto grado de humedad en las macetas necesario para el buen desarrollo de los microorganismos.

3.2.3 *Diseño experimental*

El experimento se realizó bajo un diseño en bloques completamente aleatorizados con lo cual se eliminó el efecto de la luz sobre las diferentes repeticiones debido a la orientación del invernadero según la posición del sol a lo largo del día. Los 12 tratamientos (una planta por tratamiento) y 10 repeticiones se colocaron en las mesas de manera que formaron 10 bloques (un bloque = una repetición), tal como se presenta en la Figura 1.

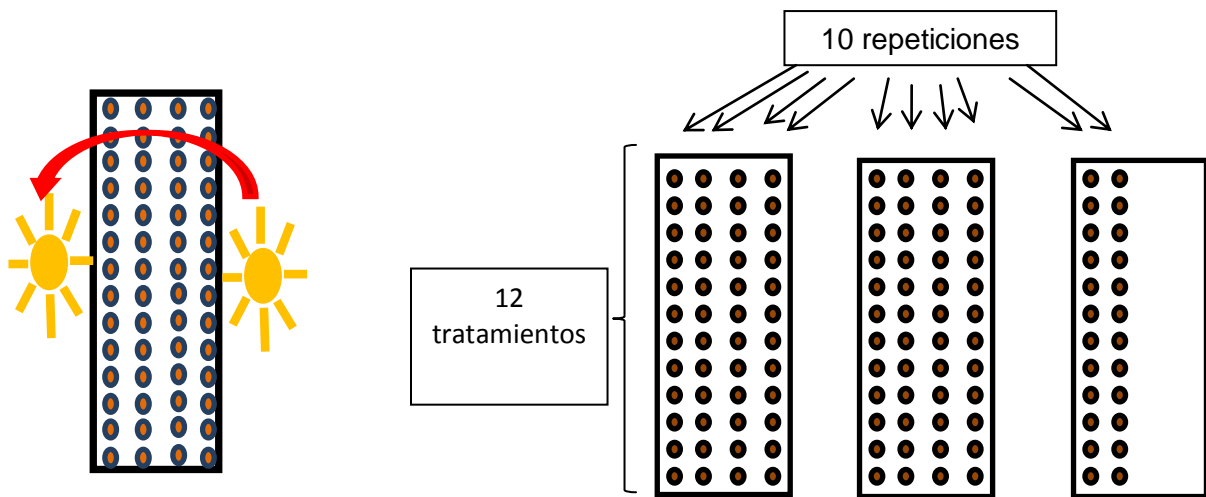


Figura 1: Disposición de las macetas en función del movimiento del sol (izquierda) y disposición de las macetas en las mesas (derecha) dentro del invernadero para el experimento de crecimiento y producción de biomasa del tomate. Turrialba, Costa Rica, 2011.

3.2.4 Variables evaluadas

El efecto de los tratamientos sobre las plantas fue evaluado mediante tres variables de respuesta: crecimiento, número de hojas y peso seco de la parte vegetativa. La altura de las plantas fue medida semanalmente, desde el nivel del suelo hasta el meristema apical. Para compensar la variabilidad inicial del tamaño de las plántulas, el crecimiento semanal de cada individuo se midió a modo de porcentaje, el mismo que representa el cambio en relación a la medida inicial de cada individuo, según la fórmula descrita y utilizada por Graber *et al.* (2010) que se presenta a continuación:

$$C = (B/A) * 100$$

En donde:

A=altura inicial de la planta

B=altura de la plantas a la semana dada

C=tasa de crecimiento calculada en porcentaje.

Para la evaluación del peso seco, se seccionó cada planta al nivel de la base del tallo, las partes seccionadas se ubicaron en bolsas de papel debidamente rotuladas, y se llevaron al horno a una temperatura de 70°C durante 72 horas.

3.2.5 Análisis de los datos

Para determinar la influencia de los tratamientos sobre las variables de respuesta estudiadas (crecimiento, producción de hojas y producción de biomasa), se realizó un análisis de varianza

(ANOVA) con un diseño en bloques completos dispuestos al azar (para las variables producción de hojas y peso seco) y un diseño en parcelas divididas con un arreglo en bloques (para la variable crecimiento), bajo la teoría de los modelos lineales mixtos. Los bloques fueron declarados en el modelo como efecto aleatorio.

El modelo de ANOVA para las variables número de hojas y peso seco utilizado en el presente experimento se describe como:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij} : variable de respuesta del i -ésimo tratamiento en la j -ésimo bloque

μ : media general

T_i : efecto de la i -ésima aplicación de fertilizante, microorganismo y biocarbón

B_j : efecto aleatorio del j -ésimo bloque

ε_{ij} : término de error que se distribuye normal independiente con media cero y varianza constante

En el caso de la variable de crecimiento, el modelo utilizado se describe como:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_j + \delta_{ij} + b_k + c_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

Con

Y_{ijk} : variable de respuesta del i -ésimo tratamiento, j -ésima semana después del trasplante (SDT) y el k -ésimo bloque

μ : media general

α_i : efecto de la i -ésima aplicación de fertilizante y biocarbón

γ_j : efecto de la j -ésima SDT

δ_{ij} : efecto adicional (interacción) para la combinación de los niveles i de tratamiento y j de tiempo

$b_k, c_{ik}, \varepsilon_{ijk}$: efectos aleatorios de los bloques, de las parcelas dentro de los bloques y de los errores experimentales

Se comprobaron los supuestos del ANOVA con gráficos diagnósticos (cuantiles de los términos de error, gráficos de residuos y gráficos de residuos vs. predichos). Las variables cumplieron con el

supuesto de Normalidad. Los datos de crecimiento fueron transformados a logaritmo natural con el fin de corregir la heterogeneidad de varianza. Para el peso seco se ajustó una función de varianzas heterogéneas; en este último caso, se evaluaron todas las funciones y se escogió el mejor ajuste según los criterios de *Akaike* (AIC) y de información *Bayesiano* (BIC) (ver Anexo 2). En las variables donde existieron diferencias estadísticas entre los tratamientos, se realizaron comparaciones de medias LSD Fisher ($p \leq 0.05$) con el fin de identificar estas diferencias. En el caso de la variable de crecimiento se utilizó la prueba de comparación de medias DGC ($p \leq 0.05$), esta prueba permite formación de grupos excluyentes y no transición entre tratamientos.

3.3. Efecto de la combinación de biocarbón con fertilizantes orgánicos y microorganismos benéficos sobre el comportamiento alimenticio de la mosca blanca (*Bemisia tabaci*)

3.3.1. Material vegetativo, cría e infestación de mosca blanca

Las plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) híbridos “Montaña Plus” utilizadas en este experimento fueron seleccionadas al azar del grupo de plantas utilizadas en el experimento descrito anteriormente (ver 2.2). Las plantas de cuatro bloques (repeticiones) fueron extraídas luego de la última medición de crecimiento y se ubicaron en un segundo invernadero (CATIE, Turrialba, Costa Rica). Las plantas fueron regadas diariamente y mantenidas a una temperatura promedio de 28°C.

Los insectos utilizados se criaron en una cámara ubicada bajo invernadero (CATIE, Turrialba) y fueron alimentados con plantas de tomate (*L. esculentum*) y de berenjena (*Solanum melongena*). Se seleccionaron 16 plantas de berenjena y cuatro de tomate con un alto volumen de infestación por la mosca blanca. Las plantas se trasladaron al invernadero experimental y se distribuyeron en forma equidistante dentro de cuatro círculos de plantas de tomate a evaluar (una repetición por círculo) tal como se presenta en la Figura 2. Cada círculo, que representa un bloque, cuenta con un individuo de cada tratamiento (12 en total, ver cuadro 1 del experimento anterior).

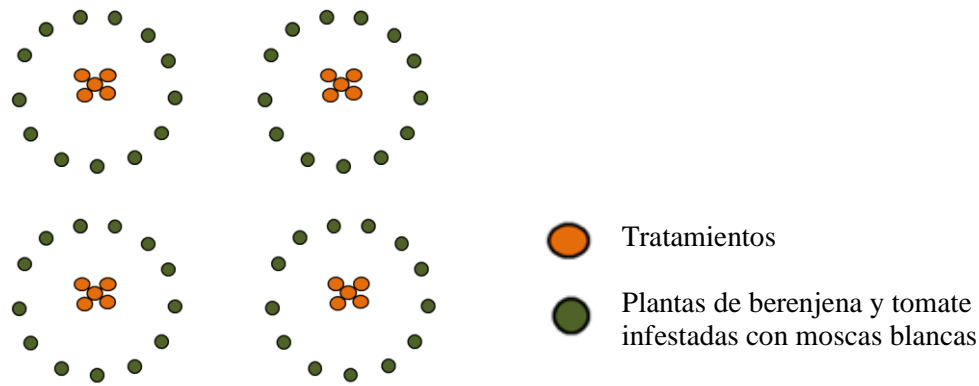


Figura 2. Diseño del experimento de escogencia irrestricta representando cuatro círculos de macetas (cuatro bloques de 12 tratamientos), al centro de los cuales se ubicaron cuatro plantas de berenjena y una de tomate infestadas por moscas blancas. Turrialba, Costa Rica, 2011.

3.3.2. Variables evaluadas

Se realizó un conteo de los insectos hospedados en las plantas 1, 2, 8 y 15 días después de la infestación (DDI), según la metodología utilizada por Bagnarello *et al.* (2009). Cada conteo se efectuó por la mañana, preferiblemente entre las 6h00 y 10h00, momento de menor actividad de los insectos (Jovel *et al.* 2000). A los 15 DDI, se realizó cortes circulares de 3 hojas seleccionadas en forma aleatoria en cada una de las plantas con un sacabocado de 3.3 cm de diámetro. Sobre cada círculo, se contó el número de ninfas de todos los estadios de desarrollo a través de un estereoscopio.

3.3.3. Análisis de datos

Para determinar la influencia de los diferentes tratamientos sobre el número de adultos/planta y número de ninfas/cm² (variables de respuesta), se realizaron análisis de varianza (ANOVA) bajo la teoría de los modelos lineales mixtos con un diseño en bloques completos distribuidos al azar (para la variable número de ninfas) y con un diseño en parcelas divididas con arreglo en bloques (en el caso de la variable número de adultos). Los bloques fueron declarados en el modelo como efecto aleatorio. En el caso del conteo de insectos adultos, se declaró el número de hojas de las plantas como covariable. El modelo de ANOVA para la variable de respuesta número de ninfas/cm² utilizado en el presente experimento se describe como:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + \varepsilon_{ij}$$

Dónde:

Y_{ij} : variable de respuesta del i -ésimo tratamiento en la j -ésima repetición

μ : media general

T_i : efecto de la i -ésima aplicación de fertilizante, microorganismo y biocarbón

B_j : efecto aleatorio del j -ésimo bloque

ε_{ij} : término de error que se distribuye normal independiente con media cero y varianza constante

En el caso del número de adultos/planta, el modelo utilizado para el diseño en parcelas divididas en un arreglo en bloques es:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_j + \delta_{ij} + b_k + c_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

Con

Y_{ijk} : variable de respuesta del i -ésimo tratamiento, j -ésimo día después de la infestación (DDI) y el k -ésimo bloque

μ : media general

α_i : efecto de la i -ésima aplicación de fertilizante y biocarbón

γ_j : efecto del j -ésimo DDI

δ_{ij} : efecto adicional (interacción) para la combinación de los niveles i de tratamiento y j de tiempo

$b_k, c_{ik}, \varepsilon_{ijk}$: efectos aleatorios de los bloques, de las parcelas dentro de los bloques y de los errores experimentales

Se comprobaron los supuestos del ANOVA con gráficos diagnósticos (cuantiles de los términos de error, gráficos de residuos y gráficos de residuos vs. predichos). Para la variable de respuesta número de adultos/planta, que no cumplió con el supuesto de Normalidad, se realizó una transformación a raíz cuadrada. Ninguna de las dos variables cumplió el supuesto de varianzas homogéneas, lo que implicó la selección de modelos con una función de varianzas heterogéneas. Se evaluaron todas las funciones y se escogió el mejor modelo, según los criterios de *Akaike* (AIC) y del criterio de información *Bayesiano* (BIC) (ver Anexos 4). En los casos que existieron diferencias estadísticas entre los tratamientos, se realizaron comparaciones de media con la prueba LSD Fisher ($p < 0.005$).

3.4. Inducción de resistencia sistémica y supresividad del biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos, fertilizantes sintéticos y microorganismos benéficos contra *Pseudomonas corrugata* en tomate (*Lycopersicon esculentum*).

3.4.1. Material vegetativo y sustratos

En este experimento, se sembraron plantas de tomate (*L. esculentum*) híbrido “Montaña plus”. Las plántulas de 3-4 hojas fueron trasplantadas en potes de 3 kg de capacidad conteniendo los tratamientos a evaluar, y mantenidas bajo invernadero durante todo el experimento. El lombricompost se aplicó a una dosis de 25% del peso del sustrato para cada maceta, y la gallinaza a una dosis de 2% por maceta. El fertilizante mineral, receta N-P-K (10-30-10), fue aplicado a dos intervalos según las dosis recomendadas por el MAG: 5 g a 5 DDT y 20 g a 20 DDT por planta. El biocarbón de bambú fue mezclado con los sustratos a una dosis del 1% del peso. Los diferentes tratamientos se presentan en el Cuadro 4.

Cuadro 3. Presentación de los tratamientos evaluados en el experimento de inducción de resistencia sistémica y supresividad del biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos, sintético y microorganismos benéficos. Turrialba, Costa Rica.

Tratamiento	Código
Testigo	T
Testigo + biocarbón	B
Fertilización mineral	M
Fertilización mineral + biocarbón	MB
Gallinaza	G
Gallinaza + biocarbón	GB
Lombricompost	L
Lombricompost + biocarbón	LB
Lombricompost + <i>Trichoderma harzianum</i>	TR
Lombricompost + <i>T. harzianum</i> + biocarbón	TRB
Lombricompost + <i>Bacillus subtilis</i>	S
Lombricompost + <i>B. subtilis</i> + biocarbón	SB
Lombricompost + <i>T. harzianum</i> + <i>B. subtilis</i>	TRS
Lombricompost + <i>T. harzianum</i> + <i>B. subtilis</i> + biocarbón	TRSB

El suelo utilizado (análisis químico presentado en Anexo 5), de textura franca (51% arena, 32.2% limo y 18.8% arcilla) fue extraído del sector de “Las Cabras”, ubicado en la finca comercial del CATIE (Turrialba, Costa Rica). Este suelo fue tratado con Kilol LDF 100 11SL (concentración de 2.5 ml/L) y mantenido en una capa fina bajo una lona de plástico negro durante 30 días para evitar toda

contaminación por bacterias patógenas. El experimento se realizó en los invernaderos del CATIE (Turrialba, CR) a una temperatura promedio de 28°C.

3.4.2 Cultivo de los microorganismos patógenos y benéficos

La bacteria *P. corrugata* fue aislada de plántulas de tomate y chile enfermas. Muestras de las hojas y del tallo que mostraron síntomas de infección fueron recolectadas, lavadas con una solución de cloro al 2%, y dispuestas en platos petri con medios Agar Nutritivo. Tres días después, se observó el desarrollo de la bacteria y se almacenaron los aislamientos a 4°C. El patógeno fue identificado por el CIA (Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica) a través de la tecnología Biolog (programa Microlog1 4.20.05), con 99% de probabilidad (ver Anexo 6). La patogenicidad del microorganismo fue comprobada por la aparición de manchas necróticas sobre hojas de tomate sometidas a la inoculación con atomizador de una suspensión de 10^6 UFC/ml.

Los aislamientos de *Pseudomonas corrugata* se cultivaron en medios Agar Pseudomonas F (Tripone 10 g, Proteose Peptone 10 g, Dipotassium Phosphate 1.5 g, Magnesium Sulfate 1.5 g y Agar 15 g), en platos petri de 20ml durante 3 días. Los aislamientos fueron conservados a 4°C hasta su utilización ulterior.

Los dos tipos microorganismos benéficos, *Trichoderma harzianum* IMI 395248 y *Bacillus subtilis* AB4410, se cultivaron e inocularon según la misma metodología que en el primer experimento descrito (ver 2.2.5).

3.4.3. Inoculación de los microorganismos fitopatógenos

La bacteria *P. corrugata* se cultivó en un medio Agar Pseudomonas F en platos petri de 20ml y se conservó durante 48h a temperatura constante de 26.5°C. Después de este periodo, se lavó la superficie del medio con agua destilada y se filtró con filtro Watman. Se efectuó un conteo con un hemocitómetro y se ajustó una suspensión de 10^7 CFU/ml, a la cual se agregó 0.05% de tween 80 (como coadyuvante). La inoculación se hizo con un atomizador de plástico, sobre 3 foliolos de la quinta, sexta y séptima hoja de cada planta. Debido al desarrollo lento de los síntomas, se realizó una segunda inoculación 6 días después de la primera. Se atomizó una suspensión ajustada a 2×10^7 CFU/ml con 0.05% de Break Thru 100SL (BASF, coadyuvante) en la totalidad de la plantas, cubriendo la superficie del sustrato con plástico para evitar la colonización de este por la bacteria. Las plantas que no presentaron síntomas 6 días después de la segunda inoculación fueron expuestas a una tercera inoculación con una suspensión de 2×10^7 CFU/ml.

3.4.4. Variables evaluadas

La severidad de la enfermedad se evaluó utilizando la escala siguiente: 0=no síntoma; 1=de 1-10% de la superficie de la hoja infectada; 2=11-25% de la superficie de la hoja infectada; 3=26-50% de la hoja infectada; 4=51-75% de la superficie de la hoja infectada; y 5= más de 75% de la hoja infectada. Siete hojas fueron evaluadas por planta a partir de la base del tallo (las dos primera hojas no fueron tomadas en cuenta). El primer conteo se realizó 3 días después de la segunda inoculación, y se repitió cada 6 días hasta los 33 DDI.

3.4.5. Diseño experimental

El experimento se estableció según un diseño en bloques completamente aleatorizado, para eliminar el efecto de la luz sobre las diferentes repeticiones. Un total de 14 tratamientos (una planta por tratamiento), fueron dispuestos al azar en mesas de manera que formen cinco bloques (un bloque = una repetición=una mesa).

3.4.6. Análisis de los datos

Para determinar la influencia de los diferentes tratamientos sobre las variables de respuesta peso seco de la parte vegetativa y radicular, número de frutos, y de actividad microbiana, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un diseño en bloques completos distribuidos al azar y bajo la teoría de los modelos lineales mixtos. Los bloques fueron declarados en el modelo como efecto aleatorio. El modelo de ANOVA para el presente experimento se describe como:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij} : severidad, variable de respuesta del i -ésimo tratamiento en la j -ésima repetición

μ : media general

T_i : efecto de la i -ésima aplicación de fertilizante, microorganismo y biocarbón

B_j : efecto aleatorio del j -ésimo bloque

ε_{ij} : término de error que se distribuye normal independiente con media cero y varianza constante

En el caso de la evaluación de la incidencia de la necrosis medular en tomate, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un diseño en parcelas divididas en un arreglo en bloques. Los

bloques fueron declarados en el modelo como efecto aleatorio. El modelo lineal mixto utilizado para el diseño en parcelas divididas en un arreglo en bloques es:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_j + \delta_{ij} + b_k + c_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

Con

$$i=1, 2; j=1, 2; k=1, \dots, n_{ij}$$

Y_{ijk} : variable de respuesta del i -ésimo tratamiento, j -ésimo día después de la inoculación de *P. corrugata* (DDI) y el k -ésimo bloque

μ : media general

α_i : efecto de la i -ésima aplicación de fertilizante y biocarbón

γ_j : efecto del j -ésimo DDI

δ_{ij} : efecto adicional (interacción) para la combinación de los niveles i de tratamiento y j de tiempo

$b_k, c_{ik}, \varepsilon_{ijk}$: efectos aleatorios de los bloques, de las parcelas dentro de los bloques y de los errores

Se comprobaron los supuestos del ANOVA con gráficos diagnósticos (cuantiles de los términos de error, gráficos de residuos y gráficos de residuos vs. predichos). Todas las variables de respuesta cumplieron con el supuesto de Normalidad, pero los datos de peso seco de la parte vegetativa y radicular presentaron varianzas heterogénea. Para corregir este problema, se transformaron los datos de peso seco a raíz cuadrada y se seleccionó un modelo con una función de varianzas heterogéneas para cada una de estas variables. Se evaluaron todas las funciones y se escogió el mejor modelo, según los criterios de *Akaike* (AIC) y del criterio de información *Bayesiano* (BIC) (ver Anexo 7). En caso de que existan diferencias estadísticas entre los tratamientos, se realizaron comparaciones de medias según el método LSD ($p \leq 0.05$).

3.5 Experimento en campo: producción y resistencia contra enfermedades de plantas de pepino y tomate sometidas a la aplicación de biocarbón combinado con fertilizantes sintéticos, fertilizantes orgánicos y microorganismos benéficos

3.5.1. Material vegetativo, preparación de la parcela y sustratos

Una parcela de 190 m² fue dividida en dos áreas de siembra, una en donde se sembró el tomate (*Lycopersicon esculentum*) híbrido “Montaña plus” y en la otra, pepino (*Cucumis sativus*) híbrido “Villa”. Previo al trasplante, se preparó el terreno junto a la Unidad de Fitoprotección del CATIE (Turrialba, Costa Rica), se dispuso 10 camas de siembra, mezcladas con suelo traído del sector “Las Cabras” de la finca comercial del CATIE (Turrialba, CR), para disminuir las probabilidades de contaminación de las plantas por *Ralstonia solanacearum* (llamado marchitez bacterial o malla), patógeno presente en los suelos de la zona desde mucho tiempo. Se aplicó a toda la parcela 60 t/ha de compost (análisis disponible en Anexo 8) previamente preparado (compuesto de 86% bagasa, 9.5% cachaza y 4,5% gallinaza), como fertilizante base para todos los tratamientos. Cada cama de siembra tuvo una altura aproximada de 0.3 m y un ancho de 0.5 m. En total se establecieron 7 subparcelas de un metro de largo en los cuales se aplicaron los diferentes tratamientos. Todas las líneas de siembra fueron cubiertas con un techo de plástico tomatero para evitar el desarrollo de patógenos por exceso de humedad. La temperatura promedio durante el experimento fue de 22.7°C, con un máximo de 29.7°C y un mínimo de 17.2°C (datos tomados en la estación meteorológica del CATIE). En el Cuadro 3 se presentan los tratamientos evaluados en este experimento.

Cuadro 4. Descripción de los tratamientos utilizados en el experimento de evaluación en campo de la producción y resistencia contra enfermedades del pepino y tomate. Turrialba, Costa Rica, 2011.

Tratamiento	Código
Testigo	T
Testigo + biocarbón	B
Fertilización mineral	M
Fertilización mineral + biocarbón	MB
Gallinaza	G
Gallinaza + biocarbón	GB
Gallinaza + biocarbón + <i>Bacillus subtilis</i> + <i>Trichoderma harzianum</i>	GB + microorg.

La gallinaza, aplicada en una dosis de 2 kg/m², fue mezclada con el suelo de cada surco 8 días antes del trasplante. La fertilización química se realizó con granulados de fórmula 10-30-10, y se aplicó a una distancia entre 5 y 10 cm del tallo, según las dosis recomendadas por el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) para los dos tipos de planta. Para el tomate, se aplicó 5 g/planta cinco días después

del trasplante (DDT) y 20 g/planta a 20 DDT. Para el pepino se aplicó una sola dosis de 43 g/planta al trasplante. El biocarbón de bambú (*Bambusa vulgaris*), descrito en el punto 2.2.1, fue fragmentado en pedazos de tamaños heterogéneos y aplicado a una dosis de 20 t/ha (1kg/sub-parcela) a los tratamientos B, GB, GBM y SB una semana antes del trasplante.

Dos tipos de microorganismos se inocularon simultáneamente a los tratamientos GBM: *Trichoderma harzianum* IMI 395248 y *Bacillus subtilis* AB4410. Una suspensión se realizó según la misma metodología que para los experimentos anteriores (ver 2.2.3), y se ajustó a una concentración de 2×10^6 conidios/ml para *T. harzianum* y 2×10^6 cfu/ml para *B. subtilis*. La combinación de las dos preparaciones se aplicó a 50 ml/planta directamente después del trasplante a los tratamientos GBM.

3.5.2 Diseño experimental

Para cada tratamiento, aplicado a sub-parcelas de 0.5 m^2 , se realizaron 5 repeticiones (bloques) dispuestas en 5 líneas, lo que representa un total de 35 sub-parcelas (7 tratamientos x 5 bloques) para cada tipo de planta, como representado en la Figura 3. Tres plantas de tomate y pepino se sembraron a una distancia de 0.4 m entre ellas en cada sub-parcela de cada tratamiento, todas dispuestas según un diseño completamente aleatorizado en cada línea o bloque. Las sub-parcelas fueron dispuestas a una distancia de 0.8 m entre ellas.

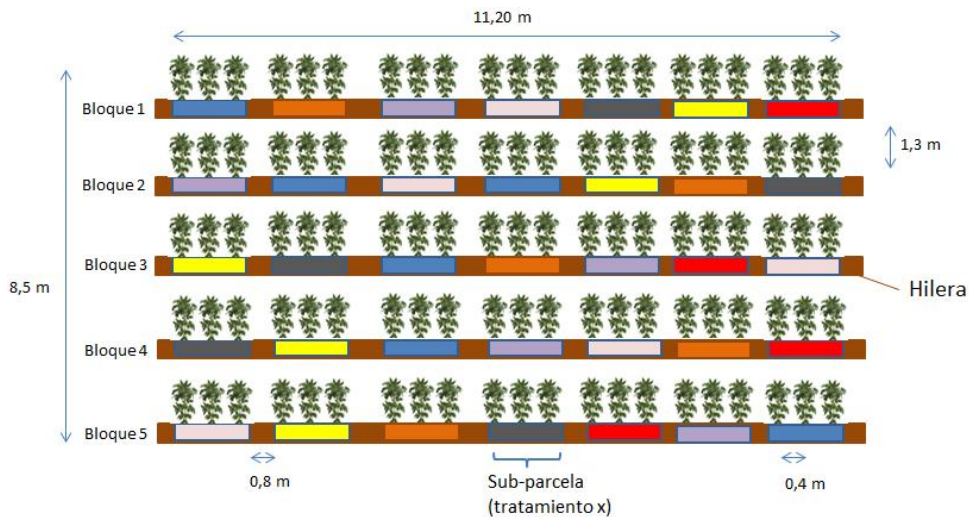


Figura 3. Esquema del diseño experimental del experimento de campo, representando la parcela sembrada con plantas de tomate, donde cada tratamiento está simbolizado por un color diferente. Turrialba, Costa Rica, 2011.

3.5.3. Manejo de los cultivos

Las plántulas de tomate y pepino de 30 a 40 días fueron trasplantadas a una distancia de 0.4 m entre ellas en cada sub-parcela (3 plantas/subparcela). Estas fueron amaradas constantemente, se deshirió a mano toda la parcela regularmente y las plantas de tomate fueron deshijadas (se sacaron los chupones o hijos). El riego fue proporcionado por goteo, asegurando un aprovechamiento óptimo del agua. Para disminuir el impacto de *P. syringae* sobre el cultivo de tomate, se realizaron tres aplicaciones de Kilol LDF 100 11SL (concentración de 2.5 ml/L) a todas las plantas. En el caso del pepino, para el control de la vaquita (*Diabrotica variegata* y *Diabrotica porracea*, Coleoptera: Chrysomelidae), se realizaron varias aplicaciones del controlador biológico *Beauveria bassiana* (suspensión a concentración de 5×10^7 conidios/ml) en toda la parcela. También se realizó dos atomizaciones con caldo bordelés (CuSO_4) para el control del mildiu veloso (*Pseuoperonospora cubensis*).

3.5.4. Variables evaluadas

Debido que las plantas de tomates padecieron del ataque de *P. syringae*, no llegaron a producción. Entonces se evaluó la incidencia (en % de plantas enfermas) de la enfermedad contando el número de plantas enfermas a diferentes intervalos de tiempo: días 21, 31, 38, 44 y 53.

Para determinar la respuesta de las plantas de pepino a los diferentes tratamientos, se evaluó la producción de frutos por sub-parcela. Se realizaron 4 cosechas de los frutos de cada sub-parcela que fueron contados y pesados, y los resultados de estas dos variables fueron divididos por el número de plantas vivas por sub-parcela.

Se realizó un muestreo de suelo con el fin de realizar análisis químico y microbiológico. Este último consistió en la determinación de la respiración microbiana, biomasa microbiana y amonificación anaeróbica. La respiración microbiana se determinó por fumigación e incubación en cloroformo durante 48 horas. La extracción se realizó en tiempo inicial y final con sulfato de potasio 0.5 N, y se determinó el carbono orgánico con el método Nelson-Sommers para extractos. La respiración microbiana se determinó incubando las muestras en una solución de NaOH 0.05 N en vasos Mason herméticos durante 24 horas a 25°C. El equivalente CO_2 se determinó por titulación con HCL 0.05 N. La amonificación anaeróbica se determinó incubando las muestras herméticamente durante 7 días. La extracción se realizó en T_0 y en T_7 con KCL 1 N. La determinación del amonio se hizo por destilación. Las metodologías utilizadas están descritas por Anderson y Ingram (1992).

3.5.5. *Análisis de los datos*

Para determinar la influencia de los diferentes tratamientos sobre la variable de respuesta producción de frutos de pepino, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un diseño en bloques completos distribuidos al azar y bajo la teoría de los modelos lineales mixtos. Los bloques fueron declarados en el modelo como efecto aleatorio. El modelo de ANOVA para el presente experimento se describe como:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + B_j + \varepsilon_{ij}$$

Y_{ij} : variable de respuesta del i -ésimo tratamiento en la j -ésima repetición

μ : media general

T_i : efecto de la i -ésima aplicación de fertilizante, microorganismo y biocarbón

B_j : efecto aleatorio del j -ésimo bloque

ε_{ij} : término de error que se distribuye normal independiente con media cero y varianza constante

En el caso de la evaluación de la incidencia de la marchitez bacterial, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con un diseño en parcelas divididas en un arreglo en bloques. Los bloques fueron declarados en el modelo como efecto aleatorio. El modelo lineal mixto utilizado para el diseño en parcelas divididas en un arreglo en bloques es:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \gamma_j + \delta_{ij} + b_k + c_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

Con

$$i=1, 2; j=1,2; k=1, \dots, n_{ij}$$

Y_{ijk} : variable de respuesta del i -ésimo tratamiento, j -ésima día después de del trasplante (DDT) y el k -ésimo bloque

μ : media general

α_i : efecto de la i -ésima aplicación de fertilizante y biocarbón

γ_j : efecto del j -ésimo DDT

δ_{ij} : efecto adicional (interacción) para la combinación de los niveles i de tratamiento y j de tiempo

$b_k, c_{ik}, \varepsilon_{ijk}$: efectos aleatorios de los bloques, de las parcelas dentro de los bloques y de los errores

Se comprobaron los supuestos del ANOVA con gráficos diagnósticos (cuantiles de los términos de error, gráficos de residuos y gráficos de residuos vs. predichos). Ambas variables de respuesta cumplieron con el supuesto de Normalidad, y solo la variable producción de pepino presentó una varianza heterogénea. Para corregir este problema, se seleccionó un modelo con una función de varianzas heterogéneas. Se evaluaron todas las funciones y se escogió el mejor modelo, según los criterios de *Akaike* (AIC) y del criterio de información *Bayesiano* (BIC) (ver Anexo 9). En caso de que existan diferencias estadísticas entre los tratamientos, se realizaron comparaciones de medias según el método LSD ($p \leq 0.05$).

4 RESULTADOS

4.1. Evaluación del crecimiento y de la producción de biomasa de plantas de tomate sometidas a la aplicación de biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos y microorganismos benéficos

En este experimento, las plantas de tomate sometidas a los diferentes tratamientos presentaron diferencias significativas para las tres variables evaluadas: tasa de crecimiento ($F=5.93, p<0.001$), número de hojas ($F=12.97, p<0.001$) y peso seco de la parte vegetativa ($F = 53.60, p < 0.001$). Como se presenta en las Figuras 4 y 5, los dos tipos de fertilizantes aplicados (gallinaza y lombricompost) aumentaron significativamente el crecimiento, el número de hojas y el peso seco de las plantas.

En ausencia de inoculación de microorganismos, no se encontró efecto significativo del biocarbón sobre las plantas fertilizadas con lombricompost (tratamientos LB y L). En cuanto a los tratamientos con gallinaza (GB y G, con y sin biocarbón respectivamente), el crecimiento inicial fue influido de manera negativa por el biocarbón, obteniendo una disminución significativa del 8% en la segunda semana. Esta tendencia se invirtió después de la segunda semana, y el biocarbón aumentó significativamente el crecimiento al 6% y 5% en las semanas 6 y 8 respectivamente. A partir de la segunda semana, los tratamientos G y GB presentaron promedios de crecimiento siempre inferiores a los de los tratamientos L y LB. Las plantas sometidas a la aplicación de gallinaza sin biocarbón mostraron un crecimiento significativamente inferior de 18%, 17% y 21% comparado con el tratamiento L en las semanas 6,7 y 8, mientras que en presencia de biocarbón, la aplicación del mismo

abono disminuyó solamente el crecimiento durante la semana 7 (con resultados de 15% y 10% inferiores a L y LB respectivamente) (ver Anexo 10).

En ausencia de fertilización, el tratamiento con biocarbón solo (B) presentó una tendencia a aumentar el crecimiento de las plantas comparado con el testigo absoluto (T), con un promedio de 10% de incremento a través de las siete semanas. Sin embargo, la diferencia fue significativa solamente las dos últimas semanas de evaluación, con un aumento de 19% y 23% del crecimiento en la semana 7 y 8 respectivamente.

El efecto más fuerte observado sobre el crecimiento de las plantas se observó con el tratamiento lombricompost inoculado con *Bacillus subtilis* en presencia de biocarbón (SB). Este tratamiento obtuvo constantemente los mejores resultados y aumentó el crecimiento de las plantas un 13% en promedio comparado con L, con un efecto significativo en la semana 4, 5, 6 y 8 y un incremento de 22%, 14%, 9% y 9% respectivamente. En comparación con el tratamiento S (lombricompost + *B. subtilis*), la aplicación de biocarbón aumentó un 17% el crecimiento en promedio a través de las 7 semanas, presentando diferencias significativas las semanas 4, 5, 6 y 8 e incrementos de 23%, 21%, 15% y 12% respectivamente. La inoculación de *B. subtilis* sin presencia de biocarbón en el sustrato no presentó efecto significativo en comparación con L.

Respecto a los tratamientos inoculados con *Trichoderma harzianum*, no se encontró efecto significativo sobre el crecimiento de las plantas hasta la sexta semana. Una disminución del 14% y 9% del crecimiento comparado con L y TRB (respectivamente) fue observada, mientras que este último no presentó efecto significativo comparado con L. La combinación de *B. subtilis* y *T. harzianum* no presentó efecto significativo sobre el crecimiento de las plantas. Tampoco se encontraron diferencias significativas con la aplicación de biocarbón con estos microorganismos.

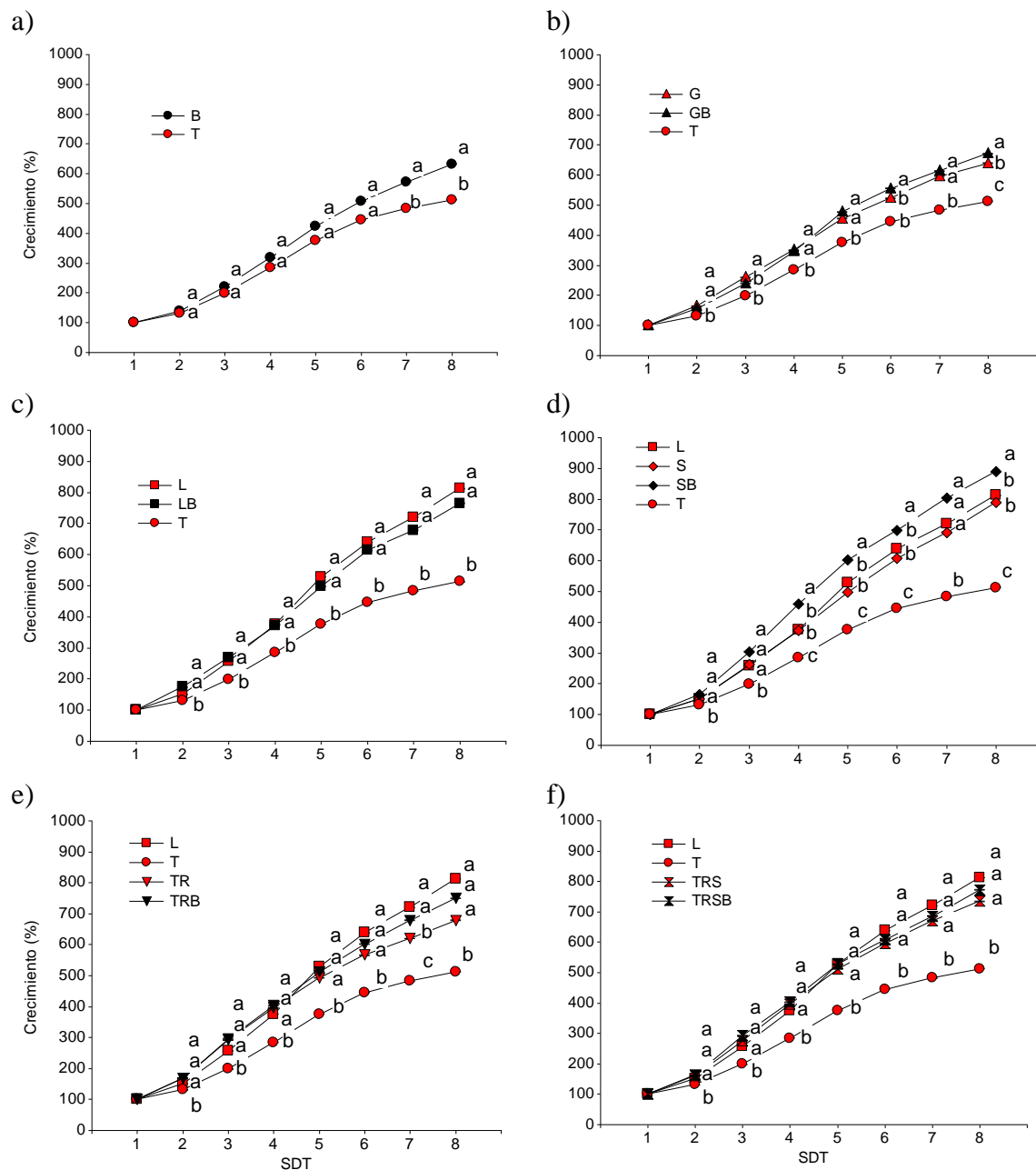


Figura 4. Crecimiento promedio (expresado en porcentajes) en función de la semana después del trasplante (SDT) de las plantas de tomate sometidas a los diferentes tratamientos. Los gráficos comparan los testigos con y sin biocarbón (a); la gallinaza con y sin biocarbón (b); el lombricompost con y sin biocarbón (c); lombricompost + inoculación de *B. subtilis* con y sin biocarbón (d); lombricompost + inoculación de *T. harzianum* con y sin biocarbón (e); y lombricompost + combinación de *T. harzianum* y *B. subtilis* con y sin biocarbón (f). Letras distintas indican diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$). Turrialba, Costa Rica, 2011.

En la Figura 5 se presenta los gráficos de producción de peso seco y de producción de hojas de las plantas sometidas a los diferentes tratamientos. Ya sea en ausencia de fertilización o con

fertilizantes no inoculados, no se encontró efecto significativo de la aplicación de biocarbón sobre las plantas para la producción de biomasa y producción de hojas.

En contraste con los resultados obtenidos para el crecimiento, la inoculación de *B. subtilis* no presentó efecto significativo sobre el peso seco, y el biocarbón no influyó sobre este resultado. En cuanto a la producción de hojas, se observó una reducción significativa del 20% de las hojas en presencia de este microorganismo comparado con L, mientras que el tratamiento inoculado sin biocarbón no presentó diferencia significativa. Los dos tratamientos inoculados con *B. subtilis* no presentaron diferencia significativa con el tratamiento LB.

La inoculación del lombricompost con *T. harzianum* con y sin aplicación de biocarbón (TRB y TR respectivamente) disminuyó significativamente la producción de hojas de las plantas. Los tratamientos TR y TRB presentaron una reducción de la producción de hojas de 26% y 21% respectivamente comparado con el lombricompost no inoculado, sin presentar diferencia estadística entre ellos. Sin embargo, en presencia de biocarbón, la inoculación de este microorganismo aumentó significativamente el peso seco de las plantas. La combinación de este microorganismo con biocarbón y lombricompost incremento de 48%, 56% y de 35% el peso seco de las plantas en comparación con el lombricompost solo (L), el lombricompost inoculado con *T. harzianum* (TR) y el lombricompost con biocarbón (LB) respectivamente.

El lombricompost inoculado con la combinación *T. harzianum* y *B. subtilis* sin biocarbón (TRS) presentó una menor producción de hojas que el lombricompost solo (L), y la inoculación no tuvo efecto sobre el peso seco de las plantas. No obstante, en presencia de biocarbón, la inoculación de los dos microorganismos aumentó el peso seco de 33% y 27% en comparación con L y TRS respectivamente, y no tuvo efecto significativo sobre la producción de hojas.

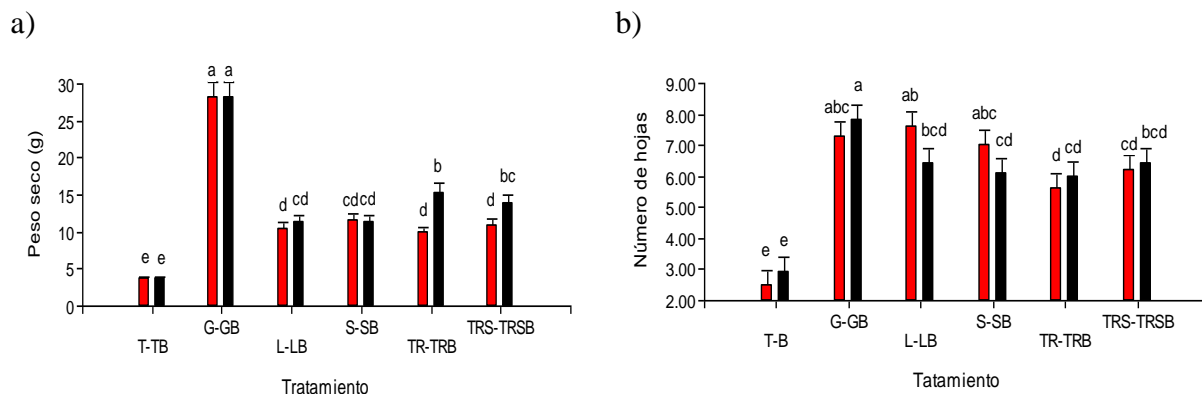


Figura 5. Efecto del biocarbón sobre el peso seco (a) y el número de hojas (b) del tomate sometidas a los diferentes tratamientos. Las diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) están simbolizadas por letras distintas. Las barras de error representan los errores estandares. Turrialba, Costa Rica, 2011.

4.2. Efecto de la combinación de biocarbón con fertilizantes orgánicos y microorganismos benéficos sobre el comportamiento alimenticio de la mosca blanca (*Bemisia tabaci*)

En este experimento, se diferencias entre los tratamientos sobre el número de ninfas ($F=2.73, p=0.0125$) y el número de adultos de *B. tabaci* ($F=262.18, p<0.001$) presentes en las plantas de tomate. Si no se observó influencia de la sola aplicación de biocarbón a los diferentes sustratos, la combinación de este material con *T. harzianum* y *B. subtilis* tuvo un efecto significativo sobre el número de insectos adultos contados en las plantas.

El número de moscas blancas contado a los días de evaluación sobre las plantas sometidas a los diferentes tratamientos se presentan en la Figura 6. El día 1, las diferencias entre los tratamientos fueron mínimas, solo se encontró un número de moscas blancas superior a los testigos con y sin biocarbón sobre las plantas abonadas con gallinaza (G). Los otros tratamientos no presentaron diferencias con el testigo. A las 48 horas después de la infestación, los resultados fueron similares al día anterior.

Ocho días después de la infestación, el número de adultos posados sobre las plantas fue mucho mayor, y las diferencias entre los tratamientos fueron más marcadas. En ausencia de biocarbón, las plantas abonadas con gallinaza (G) presentaron una mayor atracción de las moscas, el número de insectos posados siendo significativamente superior a todos los otros tratamientos excepto GB. Aunque el número promedio adultos contados en las plantas con

lombricompost y gallinaza fue inferior en presencia de biocarbón en el sustrato, las diferencias nunca alcanzaron niveles significativos. Todas las plantas abonadas con lombricompost e inoculadas con los microorganismos (S, SB, TR, TRB, TRS, y TRSB), ya sea con o sin biocarbón, presentaron un número significativamente menor de moscas que los tratamiento sin inoculación ni biocarbón (L), con una disminución promedio del 61% de la población de insectos. La inoculación del lombricompost con *T. harzianum* en presencia de biocarbón (TRB) presentó la mayor disminución de población (68%) comparado con L. Solo el tratamiento TRB dio una diferencia significativa con LB, con una disminución de 55% de la población de moscas blancas presentes en las plantas. En ausencia de fertilización con y sin biocarbón (B y T respectivamente), se contó significativamente menos moscas comparado con todos los otros tratamientos.

Al día 15, las plantas fertilizadas con gallinaza sin biocarbón (G) presentaron un número de insectos adultos significativamente superior a todos los otros tratamientos excepto GB. No se encontró diferencias significativas relativas a la presencia de biocarbón en el sustrato, ya sea con fertilizantes orgánicos o sin fertilización. En ausencia de biocarbón, la inoculación con microorganismos benéficos del sustrato fertilizado con lombricompost no disminuyó significativamente el número de insectos adultos posados en las plantas. Sin embargo, la inoculación de *Bacillus subtilis* y de la combinación *B. subtilis* y *T. harzianum* en presencia de biocarbón (SB y TRSB respectivamente) fue acompañada de una reducción significativa de 40% y 49% del número de insectos contados en las plantas en comparación con L, y solo TRSB presentó un número de adultos significativamente inferior a LB.

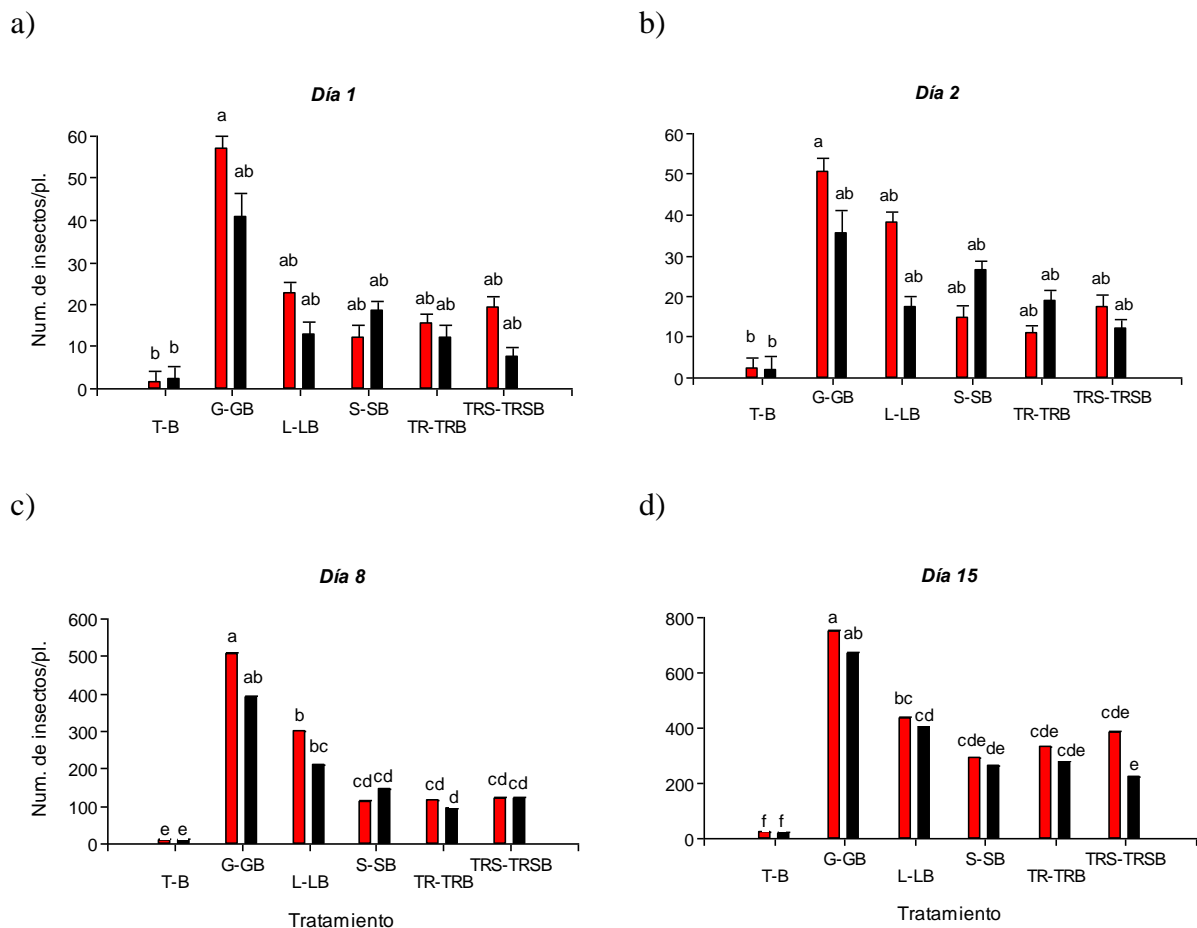


Figura 6. Número promedio de adultos de *B. tabaco* posados en las plantas de tomate sometidas a la aplicación de biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos y microorganismos antagonistas 1 DDI (a), 2 DDI (b), 8 DDI (c) y 15 DDI (d). Las diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) están simbolizadas por letras diferentes. Las barras de errores representan los errores estándares. Turrialba, Costa Rica, 2011.

En cuanto al número de ninfas contado en la superficie de las hojas, no se encontró efecto significativo de la presencia de biocarbón para ningún tipo de fertilización ni de la inoculación del lombricompost con los microorganismos. Sin embargo, como se ilustra en el cuadro 5, los tratamientos L y SB presentaron los mayor promedios de número de ninfas, y fueron los únicos a presentar resultados significativamente superiores al testigo absoluto (T).

Cuadro 5. Promedio del número de ninfas contadas en tres discos circulares (3.3 cm de diámetro) de las hojas de plantas de tomate para los tratamientos evaluados. Las diferencias estadísticas (LSD, $p=0.05$) están representadas por letras distintas. Turrialba, Costa Rica, 2011.

Tratamiento*	Num. de ninfas/cm ²	Error
L	1.27 a	0.53
SB	0.97 a	0.40
GB	0.70 ab	0.29
TRB	0.63 ab	0.26
S	0.61 ab	0.25
TRSB	0.45 ab	0.18
TRS	0.41 ab	0.16
TR	0.37 ab	0.15
LB	0.32 ab	0.13
B	0.12 b	0.05
G	0.11 b	0.04
T	0.11 b	0.04

* T-B: suelo con y sin biocarbón; G-GB: gallinaza con y sin biocarbón ; L-LB : lombricompost con y sin biocarbón ; S-SB: lombricompost + *Bacillus subtilis* con y sin biocarbón; TR-TRB: lombricompost + *Trichoderma harzianum* con y sin biocarbón; TRS-TRSB: lombricompost + *T. harzianum* + *B. subtilis* con y sin biocarbón.

4.3 Inducción de resistencia sistémica y supresividad del biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos, fertilizantes sintéticos y microorganismos benéficos contra *Pseudomonas corrugata* en tomate (*Lycopersicon esculentum*)

Los diferentes tipos de fertilizantes y microorganismos aplicados con y sin biocarbón en este experimento influyeron de manera significativa sobre la producción de biomasa foliar ($F=32.55$, $p<0.001$) y radicular ($F=113.88$, $p<0.001$) de las plantas de tomate inoculadas con el patógeno *P. corrugata*. Como se ilustra en las Figuras 7 y 8, todas las plantas fertilizadas presentaron una producción de biomasa foliar y radicular significativamente superior al testigo absoluto (T, solo suelo). Las plantas fertilizadas con gallinaza y biocarbón presentaron los valores promedios de biomasa más altos, con un incremento de 239% y 332% del peso seco de la parte vegetativa y radicular

respectivamente comparado con el testigo absoluto. La aplicación de gallinaza sin biocarbón (G) y lombricompost con biocarbón inoculado con *Bacillus subtilis* (SB) permitió una producción de biomasa vegetativa estadísticamente igual a GB.

Aunque la aplicación de biocarbón aumentó el peso seco de la parte foliar de las plantas con todos los tipos de fertilización, el efecto nunca fue significativo. Una tendencia positiva del biocarbón fue encontrada por las pruebas de contrastes realizadas entre todos los tratamiento con y sin biocarbón ($F=5.05$, $p=0.0308$), dichas pruebas mostraron un aumento significativo del 10% del peso seco de las plantas con biocarbón. Las pruebas de contraste también demostraron la superioridad de los tratamientos GB y SB, que aumentaron significativamente ($F=137$, $p<0.0001$) para GB y $F=24.60$, $p<0.0001$ para SB) el peso seco de la parte vegetativa de las plantas comparado con los otros tratamientos.

La combinación de *Bacillus subtilis* y biocarbón (SB) aumentó significativamente el peso seco foliar de las plantas comparado con el lombricompost solo (L). La presencia de biocarbón en el sustrato incrementó de 27% el peso seco de la parte vegetativa comparado con L. SB es el único tratamiento inoculado que aumentó significativamente la producción de biomasa de las plantas comparado con L, aunque todos presentaron valores promedio superiores a este.

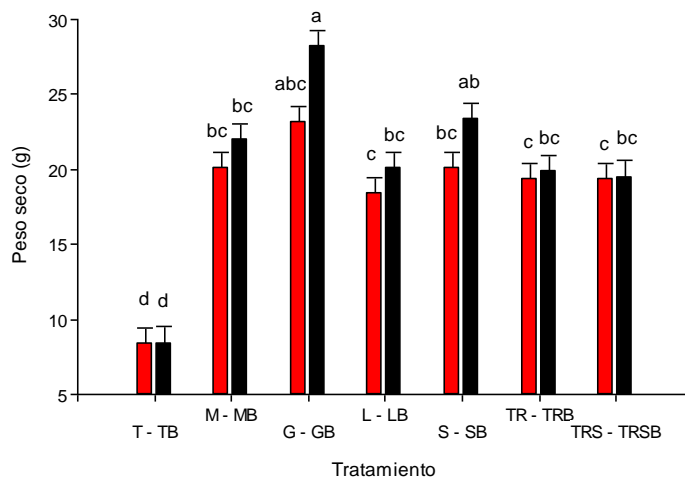


Figura 7. Producción de biomasa foliar de plantas de tomates infectadas con *P. corrugata* en presencia de biocarbón combinado con fertilizantes minerales, orgánicos y microorganismos benéficos. Letras distintas representan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) y las barras de errores los errores estándares. Turrialba, Costa Rica, 2011.

En el caso del peso seco de las raíces, la tendencia es diferente. Los tratamientos con gallinaza y con fertilización mineral no presentaron diferencias significativas relativas a la presencia de biocarbón, mientras que las plantas fertilizadas con lombricompost se vieron afectadas en forma

negativa por la aplicación de este material, y presentaron una disminución de 23% del peso de LB comparado con L. En forma general, el biocarbón combinado con gallinaza y fertilizante mineral aumentó levemente el peso promedio de las raíces, mientras que la tendencia fue más bien negativa en combinación con todos los tratamientos con lombricompost (excepto cuando fue inoculado con *B. subtilis*).

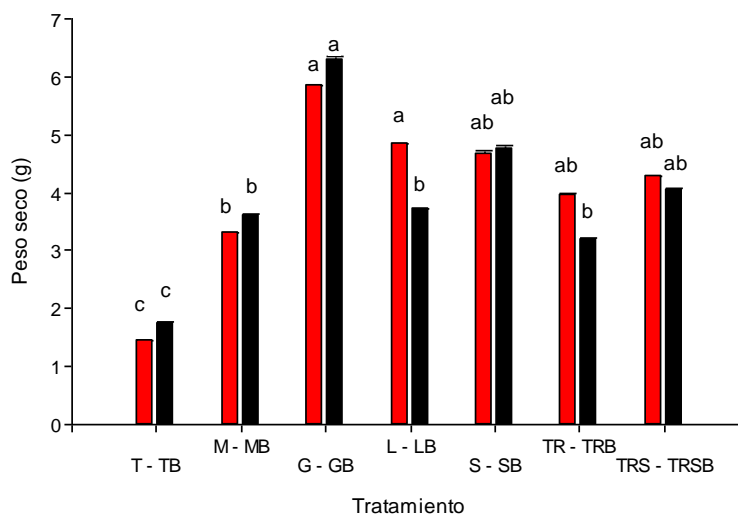


Figura 8. Producción de biomasa radicular de plantas de tomates infectadas con *P. corrugata* en presencia de biocarbón combinado con fertilizantes minerales, orgánicos y microorganismos benéficos. Letras distintas representan diferencias significativas ($p \leq 0.05$) y las barras de errores los errores estándares. Turrialba, Costa Rica, 2011.

La evaluación de la severidad de la enfermedad no mostró diferencias significativas entre los tratamientos ($F=1,91$, $p=0,061$). Como se presenta en el Cuadro 6, las plantas fertilizadas con lombricompost sin biocarbón se vieron más afectadas por el patógeno, presentando los mayores promedios de severidad (en alternancia con el tratamiento TR). En cambio, los tratamientos inoculados con *B. subtilis* en presencia de biocarbón presentaron un promedio de severidad inferior a todos los otros tratamientos durante el experimento, superando a los tratamientos LB, MB y GB.

Cuadro 6. Severidad de la enfermedad causada por *P. corrugata* (necrosis medular) en plantas de tomate en presencia de biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos, fertilizantes sintéticos y microorganismos benéficos. Las diferencias estadísticas están simbolizadas por letras distintas. Turrialba, Costa Rica, 2011.

Tratamiento***	Severidad de la enfermedad*				
	9 DDI **	15 DDI	21 DDI	27 DDI	33 DDI
L	1,7 ± 0,44	2,41 ± 0,46	2,79 ± 0,44	3,18 ± 0,44	3,39 ± 0,44
TR	1,7 ± 0,44	2,64 ± 0,44	2,82 ± 0,44	3,04 ± 0,44	3,32 ± 0,44

G	1 ± 0,41	1,25 ± 0,41	1,39 ± 0,41	2,68 ± 0,41	2,96 ± 0,41
B	1,2 ± 0,38	1,54 ± 0,38	1,82 ± 0,38	2,54 ± 0,38	2,86 ± 0,38
TRB	1,3 ± 0,41	1,68 ± 0,41	1,93 ± 0,41	2,29 ± 0,41	2,79 ± 0,41
TRSB	1,9 ± 0,46	2,09 ± 0,46	2,39 ± 0,44	2,57 ± 0,44	2,75 ± 0,44
T	1,4 ± 0,41	1,53 ± 0,41	1,61 ± 0,41	2,29 ± 0,41	2,64 ± 0,41
M	1,7 ± 0,41	2,04 ± 0,41	2,04 ± 0,41	2,32 ± 0,41	2,54 ± 0,41
S	1,1 ± 0,41	1,43 ± 0,41	1,57 ± 0,41	2,07 ± 0,41	2,5 ± 0,41
TRS	1,1 ± 0,38	1,32 ± 0,38	1,6 ± 0,38	2,07 ± 0,38	2,36 ± 0,38
GB	1 ± 0,38	1,32 ± 0,38	1,5 ± 0,38	1,86 ± 0,38	2,07 ± 0,38
MB	0,9 ± 0,41	1,14 ± 0,41	1,14 ± 0,41	1,64 ± 0,41	1,96 ± 0,41
LB	1,1 ± 0,38	1,25 ± 0,38	1,32 ± 0,38	1,61 ± 0,38	1,93 ± 0,38
SB	0,8 ± 0,41	1,03 ± 0,41	1,25 ± 0,41	1,54 ± 0,41	1,72 ± 0,41

* % del área foliar infectado, expresado en una escala de 0 a 5 donde 0=ausencia de síntomas; 1=1-10% del área foliar infectado; 2=11-25% del área foliar infectado; 3=26-50% del área foliar infectado; 4=50-75% del área foliar infectado; y 5= más de 75% del área foliar infectado.

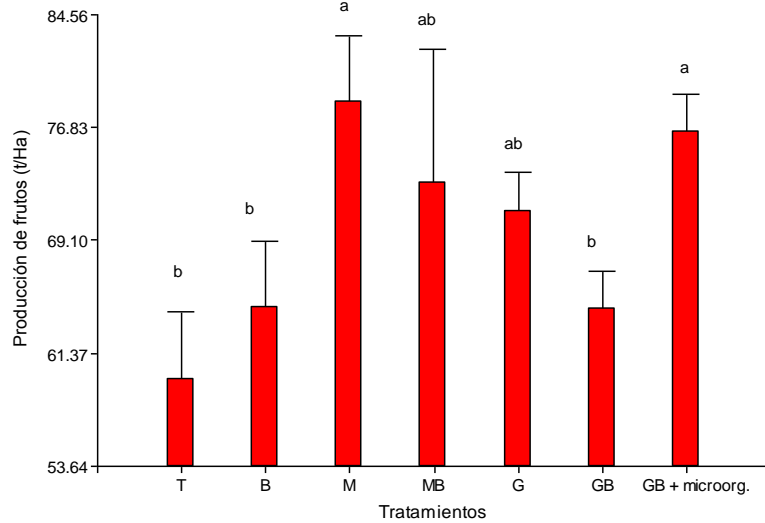
** DDI = días después de la inoculación

*** T-B: suelo con y sin biocarbón; G-GB: gallinaza con y sin biocarbón ; L-LB : lombricompost con y sin biocarbón ; S-SB: lombricompost + *Bacillus subtilis* con y sin biocarbón; TR-TRB: lombricompost + *Trichoderma harzianum* con y sin biocarbón; TRS-TRSB: lombricompost + *T. harzianum* + *B. subtilis* con y sin biocarbón.

4.4 Experimento en campo: producción y resistencia contra enfermedades de plantas de pepino y tomate sometidas a la aplicación de biocarbón combinado con fertilizantes sintéticos, fertilizantes orgánicos y microorganismos benéficos

4.4.1 Producción de pepino

En este experimento, se encontró un efecto significativo de los diferentes tratamientos evaluados ($F=3.51$, $p=0.0123$). Como se muestra en la Figura 7, la fertilización mineral (M) sin biocarbón obtuvo la mayor producción de frutos (78.8 t/ha), seguida por el tratamiento gallinaza + biocarbón + microorganismos (GB + microorg.) (76.5 t/ha). Los tratamientos M y GB + microorganismos fueron los únicos que permitieron alcanzar rendimientos significativamente superiores a los testigos sin y con biocarbón (T y B), con un aumento de los rendimientos de 32% y 28% comparado con T y de 22% y 19% con B respectivamente. La inoculación de *T. harzianum* y *B. subtilis* incrementó significativamente la producción (+19%) comparado con GB. En contraste, la aplicación de fertilizantes sintéticos con biocarbón, gallinaza con biocarbón y gallinaza sola no tuvo efecto significativo sobre la producción de las plantas comparado con T y B.



Tratamientos: T = testigo; B = biocarbón solo; M = fertilización mineral; MB = fertilización mineral + biocarbón; G = gallinaza sola; GB = gallinaza + biocarbón; GB + microorg. = gallinaza + biocarbón + *T. harzianum* + *B. subtilis*

Figura 9: Efecto del biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos, sintético y microorganismos benéficos sobre el rendimiento del pepino. Las diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) están simbolizadas por letras distintas y las barras de errores representan los errores estándares. Turrialba, Costa Rica, 2011.

2.4.2 Actividad microbiana del suelo

Los resultados de los análisis microbiológicos del suelo, presentados en la Figura 10, no mostraron diferencias significativas para las variables de respiración microbiana ($F=1.13$, $p=0.40$), biomasa microbiana ($F=0.69$, $p=0.66$) y amonificación anaeróbica ($F=1.34$, $p=0.31$). Los cocientes metabólicos tampoco presentaron diferencias estadísticas ($F=0.35$, $p=0.90$).

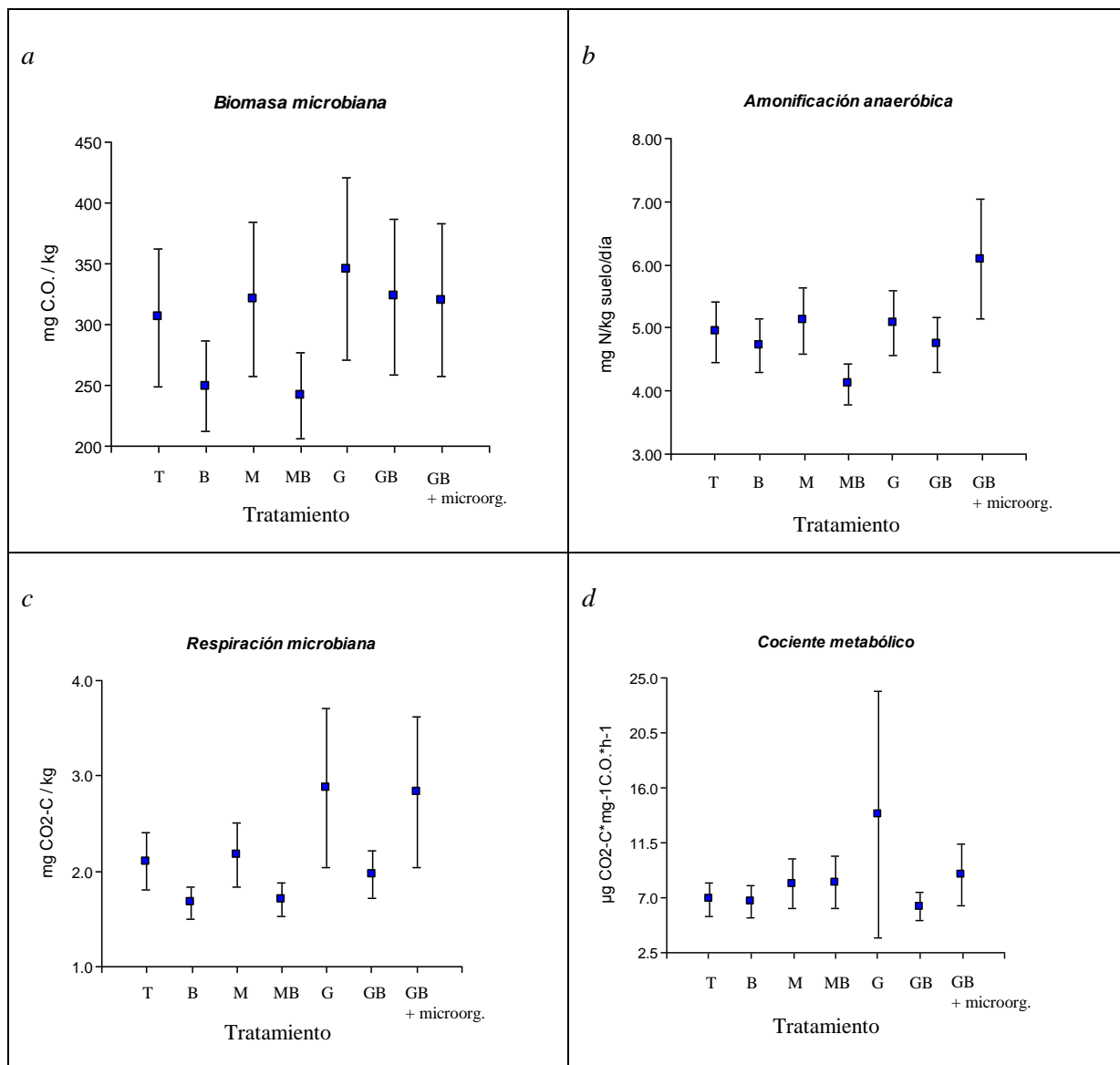


Figura 10. Actividad microbiana de los sustratos con fertilizantes orgánicos, sintéticos y microorganismos benéficos en la parcela de producción de pepino. a) Biomasa microbiana; b) Amonificación anaeróbica; c) Respiración microbiana; d) Cociente metabólico. Turrialba, Costa Rica, 2011.

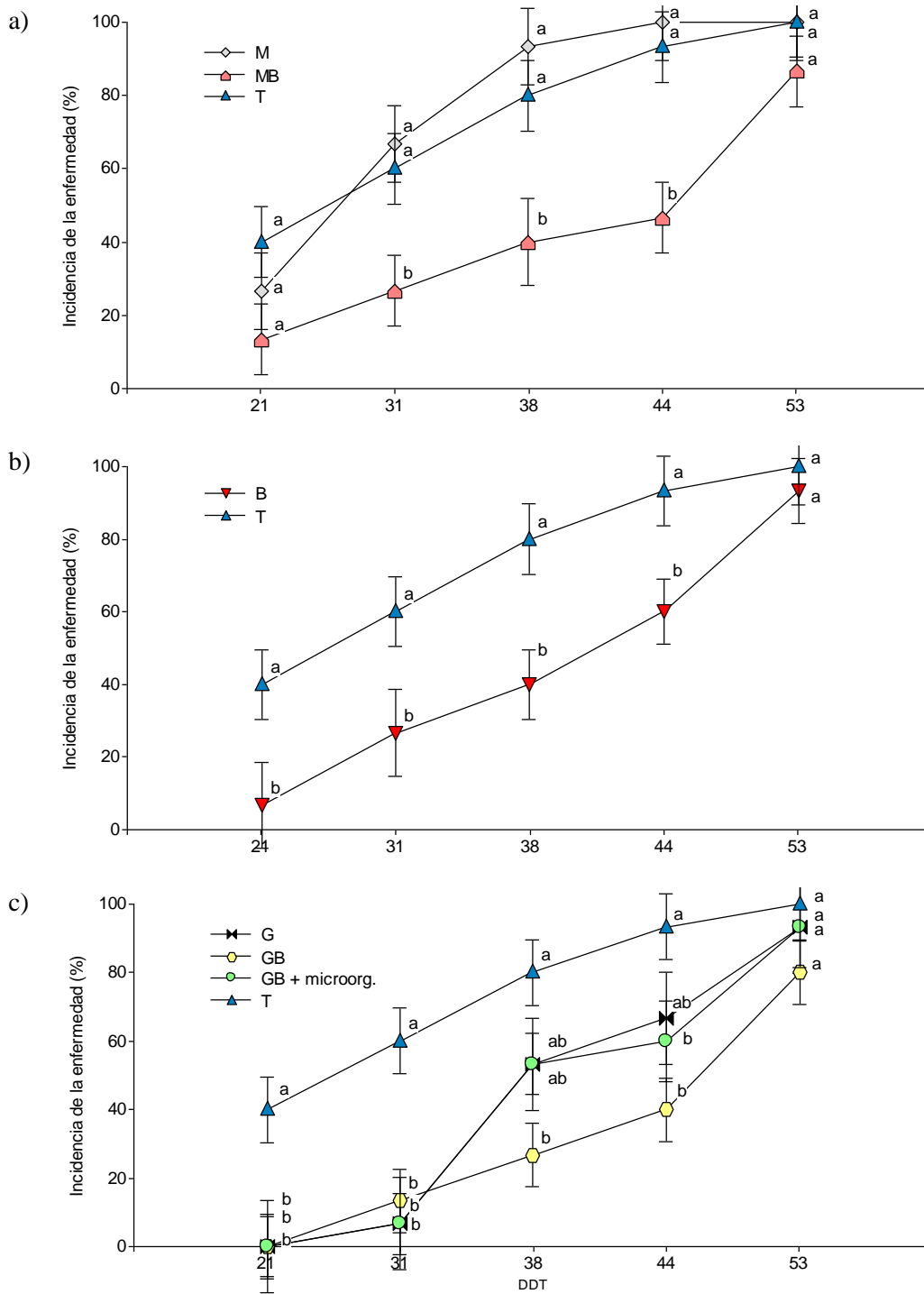
2.4.3 Resistencia a la marchitez bacterial (*Pseudomonas syringae*)

En este experimento, se encontraron diferencias significativas en la incidencia de la marchitez bacterial entre las plantas de tomate expuestas a los tratamientos evaluados ($F=14.43$, $p<0.001$). Como se muestra en la Figura 9, la presencia de biocarbón en el sustrato disminuyó significativamente la incidencia de la enfermedad durante todo el experimento, ya sea para las plantas fertilizada con fertilizante sintético, con gallinaza o no fertilizadas, hasta la última fecha de evaluación a la cual la casi totalidad del cultivo se vio afectado por la enfermedad. Todos los tratamientos con biocarbón,

fertilizados o no, fueron estadísticamente similares durante el experimento, con una mayor eficiencia en presencia de gallinaza.

En ausencia de fertilización, la aplicación de biocarbón disminuyó la incidencia de la enfermedad en un 32% en promedio hasta los 44 DDT. A esta misma fecha, el 100% de las plantas fertilizadas con N-P-K (M) presentaban síntomas de marchitamiento, frente a 47% para las plantas fertilizadas con la misma receta en presencia de biocarbón. El tratamiento M presentó la mayor incidencia de la enfermedad, siempre estadísticamente similar a T, pero con un porcentaje de plantas infectadas superiores a este a partir de 31 DDT hasta el fin del experimento.

Todos los tratamientos con gallinaza, que no presentaron síntomas de infección a la primera fecha de evaluación, disminuyeron la incidencia de la enfermedad comparado con el testigo (T) y a la fertilización sintética (M) a lo largo del tiempo, con un efecto más marcado en presencia de biocarbón. Contrariamente, a la sola aplicación de gallinaza, cuyo efecto fue significativo solo hasta los 31 DDT. La gallinaza combinada con biocarbón disminuyó significativamente la incidencia de la enfermedad comparado con T hasta los 44 DDT. A esta fecha, GB fue el tratamiento con la incidencia más baja, con resultados de 53% y 60% inferiores a M y T respectivamente. La inoculación de *T. harzianum* combinado con *B. subtilis* (GB + microorg) nunca tuvo efecto significativo sobre la incidencia de la enfermedad comparado con GB o G, y no disminuyó con tanta eficacia la incidencia de la enfermedad como lo hizo GB (ver Figura 8c).



T = testigo; B = biocarbón solo; M = fertilización mineral; MB = fertilización mineral + biocarbón; G = gallinaza sola; GB = gallinaza + biocarbón; GB + microorg. = gallinaza + biocarbón + *T. harzianum* + *B. subtilis*

Figura 11. Incidencia de la marchitez bacterial en función de los días después del trasplante (DDT). Los gráficos ilustran el efecto del biocarbón en ausencia de fertilización (a), combinado con fertilización mineral (b) y con gallinaza y microorganismos benéficos (c). Las diferencias estadísticas ($p \leq 0.05$) están representadas con letras distintas. Las barras de errores representan los errores estándares. Turrialba, Costa Rica, 2011.

5 DISCUSIÓN

5.1 Evaluación del crecimiento y de la producción de biomasa de plantas de tomate sometidas a la aplicación de biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos y microorganismos benéficos

En este experimento, el lombricompost y la gallinaza con y sin biocarbón aumentaron significativamente el crecimiento, la producción de hojas y el peso seco de las plantas comparado con los testigos con y sin biocarbón. Numerosos estudios demostraron el efecto positivo de la aplicación de estos fertilizantes orgánicos sobre el crecimiento y la producción de las plantas (Mendoza-Netzahual *et al.* 2003; Arancon y Edwards 2005; Carrera *et al.* 2007; Gutierrez-Miceli *et al.* 2007; Domínguez *et al.* 2010b; Jaipaul *et al.* 2011). Estos resultados están generalmente asociados a un aumento del contenido en nutrientes del sustrato (Atiyeh *et al.* 2001; Demir *et al.* 2010; Myint *et al.* 2011), un mejoramiento de las propiedades físicas del suelo (Marinari *et al.* 2000; Atiyeh *et al.* 2001; Ferreras *et al.* 2006), el aumento de la actividad microbiana (Atiyeh *et al.* 2001; Domínguez *et al.* 2010b; Pramanik *et al.* 2010; Pengthamkeerati *et al.* 2011; Pramanik y Chung 2011), un aporte de sustancias promotoras de crecimiento (Domínguez *et al.* 2010b) y un efecto supresivo contra organismos patógenos (Van Bruggen 1995; Aryantha *et al.* 2000; Domínguez *et al.* 2010a).

Los suelos fertilizados con gallinaza y lombricompost presentaron cantidades mayores de macronutrientes (N, P, K, Ca, Mg) y micronutrientes (Cu, Zn, y Fe), así como un pH más alto (ver Anexo 1). El crecimiento inferior de las plantas abonadas con gallinaza comparado con las abonadas con lombricompost, aunque nunca alcanzó un nivel significativo, así como una mayor producción de hojas (en presencia de biocarbón) y su mayor producción de biomasa pueden explicarse por la disponibilidad en nutrientes. En efecto, el sustrato fertilizado con gallinaza presentó una concentración media en potasio, alta en fósforo y muy baja en nitrógeno, mientras el sustrato abonado con lombricompost contenía una cantidad media de fósforo, alta en potasio y concentraciones más altas de nitrógeno que el sustrato con gallinaza. El potasio tiene varias funciones importantes en la planta, como el aumento de la absorción de agua y nutrientes, aumento del crecimiento radicular, favorece la producción de celulosa, incrementa la producción de varias enzimas y regula al menos 60 enzimas diferentes involucrados en el crecimiento de las plantas (Prabhu *et al.* 2007). El alto contenido en este elemento en los sustratos con lombricompost podría entonces explicar el mayor crecimiento de las plantas. Sin embargo, altas dosis de potasio pueden interferir con la disponibilidad y la absorción de calcio, elemento esencial para la estructura de las paredes celulares, para el desarrollo óptimo de las hojas y que puede estar presente en concentraciones muy altas en la planta (hasta 10% del peso seco)

(Marschner 1997). La concentración media del potasio en el sustrato abonado con gallinaza podría haber favorecido la absorción de calcio, elemento presente en cantidades similares en todos los tratamientos de suelo del experimento, y que a la vez podría haber contribuido al aumento significativo del peso seco de las plantas. El contenido en nitrógeno más alto del sustrato con lombricompost podría igualmente haber estimulado el crecimiento vertical de las plantas, mientras la concentración baja de este elemento en los suelos con gallinaza puede haberlo limitado.

El mejoramiento del contenido en nutrientes no justifica por completo los resultados positivos de los abonos orgánicos sobre el estadio fisiológico de las plantas. Atiyeh *et al.* (2001) encontraron resultados similares con la misma dosis de lombricompost (en este caso realizado a partir de excrementos de puercos) en tomate, que los autores asociaron con una mayor concentración en nitrógenos de los tejidos, una mayor actividad del enzima deshidrogenasa (utilizado como parámetro de la actividad microbiana) y una mejora de las propiedades físicas del suelo. El incremento de la actividad microbiana y el cambio de la diversidad de las poblaciones de estos microorganismos fueron observado consecuente a la aplicación de lombricompost (Marinari *et al.* 2000; Pramanik y Chung 2011) y gallinaza (Aryantha *et al.* 2000; Pengthamkeerati *et al.* 2011). Una grande proporción de los microorganismos presentes en la rizósfera son capaces de producir fitohormonas y otros compuestos estimuladores de crecimiento (Gutiérrez-Mañero *et al.* 2001; Ryu *et al.* 2003; Domínguez *et al.* 2010b), que podrían haber influido de manera determinante en los resultados obtenidos. La aplicación de los fertilizantes orgánicos podría haber mejorado la textura arcillosa pronunciada del suelo utilizado, aumentando de esta manera la oxigenación del sustrato y disminuyendo su compactación. En efecto, la arcilla está caracterizada por una granulometría de tamaño bajo (<0.002), lo que implica una alta cantidad de micro-poros que retienen altas cantidades de agua pero presentan una aeración inadecuada. El aporte de materia orgánica a los suelos conteniendo altas cantidades de arcilla permite la aplicación de sus partículas y crea así espacios donde queda retenido el aire (Troeh y Thompson 2005). La presencia de oxígeno permite el desarrollo de microorganismos aeróbicos, dentro de los cuales se encuentran tanto microorganismos benéficos (rizobacteria promotoras de crecimiento, agentes de biocontrol, etc.) y nocivos.

El efecto positivo del biocarbón sobre el crecimiento, la producción de hojas y producción de biomasa fue reportado tanto en experimentos en potes bajo condiciones controladas (Chan *et al.* 2007; Chan *et al.* 2008; Graber *et al.* 2010) como en el campo (Yamatol *et al.* 2006; Steiner *et al.* 2007; Major *et al.* 2010) para diferentes especies, en particular para el tomate (Graber *et al.* 2010; Hossain *et al.* 2010). En este experimento, las plantas que se desarrollaron en los sustratos fertilizados con lombricompost sin inoculación de microorganismos no presentaron diferencias significativas relativas a la aplicación de biocarbón para las variables evaluadas. Sin embargo, en presencia de gallinaza en el

suelo, el biocarbón aumentó significativamente el crecimiento, aumentó levemente el número de hojas (sin alcanzar diferencias significativas) pero no influyó sobre el peso seco de las plantas. El efecto positivo del biocarbón sobre la transformación de los nutrientes se atribuye generalmente a un aumento del pH, de la capacidad de intercambio catiónico asociado a una disminución de la lixiviación, un incremento de la retención de agua, la aplicación directa de nutrientes (contenidos en el biocarbón), cambios en grupos funcionales de la fauna microbiana del suelo y la absorción de compuestos fenólicos que pueden interferir en la transformación de los nutrientes (Pietikäinen *et al.* 2000; Glaser *et al.* 2002; Lehmann *et al.* 2003; Liang *et al.* 2006; Deluca *et al.* 2009). En este estudio, no se observó modificaciones del pH con la aplicación de este material y, como el experimento fue realizado en macetas constantemente mantenido bajo capacidad al campo, no hubo lixiviación de nutrientes. Además, la naturaleza arcillosa (48%) del suelo utilizado favoreció la retención del agua y de los nutrientes, disminuyendo el impacto del biocarbón sobre estas características. El biocarbón tampoco aportó una cantidad de nutrientes importante al sustrato y el contenido muy bajo de este en nitrógeno (0.19% para el los tratamientos con lombricompost y 0.065% en promedio para los con gallinaza) limitó el crecimiento de las plantas, lo que podría explicar la similitud de los resultados obtenidos entre los tratamientos con y sin biocarbón fertilizados sin inoculación de microorganismos. El biocarbón está ampliamente reconocido por su papel en la retención de nutrientes y su tendencia a impedir la lixiviación de estos (Glaser *et al.* 2002; Lehmann *et al.* 2003).

La ausencia de lixiviación de los nutrientes podría entonces explicar la similitud entre los tratamientos fertilizados sin inoculación con y sin biocarbón para las variables estudiadas. Sin embargo, en presencia de biocarbón, se observó un aumento significativo (aunque solo alcanzó 6%) del crecimiento de las plantas fertilizadas con gallinaza. La presencia de biocarbón en el suelo con gallinaza aumentó el contenido en C, K y P, lo que podría explicar los resultados encontrados. Aumentos de las concentración en C y K fueron igualmente observadas con la aplicación de biocarbón sin fertilizantes. En comparación con los tratamientos con lombricompost, los sustratos con gallinaza presentaban un porcentaje de carbonó total sumamente inferior (0.73% contra 1.98% para el lombricompost). Con la aplicación de biocarbón, la tasa de carbón total del suelo con gallinaza aumentó de 98%, mientras este incremento fue solo de un 27% en presencia de lombricompost. Este contraste fue aún más fuerte en ausencia de fertilización, donde el aumento de carbono total del sustrato con la aplicación de biocarbón fue de 198%. El aumento de carbono es generalmente relacionado con un incremento de la biomasa y respiración microbiana (Peña *et al.* 2004), lo que puede tener consecuencias importante sobre la tasa de mineralización. Además, la alta porosidad del biocarbón (ver más adelante), que tiene una gran influencia en las funciones vitales del suelo como la aeración e hidrología (Downie *et al.* 2009) y tiene la capacidad de disminuir la compactación del suelo

(Chan *et al.* 2007), podría haber mejorado la oxigenación del suelo (Yanai *et al.* 2007) altamente arcilloso favorable para una mayor desarrollo de las raíces y de los microorganismos. Es probable que este fenómeno fue menos marcado en el caso de la aplicación de lombricompost, material que aportó una mayor cantidad de materia orgánica al suelo y mejoró de esta manera sus características físicas.

Varias investigaciones han demostrado el impacto del biocarbón sobre las poblaciones de microorganismos del suelo, aumentando tanto la diversidad como la actividad de estas (Pietikäinen *et al.* 2000; Steiner *et al.* 2004; Elad *et al.* 2010; Lehmann *et al.* 2011). El efecto positivo de este material fue reportado tanto para las comunidades de bacterias (Beck 1991; O'Neill *et al.* 2009; Kolton *et al.* 2011) como de hongos (Graber *et al.* 2010) y de micorrizas (Ishii y Kadoya 1994; Matsubara *et al.* 2002; Warnock *et al.* 2007; Warnock *et al.* 2010). Glaber *et al.* (2010) y Elad *et al.* (2010) encontraron un importante aumento de la abundancia de *Trichoderma* spp. con la aplicación de la misma dosis de biocarbón que fue empleada en el presente experimento, haciendo hincapié sobre la afinidad de ese microorganismo con los sustratos que lo contienen. La porosidad del biocarbón ofrece un hábitat favorable para los microorganismos, protegiéndoles de los depredadores y de la desecación (Thies y Rillig 2009). Pero este material provee igualmente una fuente de carbono y de nutrientes minerales a la fauna microbiana, y los compuestos residuos de la pirólisis que se encuentran en su superficie pueden servir como fuente de energía para el crecimiento y el metabolismo de esta (Steiner *et al.* 2004; Warnock *et al.* 2007; Thies y Rillig 2009). El tipo de biocarbón utilizado en este experimento, realizado a partir de bambú, podría haber influido de manera significativa sobre las poblaciones de *Bacillus* y *Trichoderma* inoculadas en el suelo. El biocarbón de bambú está compuesto de un gran número de poros de tamaños muy diversos, la mayor parte de ellos con un diámetro de 10^{-1} a $1 \mu\text{m}$ (Yoshizawa *et al.* 2005), pero que varían de $0.001 \mu\text{m}$ a $1000 \mu\text{m}$ (promedio= $0.1 \mu\text{m}$), dando un hábitat ideal tanto para las bacterias (que tiene un tamaño de 0.3 a $3 \mu\text{m}$) y los hongos (de 2 a $80 \mu\text{m}$) (Thies y Rillig 2009). Los poros del biocarbón de madera tienen un diámetro superior a los del bambú, variando entre 10 y $3000 \mu\text{m}$ (promedio= $1495 \mu\text{m}$), y representa un hábitat menos oportuno (Thies y Rillig 2009).

Este experimento permitió poner en evidencia el efecto sinérgico de la combinación de biocarbón con *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* sobre el crecimiento y la producción de biomasa de las plantas. Mientras no se observó ningún efecto positivo de los microorganismos aplicados al suelo sin biocarbón, la presencia de este material permitió “activar” los microorganismos, cada uno actuando de manera diferente sobre las plantas. Es probable que el biocarbón, por su estructura porosa o la naturaleza de los compuestos que se encuentran en su superficie, haya favorecido el desarrollo y la persistencia de *B. Subtilis* y *T. harzianum* en el suelo. El lombricompost utilizado en este experimento no fue esterilizado, lo que implica la presencia de una comunidad importante de

microorganismos en el sustrato (Atiyeh *et al.* 2001; Pramanik *et al.* 2010). Dentro de esta comunidad, se puede encontrar cepas de microorganismos benéficos, como por ejemplo rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR), hongos que favorecen el crecimiento, pero también microorganismos nocivos que no son patógenos pero pueden interferir con el buen desarrollo de las plantas (Harman *et al.* 2004; Domínguez *et al.* 2010a). La microfauna presente en el sustrato podría haber afectado el crecimiento de los microorganismos inoculados, como lo encontraron Bae *et al.* (2002), quienes observaron una disminución del crecimiento de las hifas de *T. harzianum* y una disminución del biocontrol de *Sclerotinia sclerotiorum* relativa a un contenido creciente del sustrato en biomasa microbiana. La ausencia de efecto de *B. subtilis* y *T. harzianum* sin la aplicación de biocarbón podría resultar de un fenómeno similar, resultando de competitividad por los nutrientes y por el espacio o causado por antibiosis producida por microorganismos presentes en el sustrato. Lo anterior podría haber impedido cualquier efecto de positivo sobre las plantas (Boer *et al.* 2003). En cambio, el biocarbón, que demostró su capacidad para favorecer el desarrollo de los microorganismos, podría haber favorecido la colonización del sustrato por *T. harzianum* permitiéndole jugar su papel de promotor de crecimiento.

Numerosos estudios demostraron el papel de promotor de crecimiento de *B. subtilis* para una amplia gama de cultivos, fenómeno explicado por la producción de fitohormonas (giberelinas, auxinas, etileno, ácido jasmónico entre otros), de compuestos volátiles (Bowen y Rovira 1999; Gutiérrez-Mañero *et al.* 2001; Ryu *et al.* 2003), por la competición de nutrientes o de espacio, síntesis de compuestos tóxicos o fungicidas que atacan directamente a los patógenos (San-Lang *et al.* 2002; Ping y Boland 2004), o por la inducción de resistencia (Zhang *et al.* 2002; Kloepper *et al.* 2004). La colonización de la rizósfera por *Bacillus* y su mantenimiento podría haber sido favorecido por la aplicación de biocarbón, que por su estructura porosa representa un hábitat de calidad para el establecimiento de tales bacterias (Thies y Rillig 2009). El papel positivo del biocarbón como sustrato para microorganismos benéficos fue demostrado principalmente con rizobacterias fijadoras de nitrógeno atmosférico y con micorrizas (Beck 1991; Ishii y Kadoya 1994; Rondon *et al.* 2006; Warnock *et al.* 2007). Rondon *et al.* (2006) encontraron un aumento de 49% y 78% de la fijación del nitrógeno atmosférico por *Rhizobium* spp con la aplicación de 30 y 60 g Kg⁻¹ de biocarbón, lo que incrementó la biomasa foliar y la producción de *Phaseolus vulgaris* (Rondon *et al.* 2006). Estos resultados confirman los obtenidos por Beck, quien demostró la aptitud del biocarbón a mantener altas poblaciones de *Rhizobium* en el suelo (Beck 1991).

Un mejor aprovechamiento de los nutrientes así que una mejor absorción de agua podrían explicar el mayor crecimiento en presencia de *B. subtilis*. En sus trabajos, Woitke *et al.* (2004a; 2004b) evaluaron el efecto de la inoculación de plantas de tomates por *B. subtilis* sobre el crecimiento, el rendimiento y la resistencia a la mosca blanca bajo condiciones de estrés debido a diferentes grados de

salinidad. La inoculación de la rizobacteria fue acompañada de un aumento del crecimiento, del contenido en agua de las hojas y de la cantidad de Nitrógeno (N) y Magnesio (Mg) presente en los tejidos. El autor atribuye a la bacteria una función de mantenimiento de los flujos osmóticos, y resalta su papel en la absorción de nutrientes. En el experimento con la mosca blanca, *Woitke et al.*(2004a) reportaron una disminución del ratio C/N des las hojas de las plantas de tomate, lo que concuerda con sus observaciones anterior y apoya la hipótesis de mejoramiento de absorción de nitrógeno por las plantas inoculadas. En nuestro estudio, el tratamiento SB presentó un peso fresco significativamente superior a L, LB y S (22%, 28% y 57% respectivamente) (ver Anexo 1). Estos resultados coinciden con los encontrados por Murphy et sus colegas, que demostraron el efecto de *B. subtilis* sobre el crecimiento, el peso fresco, el número de flores y frutos y la resistencia del tomate contra el virus de la mosaica del pepino (CMV, genus *Cucumovirus*) (Murphy et al. 2003). Además, en el presente estudio, la inoculación de la bacteria fue acompañada, en presencia de biocarbón, de un incremento del contenido en nitrógeno total del suelo (21% comparado con L y LB, y 28% comparado con S), lo que, en las condiciones de baja contenido en este nutriente de los sustrato, podría haber influido significativamente sobre el crecimiento de las plantas. El aumento del contenido en nitrógeno disponible por las plantas (en forma de nitrato y amonio) esta generalmente asociado a un incremento de la producción de fitohormonas, proteínas y ácidos amines en los tejidos, y por consecuente influye sobre todo el metabolismo de las plantas. En respuesta, se observa un incremento de la longitud del tallo, un aumento del ratio tallo-raíces en cuanto al peso seco y longitud, un aumento de la superficie foliar y disminución del espesor de las hojas (Marschner 1997).

Los análisis de suelo inoculados con *B. subtilis* presentaron igualmente un aumento de 11% del contenido en Potasio (K) y 7% del contenido en Fósforo (P). Se demostró la capacidad de *B. subtilis* a solubilizar los fosfatos (Rodríguez y Fraga 1999) y el potasio (Leaungvutiviroj et al. 2010), lo que podría explicar el leve aumento de P y K encontrado en los sustratos inoculados con esta bacteria. Estos incrementos en el contenido de nutrientes podrían haber jugado un papel importante en el crecimiento de las plantas. Los cambios morfológicos relativos al mejoramiento de la absorción de nutrientes en presencia de la rizobacteria y biocarbón podría explicar el incremento de crecimiento vertical, sin por lo tanto aumentar significativamente la cantidad total de biomasa (orientación hacia el alargamiento de los tejidos y una reducción del espesor de estos).

En el caso de *Trichoderma*, su acción en presencia de biocarbón tuvo un efecto diferente. Aunque no se detectó ningún efecto positivo de este microorganismo o de su combinación con *B. subtilis* aplicado sin biocarbón sobre ninguno de los parámetros estudiados, su combinación con este material aumentó significativamente el peso seco de las plantas sin tener efecto sobre su crecimiento vertical. Un efecto similar fue encontrado con la combinación de *B. subtilis* y *T. harzianum* en

presencia de biocarbón. Varios estudios demostraron el efecto de promoción de crecimiento de diferentes especies por la inoculación del sustrato con *T. harzianum* (Chang *et al.* 1986; Rudresh *et al.* 2005; Harman 2006; Fontenelle *et al.* 2011). El efecto positivo del hongo sobre la producción de biomasa puede alcanzar niveles altos, como en el caso de la investigación de Fontenelle *et al.* (2011), quienes encontraron aumentos de 100% a 900% del peso seco de plantas de tomates inoculados con diferentes cepas de *T. harzianum*. Su combinación con *Bacillus subtilis* también fue estudiada, demostrando su eficacia a veces más importante que los microorganismos aplicados individualmente (Yobo *et al.* 2001; Chaves *et al.* 2009). La promoción de crecimiento por *Trichoderma* esta generalmente relacionada con la alteración de las poblaciones de microorganismos patógenos del suelo por síntesis de compuestos tóxicos o por competencia (Benítez *et al.* 2004), la solubilización de nutrientes (Harman *et al.* 2004) o por la inducción de producción de fitohormonas (Ácido jasmónico y salicílico, auxinas, etc.) por las plantas, favoreciendo el crecimiento o las defensas de estas (Shoresh *et al.* 2005; Contreras-Cornejo *et al.* 2009; Martínez-Medina *et al.* 2011). También se demostró la capacidad de *Trichoderma* para mejorar la absorción de nitrógeno en condiciones de deficiencia del sustrato, permitiendo a las plantas alcanzar su mayor rendimiento con una cantidad de fertilizantes nitrogenados 40% inferior a plantas no inoculadas (Harman 2000; Harman *et al.* 2004; Rudresh *et al.* 2005). Diferentes estudios describieron un incremento de las concentraciones en nutrientes en el sustrato con la inoculación de *Trichoderma harzianum* u otras especies del mismo género en plantas de diferentes especies (tomate, pepino, lupino blanco, piñón de tempate, jatrofa, o pino rojo americano entre otros), que fueron generalmente relacionados con un aumento de crecimiento y de producción de biomasa (Kleifeld y Chet 1992; Yedidia *et al.* 2001; Wu *et al.* 2003; Rudresh *et al.* 2005; De Santiago *et al.* 2009). Rudresh *et al.* (2005) encontraron un efecto sinérgico significativo de *Trichoderma* spp. inoculado con *Rhizobium* sobre la absorción de N y P, *T. harzianum* presentando resultados significativamente superior a todos los otros tratamientos. Dado el contenido muy bajo en nitrógeno del suelo, *Trichoderma* podría haber estimulado la absorción de este nutriente por las plantas, lo que podría explicar el aumento significativo de la biomasa de los tratamientos inoculados con este microorganismo. La disponibilidad en carbono en el sustrato podría igualmente haber participado al aumento de biomasa, este elemento siendo esencial para el desarrollo estructural de la planta. Como lo demostró Mönkemann y otros investigadores, *Trichoderma* sp. tiene la capacidad de solubilizar el carbón vegetal, y así aumentar el contenido en carbono de la solución del suelo (Hölker *et al.* 1997; Mönkemann *et al.* 1997). Este fenómeno podría no solamente influir directamente sobre el crecimiento de las plantas, pero también favorecer el desarrollo de las poblaciones de microorganismos del suelo.

El efecto menos marcado de la co-inoculación *B. subtilis* - *T. harzianum* podría resultar de un fenómeno de competencia entre los dos microorganismos, hipótesis apoyada por los resultados de la

pruebas de antagonismo realizadas *in vitro*, donde *B. subtilis* disminuyó significativamente el desarrollo de *T. harzianum*. Ambos *T. harzianum* y *B. subtilis* están asociados a la inducción de síntesis de fitohormonas, la presencia de los dos microorganismos en grandes cantidades en el sustrato podría entonces haber perturbado el metabolismo hormonal de la planta. Martínez-Medina *et al.* (2010), quienes estudiaron el efecto hormonal de la combinación de *T. harzianum* y micorrizas arbusculares en plantas de melón (*Cucumis melo* cv. Giotto), encontraron que la co-inoculación de los dos microorganismos disminuyó la producción de ácido jasmónico (AJ) y ácido salicílico (AS) por la planta comparado con *Trichoderma* aplicado solo, mientras ambos microorganismos presentaron aumentos significativos de la producción de estas fitohormonas. El AS y AJ son compuestos sintetizados por las plantas que tienen una doble función: reguladores de crecimiento y señalizadores endógenos de autodefensa de las plantas contra plagas y patógenos (Riveros 2010). Los dos microorganismos utilizados en este experimento, *T. harzianum* y *B. subtilis*, fueron relacionados con la síntesis de ambos AS y AJ por las plantas, influyendo directamente sobre su metabolismo y conduciendo a aumentos del crecimiento y mejoramiento de las defensas contra insectos herbívoros y patógenos (Kloepper *et al.* 2004; Harman 2006). Sin embargo, la biosíntesis del AJ puede interferir sobre la producción de AS y vice versa, reduciendo sus efectos sobre el metabolismo de las plantas (Sendon *et al.* 2011). La activación de diferentes rutas metabólicas por los dos microorganismos inoculados, y sus interacciones, podría entonces explicar el efecto positivo menos fuerte de la co-inoculación de *T. harzianum* y *B. subtilis* comparado con *T. harzianum* solo sobre la producción de biomasa de plantas.

5.2 Efecto de la combinación de biocarbón con fertilizantes orgánicos y microorganismos benéficos sobre el comportamiento alimenticio de la mosca blanca (*Bemisia tabaci*)

El presente experimento demostró la eficiencia de la combinación de biocarbón y los dos microorganismos benéficos *T. harzianum* y *B. subtilis* sobre la resistencia de las plantas de tomate contra *B. tabaci*. Como se señaló anteriormente, se demostró que la aplicación de biocarbón al suelo favorece el desarrollo de las poblaciones microbianas (Pietikäinen *et al.* 2000; Warnock *et al.* 2007; Warnock *et al.* 2010), incluyendo microorganismos benéficos tales como bacterias fijadoras de nitrógeno (Beck 1991), actinomicetes, *Trichoderma* spp. (Graber *et al.* 2010) y micorrizas (Ishii y Kadoya 1994; Matsubara *et al.* 1995; Matsubara *et al.* 2002). Matsubara *et al.* (2002) encontró que la combinación de micorrizas (*Glomus* sp.) con biocarbón permitió una disminución del 97% de la incidencia de *Fusarium oxysporum* en plantas de espárrago (*Asparagus officinalis* L., cv. Mary Washington 500 W) comparado con el testigo, y fue el primer autor a hacer hincapié al papel del

biocarbón como material incrementando el efecto de agentes de inducción de resistencia. Los autores de los trabajos realizados en el tema justifican este aumento de actividad microbiana a la estructura porosa del biocarbón, y a la presencia de compuestos residuos del proceso de pirólisis en su superficie (Matsubara *et al.* 2002; Thies y Rillig 2009; Elad *et al.* 2010). La alta porosidad de este material permite un aumento significativo de la superficie disponible para la colonización de microorganismos, y los provee un hábitat más seguro, fuera del alcance de depredadores (Warnock *et al.* 2007). Como se comentó anteriormente, el biocarbón de bambú, que fue utilizado en este estudio, contiene una alta cantidad de poros de tamaños diversos (entre 0.001 μm a 1000 μm), permitiendo el desarrollo de todo tipo de microorganismos y una mayor aeración del sustrato (característica importante considerando el suelo altamente arcilloso utilizado en este experimento) (Thies y Rillig 2009). En cuanto a los residuos del proceso de pirólisis presentes en la superficie del biocarbón, incluyen compuestos solubles como ácidos, alcoholes, aldehídos, ketones y azúcares, que son fácilmente metabolizadas por los microorganismos, y otros tipos de sustancia tales como hidrocarburos aromáticos poli-cíclicos, xilenoles, formaldehidos y otros carbonilos tóxicos que pueden tener una actividad fungicida o bactericida (Thies y Rillig 2009). Zackrisson y sus colegas (1996) demostraron que estos compuestos sirven de fuente de energía para ciertos microorganismos, y otros autores sugieren que pueden tener un efecto tóxico sobre otros grupos selectivos de bacterias u hongos (Elad *et al.* 2010; Graber *et al.* 2010). Es probable que *B. subtilis* y *T. harzianum* hayan aprovechado de la presencia de biocarbón para desarrollarse y ser más competitivos contra los otros microorganismos presentes en el sustrato, y así poder actuar de diferentes maneras sobre el metabolismo de las plantas.

El efecto positivo de *B. subtilis* sobre la inducción de resistencia contra *Bemisia tabaci* fue demostrado en varios estudios (Woitke *et al.* 2004a; Hanafi *et al.* 2007; Valenzuela-Soto *et al.* 2010). Valenzuela-Soto y sus colegas, quienes encontraron una disminución de producción de adultos en plantas inoculadas con *B. subtilis* sin observar efecto sobre el número de ninfas como en el presente estudio, estudiaron los mecanismos responsables de esta inducción de resistencia al nivel genético. Las plantas inoculadas presentaron una sobre-expresión de los genes asociados con la ruta de señalización del ácido jasmónico (AJ) y/o de respuesta a heridas. Sin embargo, repitiendo el experimento con tomate mutante *spr2* incapaz de sintetizar AJ, encontraron que otras rutas de señalización condujeron a una mayor resistencia de las plantas contra la mosca blanca, sobre-regulando genes fotosintéticos y sub-regulando genes relacionados con la ruta de señalización del ácido salicílico (AS). Se demostró que los insectos, que se alimentan del floema tienden a activar la ruta de señalización del AS, induciendo la producción de proteínas PR (quitinasas, β -1,3-glucanasas, peroxidasas, quitosanasas), lo que puede inactivar las defensas dependientes del AJ (Thaler *et al.* 2002; De Vos *et al.* 2007; Zarate *et al.* 2007; Valenzuela-Soto *et al.* 2010). Sin embargo, el trabajo de Valenzuela-Soto y sus colegas

(2010) mostró que la inoculación *B. subtilis* es capaz de activar diferentes rutas de señalización permitiendo la disminución del AS y una estimulación de producción del AJ, lo que permite la producción de metabolitos tóxicos para *B. tabaci*.

La diversidad de mecanismos que inducen resistencia contra insectos fitófagos podría explicar el efecto sinérgico entre *B. subtilis* y *T. harzianum* en este experimento. En efecto, *Trichoderma* spp. fue implicado tanto en la resistencia sistémica inducida (RSI) como en la resistencia sistemática adquirida (RSA), involucrando tanto la ruta de señalización del AS como la del AJ/etileno (Harman *et al.* 2004; Gailite *et al.* 2005; Shores *et al.* 2005; Martínez-Medina *et al.* 2011). Aunque no se encontró ningún reporte de la inducción de resistencia contra insectos por *Trichoderma* en la literatura consultada, este microorganismo ha sido más estudiado por su papel en la inducción de resistencia contra patógenos (Koike *et al.* 2001; Harman *et al.* 2004; Vinale *et al.* 2008; Abeyasinghe 2009) o como controlador biológico de los mismos (Elad 2000; Benítez *et al.* 2004; Verma *et al.* 2007), su aptitud a inducir la producción de AJ y etileno podría haber aumentado la producción de compuestos tóxicos, reforzando la resistencia de la planta relativa a la presencia de *B. subtilis* en el sustrato contra los insectos. La inoculación combinada de varios microorganismos, incluyendo especies de *Trichoderma* y *Bacillus*, fue relacionada con incrementos del crecimiento e inducción de resistencia contra patógenos de plantas diversas (Nemec *et al.* 1996; Raupach y Kloepper 1998; Guetsky *et al.* 2002; Chaves *et al.* 2009; Latha *et al.* 2011). Por ejemplo, Yobo *et al.* (2001) encontraron un incremento de la resistencia en plantas de pepino inoculados con *T. harzianum* y *B. subtilis* contra *Rhizoctonia solani* comparado con la inoculación de *B. subtilis* solo, lo que confirmó resultados similares obtenidos anteriormente con plantas de tabaco (*Nicotina tabacum*) por Maketon *et al.* (2008).

Otros mecanismos podrían explicar el menor número de adultos de mosca blanca presentes en las plantas inoculadas con *B. subtilis* y su combinación con *T. harzianum*, como un mejor estadio fisiológico de las plantas (los tratamientos TRB y TRSB presentaron mayores pesos secos y SB mayor crecimiento en el primer experimento), una optimización de la absorción de nutrientes (ver 4.1), o la modificación de los metabolismos primario y secundario de la planta conduciendo a la inhibición de la síntesis de ciertos compuesto que estimulan la alimentación de los fitófagos. Este último fenómeno fue descrito por Zehnder *et al.* (1997 a y b), quienes demostraron la alteración por la inoculación de *Bacillus pumilis* de la ruta metabólica para la síntesis de cucurbitacina, metabolito secundario encontrado en plantas de la familia Cucurbitaceae, conocido por estimular la alimentación de la vaquita del pepino (*Diabrotica undecimpunctata howardi* Barber) (Zehnder *et al.* 1997a). En presencia de la rizobacteria, las plantas de pepino presentaron una disminución significativa de poblaciones del insecto y una disminución de la incidencia de la enfermedad transmitida por este insecto, *Erwinia tracheiplila* (Zehnder *et al.* 1997b).

En este experimento, no se observó ningún efecto significativo del biocarbón sobre las defensas de las plantas de tomate contra la mosca blanca para los tratamientos sin o con fertilización (sin considerar los tratamientos inoculados con microorganismos benéficos). Elad y sus colegas (2010) encontraron que el biocarbón induce resistencia sistémica contra *Botrytis cinerea* y *Leveillula taurica* en plantas de chile y tomate, así como contra el ácaro *Polyphagotarsonemus latus* Banks (llamada araña blanca) en plantas de chile, mientras que Matsubara *et al.* (2002) demostraron la aptitud del biocarbón a estimular la inducción de resistencia de plantas de espárrago (*Asparagus officinalis* L.) contra *Fusarium oxysporum* con y sin presencia de micorrizas. Los autores atribuyen el efecto de inducción de resistencia a diferentes factores, como la estimulación y los cambios de grupos funcionales de las poblaciones de microorganismos del suelo, dentro de los cuales algunos están conocidos por inducir resistencia sistémica en plantas (*Trichoderma* spp. entre otros), o a la presencia de residuos de pirólisis ricos en fenoles y docenas de otras moléculas (que pueden ser fitotóxicas en grandes cantidades), que por su presencia podrían provocar un estrés de las plantas y así inducir la activación de los mecanismos de defensas. Sin embargo, si los estudios descritos anteriormente evaluaron la inducción de resistencia contra enfermedades y ácaros, el efecto del biocarbón sobre las defensas de las plantas contra insectos no fue estudiado hasta la fecha. Además, la combinación de biocarbón con los fertilizantes orgánicos utilizados en este experimento tampoco fue investigada.

La gallinaza y el lombricompost pueden inducir resistencia contra plagas mediante diferentes cambios en las características físicas, químicas y biológicas del suelo. Comparado con un suelo fertilizado con fertilizante mineral, los suelos con fertilizantes orgánicos presentan generalmente una menor compactación y mayor aireación, una menor cantidad de nitrógeno mineral, un CICE mayor, una mayor mineralización así como una mayor actividad y biomasa microbiana (Van Bruggen 1995; Atiyeh *et al.* 2001; Steiner *et al.* 2004). La alta mineralización permite una liberación más lenta de los nutrientes que la aplicación de fertilizante mineral, poniendo los recursos a la disposición de las plantas a medida que está los necesita, de esta manera evita una alta concentración de nitrógeno en los tejidos de las plantas (Van Bruggen 1995; Domínguez *et al.* 2010a), que tiende a estimular el desarrollo de las poblaciones de mosca blanca (Jauset *et al.* 2000). El aumento de la diversidad microbiana del suelo, más allá de su papel en el ciclo de los nutrientes, permite la presencia de un rango más amplio de microorganismos benéficos como los agentes de biocontrol, que pueden incrementar las defensas de las plantas contra plagas y enfermedades (Domínguez *et al.* 2010a). Como se comentó anteriormente, el biocarbón tiene un papel muy importante en los cambios de la comunidad microbiana del suelo, y los cambios sobre las características físicas del suelo observados en presencia de este material son comparables con obtenidos con la aplicación de fertilizantes orgánicos (Chan *et al.* 2007). Sin embargo, los cambios de grupos funcionales de los microorganismos del suelo son lentos, y es

probable que la presencia de biocarbón en el sustrato no haya permitido un desarrollo suficientemente importante de los microorganismos benéficos que pueden inducir resistencia contra *Bemisia tabaci*. Esta hipótesis podría explicar los buenos resultados obtenidos con la inoculación de *B. subtilis* y *T. harzianum* en presencia de biocarbón que, inoculados en grandes cantidades en el sustrato, pueden haber aprovechado de mejor forma del biocarbón para desarrollarse y actuar sobre las plantas. En cuanto a la absorción de nitrógenos por la planta, los análisis de suelo no mostraron ningún efecto del biocarbón sobre la cantidad de nitrógeno total del suelo, y se supone que no tuvo un efecto mayor sobre el ciclo de este nutriente en el sustrato, lo que podría igualmente explicar la ausencia de efecto de este material en combinación de fertilizantes orgánicos sobre el comportamiento alimentario de la mosca blanca.

Los mecanismos de inducción de resistencias son complejos, y las investigaciones para entender sus mecanismos requieren análisis bioquímicos específicos. Este experimento puso en evidencia el papel positivo de *T. harzianum* y *B. subtilis* sobre la repelencia de la mosca blanca en plantas de tomate, y una posible sinergia entre ellos, pero se desconocen los mecanismos responsables de esta observación. Si el biocarbón parece haber acentuado el efecto de repelencia a largo plazo, también se desconocen los mecanismos implicados.

5.3 Inducción de resistencia sistémica del biocarbón combinados con fertilizantes orgánicos, fertilizantes sintéticos y microorganismos benéficos contra *Pseudomonas corrugata* en tomate (*Lycopersicon esculentum*)

Las respuestas de las plantas inoculadas con la bacteria patógena *Pseudomonas corrugata* a la aplicación de biocarbón fueron variables en función del tipo de fertilizante utilizado. Si los análisis estadísticos no permitieron encontrar diferencias significativas entre los diferentes tratamientos para la severidad de la enfermedad, el biocarbón tuvo un efecto positivo sobre la producción de biomasa foliar de las plantas fertilizadas con gallinaza y con lombricompost inoculado con *B. subtilis*. Las respuestas de las plantas fueron diferentes comparado con el primer experimento (ver 4.1), donde el biocarbón no tuvo efecto sobre el peso seco de la parte vegetativa de las plantas en presencia de estos fertilizantes. Si el cambio de tipo de suelo (suelo pobre de textura arcillosa para el primer experimento a un suelo de fertilidad mediana a textura franca para este) puede haber influido sobre las interacciones planta-biocarbón, ofreciendo una mayor aeración a las raíces y permitiendo un mayor desarrollo de las plantas, la susceptibilidad variable de las plantas a *P. corrugata* tiene sin duda una fuerte implicación en los resultados encontrados. En este caso, la separación física del patógeno y de los insumos (fertilizantes, biocarbón y microorganismos benéficos) sugiere la implicación de un fenómeno de

inducción de resistencia por el biocarbón en presencia de gallinaza y lombricompost inoculado con *B. subtilis*. Estos resultados no permite atribuir al biocarbón un papel de inductor de resistencia, fenómeno demostrado por Elad y su equipo (2010), pero este material contribuye sin duda a optimizar el efecto de la aplicación de gallinaza y la inoculación de *B. subtilis*.

El efecto positivo de la gallinaza en la resistencia de las plantas contra patógenos fue demostrada por varias investigaciones, la mayor parte de estas estudiaron la supresión de patógenos del suelo (Aryantha *et al.* 2000; Mendoza-Netzahual *et al.* 2003; Islam y Toyota 2004) y pocas evaluaron la inducción de resistencia sistémica (Lyimo *et al.* 2011). El mejoramiento de la estructura del suelo, ya sea por el aumento de la porosidad y disminución de la densidad (Marinari *et al.* 2000; Jaipaul *et al.* 2011), los cambios en la composición taxonómica de la comunidad microbiana del suelo (Pengthamkeerati *et al.* 2011) y la estimulación de la actividad microbiana que permite un aumento de la mineralización y sus consecuencias sobre el ciclo de nutrientes (Demir *et al.* 2010) son los principales cambios generados por la aplicación de gallinaza, a los cuales se atribuye el aumento de productividad y de resistencia de las plantas. Los cambios de grupos funcionales de las poblaciones de microorganismos del suelo son particularmente importantes para el control de las enfermedades de las plantas. Islam y Toyota (2004) encontraron un aumento significativo de la incidencia de *Ralstonia solanacearum* en plantas de tomate con la aplicación de gallinaza esterilizada comparado con gallinaza no esterilizada, y Aryantha y su equipo (2000) encontraron resultados similares contra *Phytophthora cinnamomi* en plantas de *Lupinus albus*. Estos resultados sugieren que el antagonismo de los microorganismos presentes en el sustrato es un factor más significativo que los cambios en la química y el nivel de nutrientes del suelo. Press y sus colegas (1996) encontraron un aumento de la cantidad de bacteria Gram negativo en suelos fertilizados con gallinaza, grupo taxonómico que cuenta con un 70% bacterias endofíticas que favorecen el crecimiento de las plantas y representan un buen indicador de la calidad del suelo (Bowen y Rovira 1999). Estos cambios se traducen por una alta actividad enzimática del suelo, a través de deshidrogenasas, peroxidasas o β -glucosidasas, que son sintetizados mayormente por microorganismos antagonistas (Islam y Toyota 2004; Pengthamkeerati *et al.* 2011). Estas enzimas no solamente se encuentran en mayor cantidad en el suelo, pero también en los tejidos foliares de las plantas, como lo demostraron Zhang *et al.* (1996), quienes encontraron una mayor actividad de las peroxidasas en las hojas de plantas de pepino fertilizadas con compost, asociado con una mayor resistencia contra *Pythium ultimum* y *P. aphanidermatum*.

Si la actividad microbiana juega un papel primordial en el desarrollo y resistencia de las plantas fertilizadas con abonos orgánicos, es muy probable que el aumento de biomasa de las plantas fertilizadas con gallinaza en respuesta a la aplicación de biocarbón observado en este estudio resulte de cambios en esta misma comunidad de microorganismos. Se demostró que la aplicación de biocarbón al

suelo aumenta la actividad microbiana (Steiner *et al.* 2004) y provoca cambios taxonómicos importantes en las poblaciones de microorganismos del suelo (Graber *et al.* 2010; Kolton *et al.* 2011). Varios tipos de microorganismos benéficos, como *Trichoderma* spp. (Elad *et al.* 2010; Graber *et al.* 2010), micorrizas (Warnock *et al.* 2010), *Rhizobium* spp. (Beck 1991), y otras bacterias involucradas en la inducción de resistencia sistémica y control biológico (*Proteobacteria*, *Actinobacteria*, *Chitinophaga*, etc.) (Kolton *et al.* 2011) se vieron beneficiados por la presencia de biocarbón en el sustrato, lo que según los autores explica al menos parcialmente el mayor crecimiento y resistencia de las plantas en presencia de este material. Es probable que la aplicación de biocarbón al suelo fertilizado con gallinaza haya permitido estimular el desarrollo de ciertos grupos específicos de microorganismos benéficos ya favorecidos por la presencia de gallinaza, optimizando de esta manera el efecto de estos sobre las plantas.

El efecto positivo de la combinación de biocarbón con *Bacillus subtilis* sobre el desarrollo y la resistencia de las plantas de tomate fue demostrado en los dos experimentos anteriores, y fue confirmado en este. Sin embargo, se demostró el efecto de esta combinación sobre el crecimiento y la resistencia contra la mosca blanca en los experimentos anteriores, el presente experimento permitió encontrar un aumento del peso seco foliar de las plantas, lo que sugiere un comportamiento distinto de estas en presencia del patógeno *P. corrugata*. El papel de *B. subtilis* en la promoción de crecimiento, inducción de resistencia y control biológico está bien documentado (Kloepper *et al.* 2004; Woitke *et al.* 2004b; Hanafi *et al.* 2007; Maketon *et al.* 2008; Valenzuela-Soto *et al.* 2010). Los mecanismos responsables de estos fenómenos, que a menudo son complementarios, son: el incremento de la absorción y solubilización de los nutrientes (Rodríguez y Fraga 1999; Woitke *et al.* 2004b; Leungvutiviroj *et al.* 2010), la producción de fitohormonas o la activación de genes de las plantas responsables de la síntesis de estas (giberelinas, auxinas, etileno, ácido jasmónico entre otros), la síntesis de compuestos volátiles (Bowen y Rovira 1999; Gutiérrez-Mañero *et al.* 2001; Ryu *et al.* 2003) y/o competición y producción de compuestos tóxicos atacando directamente los patógenos u otros microorganismos nefastos para el buen desarrollo de las plantas (San-Lang *et al.* 2002; Ping y Boland 2004). Se demostró que *B. subtilis* mejora la resistencia de las plantas contra una gran variedad de patógenos del suelo, como *P. capsici* en chile dulce y *Thielaviopsis basicola* en citrus (Nemec *et al.* 1996; Jiang *et al.* 2006), *Ralstonia solanacearum* en tomate (Lemessa y Zeller 2007; Wei *et al.* 2011), *Aspergillus niger* en maní (Podile y Prakash 1996; Sailaja *et al.* 1998) y *Erwinia carotovora* en *Arabidopsis* (Ryu *et al.* 2004), pero también contra patógenos foliares como *Phytophthora capsici* en cacao (Melnick *et al.* 2008), *Colletotrichum orbiculare* y *Pseudomonas syringae* en pepino (Raupach y Kloepper 1998) y contra insectos plagas como la mosca blanca en tomate (Hanafi *et al.* 2007; Valenzuela-Soto *et al.* 2010). Si para los patógenos y plagas foliares, la inducción de resistencia

sistémica esta generalmente involucrada (debido a la separación física entre la rizobacteria y el patógeno), los fenómenos responsables de la resistencia de las plantas contra patógenos del suelo se atribuyen tanto a la ISR (Sailaja *et al.* 1998) como al biocontrol directo del microorganismo benéfico (por síntesis de compuestos tóxicos o competencia) (Podile y Prakash 1996).

Se demostró que el biocarbón favorece el desarrollo de varios microorganismos benéficos como bacterias fijadoras de nitrógeno (Beck 1991; Rondon *et al.* 2006) y micorrizas (Matsubara *et al.* 1995; Warnock *et al.* 2007), que aprovechan de la estructura porosa y del alto contenido en compuestos residuos del proceso de pirólisis característicos de este material. Es probable que la presencia de biocarbón en el sustrato haya favorecido el desarrollo de *B. subtilis*, optimizando de esta manera su efecto sobre las plantas. El trabajo de Matsubara y sus colegas (2002) mostró una tendencia parecida. En este estudio, la plantas de espárrago presentaron, en presencia de biocarbón, una incidencia de *Fusarium oxysporum* de 43.6% inferior al testigo, mientras que esta diferencia alcanzó 89.6% en presencia de *Glomus* sp. (micorriza). El mismo tipo de estimulación de microorganismos benéficos por el biocarbón fue demostrado por Rondon y su equipo (2006), quienes encontraron un aumento significativo de la absorción de nitrógeno atmosférico (por *Rhizobium* sp.) en plantas de vainica (*Phaseolus vulgaris*) en presencia de este material. Los resultados encontrados en el presente experimento hacen hincapié a la importancia del efecto sinérgico entre el biocarbón y *B. subtilis* sobre la capacidad de producción de biomasa de las plantas de tomate infectadas por *P. corrugata*.

5.4 Experimento en campo: producción y resistencia contra enfermedades de plantas de pepino y tomate sometidas a la aplicación de biocarbón combinado con fertilizantes sintéticos, fertilizantes orgánicos y microorganismos benéficos

En este experimento, la combinación de biocarbón con gallinaza y microorganismos antagonistas *Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis* aumentó significativamente la producción de *Cucumis sativus*, con una eficacia comparable a la fertilización sintética. La similitud estadística de la producción de las plantas sin aplicación de fertilizantes con las sometidas a la aplicación de gallinaza con y sin biocarbón demuestra el papel positivo de los microorganismos aplicados. Como fue demostrado en el Experimento 1 y 2, y de acuerdo con la literatura en el tema (Matsubara *et al.* 1995; Matsubara *et al.* 2002; Rondon *et al.* 2006; Warnock *et al.* 2010), el biocarbón puede favorecer el desarrollo de microorganismos benéficos, y de esta manera aumentar la producción y la resistencia de las plantas contra patógenos e insectos. En este experimento, la ausencia de tratamiento inoculado con microorganismos y sin biocarbón no permitió corroborar estos resultados.

La inoculación de *T. harzianum* y *B. subtilis* podría haber actuado de diferentes maneras sobre las plantas: (1) aumento de la absorción de nutrientes por las plantas o mayor mineralización; (2) producción compuestos estimuladores de crecimiento (fitohormonas, compuesto volátiles, entre otros); (3) inducción de resistencia sistémica contra plagas y enfermedades presentes en la parcela (mildiu lanosos, vaquitas y chinche patón); y/o (4) por parasitismo, producción de antibióticos y de enzimas líticas, o competencia con las poblaciones microbianas del suelo.

El papel de *T. harzianum* y *B. subtilis* en la promoción de crecimiento, inducción de resistencia y antagonismo está bien documentado, actuando sobre una amplia gama de cultivos a través de procesos diversos (San-Lang *et al.* 2002; Benítez *et al.* 2004; Harman *et al.* 2004; Kloepper *et al.* 2004; Vinale *et al.* 2008; Contreras-Cornejo *et al.* 2009; Liu *et al.* 2009). Yedidia *et al.* (2001) demostraron el efecto positivo de la inoculación del pepino con *T. harzianum* en sistema hidropónico y en potes, y las plantas inoculadas presentaron un incremento de la tasa de germinación, del crecimiento de la parte vegetativa, del área y longitud radicular, del área foliar y de la biomasa. Los autores relacionaron estos resultados con un aumento significativo del contenido en macro y micro-nutrientes (P, Cu, Fe, Zn, Mn y Na) de la parte foliar y radicular, con algunas diferencias en función del tipo de sustrato. El experimento en sistema hidropónico, donde las raíces de todos los tratamientos estaban en contacto con la misma concentración en nutrientes minerales y la ausencia de organismos patógenos en el sustrato, permitió a los autores confirmar que *T. harzianum* aumentó la absorción de nutrientes en la planta. Aumentos del contenido en nutrientes como P, N y Fe de diferentes especies de plantas (tomate, lupino blanco, piñón de tempate, jatrofa, o pino rojo americano entre otros) se observó después de la inoculación del suelo con *T. harzianum* u otras especies del mismo género (Kleifeld y Chet 1992; Wu *et al.* 2003; Rudresh *et al.* 2005; De Santiago *et al.* 2009). Especies de *Trichoderma* fueron igualmente relacionadas con un aumento de la mineralización (Wu *et al.* 2003). Incrementos de la absorción de nutrientes (en particular N y K) por las plantas relativos a la inoculación con *Bacillus* fueron igualmente señalados para diferentes cultivos, sola (Woitke *et al.* 2004a; Basak y Biswas 2009) o combinada con *T. harzianum* (Li *et al.* 1992; Rudresh *et al.* 2005; Yobo *et al.* 2009). Si *Trichoderma* y *Bacillus* podrían haber mejorado la producción de las plantas por un aumento de la absorción de nutrientes, estas están igualmente asociadas a la promoción del crecimiento por producción de fitohormonas (AJ y giberelinas, entre otros) (Gutiérrez-Mañero *et al.* 2001; Kloepper *et al.* 2004) y de compuestos volátiles (Ghisalberti y Sivasithamparam 1991; Ryu *et al.* 2003; Ping y Boland 2004; Ryu *et al.* 2004).

Durante el experimento, se observó una presencia importante de plagas como la vaquita (*Diabrotica variegata* y *Diabrotica porracea*, Coleoptera: Chrysomelidae), el chinche patón o pata de hoja (*Leptoglossus zonatus*, Hemiptera: Coreidae), y de la enfermedad mildiu veloso (*Pseudoperonospora cubensis*). Debido al aumento importante de las poblaciones de plagas y de la

severidad de la enfermedad, consecuentes con el desarrollo vegetativo de las plantas y el no uso de plaguicida (solo se realizaron dos aplicaciones de una suspensión del hongo entomopatógeno *Beauveria Bassiana* y una atomización de caldo bordelés), se supone que el daño ocasionado a las plantas debe haber influido de manera significativa sobre los rendimientos. La inducción de resistencia por los microorganismos inoculado con gallinaza podría explicar el aumento de rendimiento de las plantas comparado con la misma fertilización sin inoculación. Una mayor resistencia de las plantas de pepino inoculadas con *Bacillus pumilis* contra la vaquita fue observado por Zehnder y sus colegas (1997b), quienes encontraron una disminución de la síntesis de cucurbitina en las plantas inoculadas, estimulante alimenticio del insecto. La rizobacteria *B. subtilis*, así como otras especies del mismo género y sus combinaciones, mostraron una tendencia a inducir resistencia contra diferentes patógenos del pepino (*Colletotrichum orbiculare*, *Pseudomonas syringae* pv. Lachrymans y *Erwinia tracheiphila*), e incrementaron los rendimientos (Raupach y Kloepper 1998). Un efecto de antagonismo pronunciado de *Bacillus* sp. cepa Z-X-3 y Z-X-10 contra *P. cubensis* fue igualmente encontrado *in vitro* por Li *et al.* (2003), el mismo alcanzó un control de 46 y 44% respectivamente. El hongo antagonista *T. harzianum* (producto comercial T39) fue eficiente para el control de *P. cubensis* (Elad 2000), así como otros bio-preparados comerciales a base de *Trichoderma* sp. y *Bacillus* sp. combinados con otros RPCP (Tri-EB-90) y *Bacillus pumilis* (Sonata ©) (Kofoet y Fischer 2007; Cawoy *et al.* 2011). La inoculación combinada de *B. subtilis* y *T. harzianum* realizada en este experimento, que demostró un efecto cinético positivo sobre el crecimiento (Yobo *et al.* 2001; Rudresh *et al.* 2005), la IRS el biocontrol de patógenos de diferentes plantas (Nemec *et al.* 1996; Raupach y Kloepper 1998; Guetsky *et al.* 2002; Chaves *et al.* 2009; Latha *et al.* 2011) y sobre la resistencia de plantas de tomate contra la mosca blanca (ver experimento anterior), podría haber jugado un papel preponderante en el mejoramiento de la productividad del pepino.

La ausencia de efecto del biocarbón sobre la productividad del pepino en este experimento podría resultar de la aplicación de compost (bagasa, cachaza y gallinaza) a toda la parcela previa al establecimiento de las parcelitas experimentales. Este abono aportó grandes cantidades de materia orgánica y de nutrientes, lo que implica un mejoramiento importante de las propiedades físico-químicas del suelo (Marinari *et al.* 2000). Se demostró que estos cambios generados por la aplicación de fertilizantes orgánicos están relacionados con perturbaciones importantes en la comunidad microbiana del suelo, implicando un aumento de la diversidad y cantidad de microorganismos (Press *et al.* 1996; Marinari *et al.* 2000; Schönfeld *et al.* 2003). Press *et al.* (1996) encontraron que la combinación de residuos orgánicos con fertilizante mineral favorece el desarrollo de bacterias gram positivo, mientras que su combinación con gallinaza estimula las poblaciones de bacterias gram negativo (grupo taxonómico incluyendo numerosas bacterias promotoras de crecimiento y biocontroladoras), ambos relacionados con un aumento del contenido en nutrientes del sustrato. Es

probable que la aplicación de biocarbón haya tenido menos impacto sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo debido a la perturbación de estas propiedades por la aplicación de compost. Los mecanismos involucrados en la modificación de la comunidad microbiana del suelo por el biocarbón no están bien entendidos, y la falta de investigación sobre la combinación de biocarbón con fertilizantes orgánicos complica la interpretación de los resultados encontrados en este experimento.

En la parcela experimental de tomate, la presencia de biocarbón en el sustrato disminuyó significativamente la incidencia de la marchitez bacterial (*Ralstonia solanacearum*) a lo largo del tiempo comparado con el testigo, tanto en ausencia de fertilización como con fertilizante mineral y gallinaza. La implicación del biocarbón en la resistencia de las plantas contra microorganismos patógenos fue poco estudiada hasta ahora. Elad *et al.* (2010) encontraron una disminución significativa de la severidad de las enfermedades causadas por *Botrytis cinerea* y *Leveillula taurica* (dos patógenos fúngicos foliares) en plantas de tomate y chile dulce en presencia de biocarbón en el suelo. Debido a la ausencia de contacto entre los patógenos y el biocarbón, los autores implicaron un posible efecto de inducción de resistencia sistémica de este material sobre las plantas. Sin embargo, *R. solanacearum* siendo una bacteria de suelo, un efecto supresivo directo de biocarbón podría justificar los resultados obtenidos. Tal efecto fue encontrado contra *Fusarium oxysporum* en plantas de espárrago, donde las plantas inoculadas con micorrizas presentaron una mayor resistencia en presencia de biocarbón en el sustrato (Matsubara *et al.* 2002). El efecto de IRS y supresivo del biocarbón contra los patógenos está generalmente atribuido a: (1) un cambio y aumento de las poblaciones microbianas del suelo; y (2) a la naturaleza de los compuestos orgánicos residuos del proceso de pirólisis presentes en la superficie del material, que tiene un potencial de estimular el crecimiento y aumentar la resistencia de las plantas contra plagas y patógenos.

Como se discutió anteriormente, se ha demostrado que la aplicación de biocarbón tiene un impacto significativo sobre las poblaciones de microorganismos del suelo. Aumentos de la respiración (Steiner *et al.* 2004; Steiner *et al.* 2008) y de la biomasa microbiana (Liang *et al.* 2010), así como cambios en las comunidades de bacterias y hongos del suelo (Graber *et al.* 2010; Kolton *et al.* 2011) fueron encontrados en presencia de biocarbón. Kolton *et al.* (2011) demostraron que la aplicación de biocarbón al suelo incrementa significativamente la abundancia de ciertos géneros de bacterias como las cepas de *Flavobacterium*, *Chitinophaga* y *Cellvibrio*, que son conocidos por su habilidad a digerir la quitina y sus capacidad de biocontrol e inducción de resistencia (Niroshini Gunasinghe y Karunaratne 2009). Graber y sus colegas (2010) encontraron un aumento en la abundancia de bacterias generales, actinomicetes y hongos como las levaduras y *Trichoderma* spp. en el suelo sometido a la aplicación de biocarbón, e identificaron 22 especies de bacterias asociadas a este material que mostraron eficiencia en el control biológico de diferentes patógenos. Numerosos estudios demostraron la eficiencia de

diferentes microorganismos del suelo en el biocontrol de *Ralsonia solanacearum* (Lemessa y Zeller 2007; Masunaka *et al.* 2009; Li *et al.* 2010; Nguyen y Ranamukhaarachchi 2010; Boukaew *et al.* 2011). La mayor parte de los agentes antagonistas que tuvieron efecto contra la enfermedad fueron bacterias, como actinomicetes (en particular *Streptomyces* spp.)(Tan *et al.* 2006; Lemessa y Zeller 2007; Boukaew *et al.* 2011), Proteobacterias (*Acinetobacter* sp. y *Enterobacter* sp.)(Xue *et al.* 2009; Nguyen y Ranamukhaarachchi 2010), y otras como *Bacillus subtilis*, *B. megaterium*, *Paenibacterium polymixa* y Pseudomonads fluorescentes (Lemessa y Zeller 2007; Algam *et al.* 2010; Wei *et al.* 2011). La supresión de la enfermedad también se encontró con la inoculación de los hongos *Trichoderma harzianum* (con un efecto eficiente solo en presencia de *B. subtilis*) y *Pichia guilliermondii* (Maketon *et al.* 2008; Nguyen y Ranamukhaarachchi 2010), así como con el oomicete *Pythium oligandrum* (Masunaka *et al.* 2009). *R. solanacearum* es susceptible a una gran variedad de microorganismos antagonistas, por lo que es probable que ciertas de las cepas favorecidas por la aplicación de biocarbón hayan tenido un efecto de biocontrol significativo contra este patógeno.

La presencia de pequeñas cantidades de compuestos tóxicos en la superficie del biocarbón resultando del proceso de pirólisis puede explicar, conjunto con el mejoramiento de las características físicas del suelo la perturbación de la comunidad microbiana del suelo descrita arriba. Se ha demostrado que estos compuestos pueden a la vez servir de fuente de carbono para el desarrollo de ciertos microorganismos, y en contraste tener un efecto fungicida y bactericida contra grupos selectivos de microorganismos (Thies y Rillig 2009; Kolton *et al.* 2011). Graber *et al.* (2010) sugieren que ciertos microorganismos benéficos que presentan la capacidad de producir antibióticos o sustancias orgánicas volátiles, y que son más resistentes a la presencia de antibióticos en el suelo (Laskaris *et al.* 2010), puedan aprovechar de los compuestos orgánicos asociados al biocarbón para desarrollarse y promover el crecimiento y la resistencia de las plantas contra patógenos. También se demostró que el vinagre de madera, producto residuo del proceso de pirólisis, tiene un efecto fungicida y bactericida contra un amplio rango de patógenos, dentro de los cuales se encuentran *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium oryzae*, *Helminthosporium mayis*, *Pythium* sp., *Colletotrichum gloeosporioides*, *Xanthomonas campestris* pv. Citri y *Erwinia carotovora* pv. Carotovora (Baimark y Niamsa 2009; Chalermisan y Peerapan 2009; Velmurugan *et al.* 2009). Huang *et al.* (2005) demostraron que dos compuestos (fenoles y guaiacoles) aislados del vinagre de madera tienen un fuerte efecto anti-microbiano contra *Ralstonia solanacearum* y tres otros patógenos (*Phytophthora capsici*, *Fusarium oxysporum*, y *Pythium splendens*).

El desarrollo de *R. solanacearum* podría entonces haber sido atrasado por la presencia de estos compuestos bactericidas en el sustrato con biocarbón, con un efecto insuficiente para lograr a eliminar el patógeno. El metabolismo de las plantas podría estar directamente afectado por la presencia de compuestos orgánicos asociados al biocarbón en el sustrato, y que actúan en forma directa sobre el crecimiento y la resistencia, como lo sugiere Graber *et al.* (2010). La presencia de pequeñas dosis de

substancias fitotóxicas en la rizósfera puede inducir respuestas metabólicas importantes de las plantas (fenómeno denominado hormesis) como una mayor resistencia contra enfermedades, mayor crecimiento y producción (Prithiviraj *et al.* 2007; Calabrese y Blain 2009). Se demostró que los extractos de humo generado por la producción de carbón pueden estimular la germinación de diferentes plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Adkins y Peters 2001), y van Staden *et al.* (2006) encontraron un aumento de la cantidad de raíces, de biomasa foliar, de sobrevivencia y del tamaño de plantas de maíz sometidas a la aplicación butenolides (compuesto contenidos en el humo). Las características bioquímicas del biocarbón tienen entonces un papel clave en el control de microorganismos patógenos del suelo, y más investigaciones son necesarias para entender los mecanismos implicados. .

Un efecto supresivo de la gallinaza fue encontrado en este experimento, con más intensidad en presencia de biocarbón sin inoculación de microorganismos benéficos. La supresión de enfermedades causadas por diferentes patógenos del suelo fue encontrada con la aplicación de este fertilizante orgánico (Aryantha *et al.* 2000; Islam y Toyota 2004). Islam y Toyota (2004) encontraron una disminución significativa de la incidencia de la marchitez bacterial con la aplicación de gallinaza al suelo, así como una disminución de unidades formadoras de colonias (UFC) del patógeno en el sustrato, lo que relacionaron con un aumento de la actividad microbiana y una mayor diversidad de bacterias y hongos. La implicación de los microorganismos en estos resultados fue demostrada por la disminución significativa de la supresividad de este fertilizante una vez esterilizado. Aumentos de la respiración y biomasa microbiana relativos a la aplicación de gallinaza, y cambios en la diversidad de la comunidad de microorganismos del suelo fueron reportados por numerosos estudios (Steiner *et al.* 2004; Gaiind y Nain 2010; Pengthamkeerati *et al.* 2011). Press y sus colegas (1996) encontraron que la combinación de residuos orgánicos con gallinaza estimula el desarrollo de las bacterias Gram negativo, que incluyen a bacterias promotoras de crecimiento y a agentes de biocontrol. El biocarbón, que tiende a favorecer el desarrollo de microorganismos benéficos en el suelo, podría haber estimulado el desarrollo de bacterias o hongos con aptitudes de biocontrol sobre *R. solanacearum*, y así detener el desarrollo del patógeno más tiempo y con más eficiencia que los otros tratamientos.

La inoculación de microorganismos benéficos *B. subtilis* y *T. harzianum* al sustrato no tuvo efecto significativo sobre la incidencia de la enfermedad comparado con el mismo sustrato no inoculado, y su control fue menos eficiente a lo largo del tiempo. Estos resultados contrastan con los encontrados por Maketon *et al.* (2008), quienes demostraron el efecto sinérgico de la combinación de estas dos especies sobre la supresividad del patógeno. Las aptitudes de biocontrol y el comportamiento de los microorganismos pueden ser muy variables entre las diferentes cepas de una misma especie (Beker y Dickman 1993), la cepas utilizadas en el presente experimento podría no presentar aptitudes para el biocontrol de *R. solanacearum*. Además, si un gran número de estudios demostraron la aptitud

de *T. harzianum* y *B. subtilis* para el control biológico y la inducción de resistencia contra una gran variedad de patógenos (Harman *et al.* 2004; Kloepper *et al.* 2004; Harman 2006; Jiang *et al.* 2006; Cawoy *et al.* 2011), el control de la marchitez bacterial por estos microorganismos fue poco estudiada y ciertos resultados muestran ausencia de efecto (Maketon *et al.* 2008; Boukaew *et al.* 2011). El control menos eficiente de la enfermedad con la inoculación combinada de *B. subtilis* y *T. harzianum* podría resultar de la perturbación importante la comunidad de microorganismos del sustrato, tanto por la producción de compuestos tóxicos como por competición, disminuyendo el impacto de las cepas activas contra *R. solanacearum* estimuladas por la presencia del biocarbón en el sustrato.

6 CONCLUSIONES

El efecto de la aplicación de biocarbón al suelo sobre el desarrollo y la resistencia de las plantas fue variable según el tipo de fertilizante utilizado. Las plantas fertilizadas con gallinaza presentaron generalmente una buena respuesta a la presencia de biocarbón en el sustrato, lo que aumentó la producción de biomasa y retardó el desarrollo de la marchitez bacterial en el tomate. En contraste, combinado con lombricompost, el biocarbón no tuvo ningún efecto positivo sobre el desarrollo y resistencia de las plantas, y al contrario mostró una tendencia a disminuir la producción de raíces.

Se encontró una interacción clara entre el biocarbón y los microorganismos benéficos inoculados. La sinergia entre el biocarbón, *T. harzianum* y/o *B. subtilis* se expresó por una mayor productividad del pepino, así como una mayor producción de biomasa y mayor resistencia contra la mosca blanca en el tomate. Se supone que el biocarbón constituye un sustrato de calidad para estos microorganismos que, en ausencia de este material, no presentaron ningún efecto sobre las plantas.

La combinación de biocarbón con *B. subtilis* fue particularmente eficiente, con efectos positivos sobre el crecimiento del tomate, la producción de biomasa foliar en plantas infectadas por *Pseudomonas corrugata*, y la resistencia contra *Bemisia tabaci*. Estos resultados sugieren una buena compatibilidad entre el biocarbón y las bacterias promotoras de crecimiento, lo que podría constituir un avance considerable en el manejo sostenible de los cultivos. .

Un efecto claro de supresividad del biocarbón fue encontrado contra la propagación del agente causante de la marchitez bacterial en el tomate (*Ralstonia solanacearum*), que fue significativo independientemente del tipo de fertilización aplicado. Si la sola presencia de biocarbón en el suelo no permitió evitar la muerte de las plantas, él retardó significativamente el desarrollo de la enfermedad. La combinación de este material con fertilizantes orgánicos, microorganismos antagonistas, extractos

de plantas o productos de síntesis podría entonces representar una opción para un manejo integrado de *Ralstonia solanacearum*.

7 RECOMENDACIONES

Los resultados encontrados en este estudio hacen hincapié a la implicación de los microorganismos en la relación planta-biocarbón. El entendimiento de los mecanismos responsables de los cambios observados en el desarrollo y la resistencia de las plantas con la aplicación de biocarbón y fertilizantes orgánicos requiere la evaluación de un mayor número de parámetros químicos y microbiológicos. El estudio del efecto del biocarbón sobre el metabolismo de las plantas (producción de fitohormonas y de compuestos relacionados con la defensa, absorción de nutrientes) y los diferentes grupos funcionales de microorganismos presentes en el suelo son diferentes pistas que podrían conducir a una mejor comprensión del efecto del biocarbón en la rizósfera.

Más estudios sobre la inducción de resistencia contra plagas y enfermedades y la supresividad del biocarbón son necesarios. Las investigaciones realizadas hasta la fecha se enfocaron generalmente en el papel de este material en el ciclo de nutrientes y sus repercusiones sobre la productividad y el crecimiento de las plantas, sin profundizar en el estado sanitario de las plantas. La evaluación de la aplicación de biocarbón sobre la resistencia de las plantas contra patógenos foliares, del suelo e insectos dañinos son temas prometedores.

La combinación de biocarbón con fertilizantes orgánicos requiere igualmente más investigaciones. La comprensión del efecto variable del biocarbón en función del abono utilizado es esencial para optimizar su uso en la agricultura. La evaluación de los cambios en las propiedades físicas y microbiológicas del suelo en relación a la aplicación de biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos, sintéticos, biofertilizantes, biofermentados, Microorganismos de Monaña (MM), y otros tipos de enmiendas podría conducir a descubrimientos interesantes.

Los dos tipos de microorganismos (*T. harzianum* y *B. subtilis*) inoculados en este experimento fueron aislados a partir de plantas de diferentes especies que las evaluadas. La inoculación de bacterias, hongos o micorrizas conocidos por su efecto positivo sobre el tipo plantas estudiadas, o aislados de la rizósfera de estas mismas especies, podría mostrar una respuesta más fuerte a la aplicación de biocarbón.

La metodología utilizada para la evaluación de resistencia contra la mosca blanca, que consiste en una prueba de escogencia irrestricta con cuatro conteos repartidos sobre un periodo de dos semanas, no es la más apta para satisfacer los objetivos de esta investigación. Para tener una mejor idea del

efecto del biocarbón sobre la dinámica de los insectos fitófagos, la evaluación debería ser repartida sobre un periodo más largo, a partir del trasplante hasta la producción, con un mayor número de plantas y utilizando algún modo de control de las poblaciones (extractos de plantas o microorganismos entomopatógenos) para evitar la sobre-población de las plagas.

Las respuestas de las plantas a la aplicación de fertilizantes u otros insumos bajo un ambiente controlado no son siempre representativas de la situación en el campo. Diferentes factores como el manejo, el clima o la presencia de enfermedades y plagas pueden inducir cambios importantes en el metabolismo de las plantas, y que pueden mostrar comportamientos distintos bajo invernadero. El conocimiento del efecto del biocarbón sobre la productividad y de la resistencia de las plantas requiere entonces mayor investigación en campo, bajo las mismas condiciones de manejo que las empleadas por los productores locales.

Los procesos de mejoramiento de la calidad del suelo son lentos y la evolución de la productividad del sistema en relación a un cambio de manejo se manifiesta generalmente de manera creciente a lo largo del tiempo. Investigaciones a largo plazo son entonces necesarias para conocer el efecto del biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos a escala de la finca y así comparar su sostenibilidad con sistemas convencionales.

8 BIBLIOGRAFÍA

- Abeyasinghe, S. 2009. Systemic resistance induced by *Trichoderma harzianum* against *Uromyces appendiculatus* on *Phaseolus vulgaris*. J.Natn.Sci.Foundation Sri Lanka 37(3):203-207.
- Adkins, SW; Peters, NCB. 2001. Smoke derived from burnt vegetation stimulates germination of arable weeds. Seed Science Research 11:213-222.
- Algam, SAE; Xie, G; Li, B; Yu, S; Su, T; Larsen, J. 2010. Effects of *Paenibacillus* strains and chitosan on plant growth promotion and control of *Ralstonia* wilt in tomato. Journal of Plant Pathology 92(3):593-600.
- Anderson, JM; Ingram, JSI. 1992. Tropical soil biology and fertility. A handbook of methods. U.K., CAB International. p. 240.
- Arancon, NQ; Edwards, CA. 2005. Effects of vermicomposts on plant growth. Los Banos, Philippines. 16-18 p.
- Aryantha, IP; Cross, R; Guest, DI. 2000. Suppression of *Phytophthora cinnamomi* in potting mixes amended with uncomposted and composted animal manures. Phytopathology 90(7):775-782.
- Atiyeh, RM; Edwards, CA; Subler, S; Metzger, JD. 2001. Pig manure vermicompost as a component of a horticultural bedding plant medium: effects on physicochemical properties and plant growth. Bioresource Technology 78:11-20.
- Bae, Y-S; Knudsen, GR; Dandurand, L-MC. 2002. Influence of Soil Microbial Biomass on Growth and Biocontrol Efficacy of *Trichoderma harzianum*. Plant Pathol. 18(1):30 - 35.
- Bagnarello, G; Hilje, L; Bagnarello, V; Cartín, V; Calvo, M. 2009. Actividad fagodisuasiva de las plantas *Tithonia diversifolia* y *Montanoa hibiscifolia* (Asteraceae) sobre adultos del insecto plaga *Bemisia tabaci* (Homoptera: Alateyrodidae). Rev. Biol. Trop. 57 (4):1201-1215.
- Baimark, Y; Niamsa, N. 2009. Study on wood vinegars for use as coagulating and antifungal agents on the production of natural rubber sheets. Biomass and bioenergy 33:994-998.
- Basak, BB; Biswas, DR. 2009. Influence of potassium solubilizing microorganism (*Bacillus mucilaginosus*) and waste mica on potassium uptake dynamics by sudan grass (*Sorghum vulgare* Pers.) grown under two Alfisols. Plant Soil 317:235-255.
- Beck, DP. 1991. Suitability of charcoal-amended mineral soil as carrier for *Rhizobium* inoculants. Soil Biology and Biochemistry 23(1):41-44.
- Beker, R; Dickman, MB. 1993. Biological control with fungi. Applications in agricultural and environmental management. In Blaine, F. ed. 1993. Soil microbial ecology. New York, Marcel Dekker. 275-306 p.
- Benítez, T; Rincón, AM; Limón, MC; Codón, AC. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. International Microbiology 7:249 - 260.

- Boer, Wd; Verheggen, P; Paulien J. A. Klein Gunnewiek; Kowalchuk, GA; Veen, JAv. 2003. Microbial community composition effects Soil fungistasis. *Applied and Environmental Microbiology* 69(2):835 - 845.
- Boukaew, S; Chuenchit, S; Petcharat, V. 2011. Evaluation of *Streptomyces* spp. for biological control of *Sclerotium* root and stem rot and *Ralstonia* wilt of chili pepper. *BioControl* 56(3):365-374.
- Bowen, GD; Rovira, AD. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. In Donald, LS. ed. 1999. *Advances in Agronomy*. Academic Press. 1-102 p.
- Calabrese, EJ; Blain, RB. 2009. Hormesis and plant biology. *Environmental Pollution* 157(1):42-48.
- Carrera, LM; Buyer, JS; b, BV; Abdul-Baki, AA; Sikora, LJ; Teasdale, JR. 2007. Effects of cover crops, compost, and manure amendments on soil microbial community structure in tomato production systems. *applied soil ecology* 37:247-255.
- Cawoy, H; Bettiol, W; Fickers, P; Ongena, M. 2011. Bacillus-based biological control of plant diseases. In Stoytcheva, M. ed. 2011. *Pesticides in the Modern World - Pesticides Use and Management*. InTech. 273-302 p.
- Contreras-Cornejo, HA; Macías-Rodríguez, L; Cortés-Penagos, C; López-Bucio, J. 2009. *Trichoderma virens*, a plant beneficial fungus, enhances biomass production and promotes lateral root growth through an auxin-dependent mechanism in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 149(3):1579-1592.
- Chalermnan, Y; Peerapan, S. 2009. Wood-vinegar: by product from rural charcoal kiln and its roles in plant protection. Rajamangala University of Technology Lanna, Chiang-Mai, Thailand. 167-174 p.
- Chan, KY; Van Zwieten, L; Meszaros, I; Downie, A; Joseph, S. 2007. Agronomic values of greenwaste biochar as a soil amendment. *Australian Journal of Soil Research* 45(8):629.
- Chan, KY; Zwieten, LV; Meszaros, I; Downie, A; Joseph, S. 2008. Using poultry litter biochars as soil amendments. *Australian Journal of Soil Research* 46:437- 444.
- Chang, Y-C; Chang, Y-C; Baker, R. 1986. Increase growth of plants in the presence of biological control agent *Trichodema harzianum*. *Plant Disease* 70(2):145-148.
- Chaves, NP; Pocasangre, LE; Elango, F; Rosales, FE; Sikora, R. 2009. Combining endophytic fungi and bacteria for the biocontrol of *Radopholus similis* (Cobb) Thorne and for effects on plant growth. *Scientia Horticulturae* 122(3):472-478.
- de Santiago, A; Quintero, JM; Avilés, M; Delgado, A. 2009. Effect of *Trichoderma asperellum* strain T34 on iron nutrition in white lupin. *Soil Biology and Biochemistry* 41(12):2453-2459.
- De Vos, M; Van Oosten, VR; Jander, G; Dicke, M; Pieterse, CMJ. 2007. Plants under attack: multiple interactions with insects and microbes. *Plant Signaling & Behavior* 2(6):527-529.
- DeLuca, TH; MacKenzie, MD; Gundale, MJ. 2009. Biochar effects on soil nutrient transformations. In Lehmann, J. ed. 2009. *Biochar for environmental management*. London, UK, Earthscan. 251-270 p.

- Demir, K; Sahin, O; Kadioglu, YK; Pilbeam, DJ; Gunes, A. 2010. Essential and non-essential element composition of tomato plants fertilized with poultry manure. *Scientia Horticulturae* 127(1):16-22.
- Domínguez, J; gómez-BranDón, M; Lazcano, C. 2010a. Propiedades bioplaguicidas del vermicompost. *Acta Zoológica Mexicana Número especial 2*:373-383.
- Domínguez, J; Lazcano, C; gómez-BranDón, M. 2010b. Influencia del vermicompost en el crecimiento de las plantas. aportes para la elaboración de un concepto objetivo. *Acta zoológica Mexicana Número Especial 2*:359-371.
- Downie, A; Crosky, A; Munroe, P. 2009. Physical properties of biochar. *In* Lehmann, J; Joseph, S. eds. 2009. *Biochar for environmental management: science and technology*. 13-32 p.
- Elad, Y. 2000. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection* 19:709-714.
- Elad, Y; David, DR; Harel, YM; Borenshtein, M; Kalifa, HB; Silber, A; Graber, ER. 2010. Induction of systemic resistance in plants by biochar, a soil-applied carbon sequestering agent. *Phytopathology* 100(9):913-21.
- Ferreras, L; Gomez, E; Toresani, S; Firpo, I; Rotondo, R. 2006. Effect of organic amendments on some physical, chemical and biological properties in a horticultural soil. *Bioresource Technology* 97(4):635-640.
- Fontenelle, ADB; Guzzo, SD; Lucon, CMM; Harakava, R. 2011. Growth promotion and induction of resistance in tomato plant against *Xanthomonas euvesicatoria* and *Alternaria solani* by *Trichoderma* spp. *Crop Protection* 30(11):1492-1500.
- Gailite, A; Samsone, I; Ievinsh, G. 2005. Ethylene is involved in *Trichoderma*-induced resistance of bean plants against *Pseudomonas syringae*. *Acta Universitatis Latviensis* 691:59-70.
- Gaind, S; Nain, L. 2010. Exploration of composted cereal waste and poultry manure for soil restoration. *Bioresource Technology* 101(9):2996-3003.
- Ghisalberti, EL; Sivasithamparam, K. 1991. Antifungal antibiotics produced by *Trichoderma* spp. *Soil Biology and Biochemistry* 23(11):1011-1020.
- Glaser, B; Lehmann, J; Zech, W. 2002. Ameliorating physical and chemical properties of highly weathered soils in the tropics with charcoal - a review. *Biology and Fertility of Soils* 35(4):219-230.
- Graber, ER; Meller Harel, Y; Kolton, M; Cytryn, E; Silber, A; Rav David, D; Tsechansky, L; Borenshtein, M; Elad, Y. 2010. Biochar impact on development and productivity of pepper and tomato grown in fertigated soilless media. *Plant and Soil* 337(1-2):481-496.
- Guetsky, R; Shtienberg, D; Elad, Y; Fischer, E; Dinoor, A. 2002. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. *Phytopathology* 92(9):976-985.

- Gutiérrez-Mañero, FJ; Ramos-Solano, B; Probanza, An; Mehouchi, J; R. Tadeo, F; Talon, M. 2001. The plant-growth-promoting rhizobacteria *Bacillus pumilus* and *Bacillus licheniformis* produce high amounts of physiologically active gibberellins. *Physiologia Plantarum* 111(2):206-211.
- Gutierrez-Miceli, FA; Santiago-Borraz, J; Montes Molina, JA; Nafate, CC; Abud-Archila, M; Oliva Llaven, MA; Rincon-Rosales, R; Dendooven, L. 2007. Vermicompost as a soil supplement to improve growth, yield and fruit quality of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Bioresource Technology* 98(15):2781-2786.
- Hanafi, A; Traoré, M; Schnitzler, WH; Woitke, M. 2007. Induced resistance of tomato to whiteflies and *Pythium* with the PGPR *Bacillus subtilis* in a soilless crop grown under greenhouse conditions. Proceedings of the Viith International Symposium on Protected Cultivation in Mild Winter Climates: Production, Pest Management and Global Competition. *Acta Hort.* 747, ISHS 315-322.
- Harman, GE. 2000. Myths and dogmas of biocontrol: changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T-22. *Plant Disease* 84(4):377-393.
- Harman, GE; Howell, CR; Viterbo, A; Chet, I; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species--opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature reviews. Microbiology* 2(1):43-56.
- Harman, GE. 2006. Overview of Mechanisms and Uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96(2):190-194.
- Hölker, U; Mönkemann, H; Höfer, M. 1997. A system to analyze the complex physiological states of coal solubilizing fungi. *Fuel Processing Technology* 52:65-71.
- Hossain, MK; Strezov, V; Yin Chan, K; Nelson, PF. 2010. Agronomic properties of wastewater sludge biochar and bioavailability of metals in production of cherry tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Chemosphere* 78(9):1167-1171.
- Hwang, YH; Matsushita, YI; Sugamoto, K; Matsui, T. 2005. Antimicrobial effect of the wood vinegar from *Cryptomeria japonica* sapwood on plant pathogenic microorganisms. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 15(5):1106-1109.
- Ishii, T; Kadoya, K. 1994. Effects of charcoal as soil conditioner on Citrus growth and vesicular-arbuscula mycorrhizal development. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 63(3):529-535.
- Islam, TMD; Toyota, K. 2004. Suppression of bacterial wilt of tomato by *Ralstonia solanacearum* by incorporation of compost in soil and possible mechanisms. *Microbes Environ.* 19(1):53-60.
- Jaipaul; Sharma, S; Dixit, AK; Sharma, AK. 2011. Growth and yield of capsicum (*Capsicum annuum*) and garden pea (*Pisum sativum*) as influenced by organic manures and biofertilizers. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 81(7):637-642.
- Jauset, AM; Sarasua, MJ; Avilla, J; Albaj, R. 2000. Effect of nitrogen fertilization level applied to tomato on the greenhouse whitefly. *Crop Protection* 19 255-261.
- Jiang, Z; Guo, Y; Li, S; Qi, H; Guo, J. 2006. Evaluation of biocontrol efficiency of different *Bacillus* preparations and field application methods against *Phytophthora* blight of bell pepper. *Biological Control* 36(2):216-223.

- Jovel, J; Hilje, L; Kleinn, C; Cartín, V; Valverde, BMddBtepd, en Turrialba, Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas. 2000. Movimientos diarios de *Bemisia tabaci* en parcelas de tomate, en Turrialba, Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 55:49-55.
- Kleifeld, O; Chet, I. 1992. *Trichoderma harzianum* - interaction with plants and effect on growth response. Plant and Soil 144(2):267-272.
- Kloepper, JW; Ryu, C-M; Zhang, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. Phytopathology 94(11):1259-1266.
- Kofoet, A; Fischer, K. 2007. Evaluation of plant resistance improvers to control *Peronospora destructor*, *P. parasitica*, *Bremia lactucae* and *Pseudoperonospora cubensis*. Journal of Plant Diseases and Protection 114(2):54-61.
- Koike, N; Hyakumachi, M; Kageyama, K; Tsuyumu, S; Doke, N. 2001. Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant growth-promoting fungi: lignification and superoxide generation. European Journal of Plant Pathology 107:523-533.
- Kolton, M; Harel, YM; Pasternak, Z; Graber, ER; Elad, Y; Cytryn, E. 2011. Impact of biochar application to soil on the root-associated bacterial community structure of fully developed greenhouse pepper plants. Applied and Environmental Microbiology 77(14):4924-4930.
- Laskaris, P; Tolba, S; Calvo-Bado, L; Wellington, L. 2010. Coevolution of antibiotic production and counter-resistance in soil bacteria. Environmental Microbiology 12(3):783-796.
- Latha, P; Anand, T; Prakasam, V; Jonathan, EI; Paramathma, M; Samiyappan, R. 2011. Combining *Pseudomonas*, *Bacillus* and *Trichoderma* strains with organic amendments and micronutrient to enhance suppression of collar and root rot disease in physic nut. Applied Soil Ecology 49(0):215-223.
- Leaungvutiviroj, C; Ruangphisarn, P; Hansanimitkul, P; Shinkawa, H; Sasaki, K. 2010. Development of a new biofertilizer with a high capacity for N₂ fixation, phosphate and potassium solubilization and auxin production. Biosci. Biotechnol. Biochem. 74(5):1098 - 1101.
- Lehmann, J; Pereira da Silva, J; Steiner, C; Nehls, T; Zech, W; Glaser, B. 2003. Nutrient availability and leaching in an archaeological Anthrosol and a Ferralsol of the Central Amazon basin: fertilizer, manure and charcoal amendments. Plant and Soil 249(2):343-357.
- Lehmann, J; Rillig, M; Thies, J; Masiello, CA; Hockaday, WC; Crowley, D. 2011. Biochar effects on soil biota – A review. Soil Biology and Biochemistry.
- Lemessa, F; Zeller, W. 2007. Screening rhizobacteria for biological control of *Ralstonia solanacearum* in Ethiopia. Biological Control 42(3):336-344.
- Li, B; Su, T; Yu, R; Tao, Z; Wu, Z; Algam, SAE; Xie, G; Wang, Y; Sun, G. 2010. Inhibitory activity of *Paenibacillus macerans* and *Paenibacillus polymyxa* against *Ralstonia solanacearum*. African Journal of Microbiology Research 4(19):2048-2054.
- Li, CY; Massicote, HB; Moore, LVH. 1992. Nitrogen-fixing *Bacillus* sp. associated with Douglas-fir tuberculate ectomycorrhizae Plant and Soil 140:35-40.

- Li, X; Zhang, D; Yang, W-x; Dong, L; Liu, D-q. 2003. Studies on the effect of *Bacillus* on downy mildew of cucumber. *Plant Protection* 29(04):25-27.
- Liang, B; Lehmann, J; Solomon, D; Kinyangi, J; Grossman, J; O'Neill, B; Skjemstad, JO; Thies, J; Luiza, FJ; Petersen, J; Neves, EG. 2006. Black carbon increases cation exchange capacity in soils. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 70:1719-1730.
- Liang, B; Lehmann, J; Sohi, SP; Thies, JE; O'Neill, B; Trujillo, L; Gaunt, J; Solomon, D; Grossman, J; Neves, EG; Luizão, FJ. 2010. Black carbon affects the cycling of non-black carbon in soil. *Organic Geochemistry* 41(2):206-213.
- Liu, B; Qiao, H; Huang, L; Buchenauer, H; Han, Q; Kang, Z; Gong, Y. 2009. Biological control of take-all in wheat by endophytic *Bacillus subtilis* E1R-j and potential mode of action. *Biological Control* 49(3):277-285.
- Lyimo, HJF; Pratt, RC; Mnyuku, RSOW. 2011. Composted cattle and poultry manures provide excellent fertility and improved management of gray leaf spot in maize. *Field Crops Research* 126(0):97-103.
- Major, J; Rondon, M; Molina, D; Riha, SJ; Lehmann, J. 2010. Maize yield and nutrition during 4 years after biochar application to a Colombian savanna oxisol. *Plant and Soil* 333(1-2):117-128.
- Maketon, M; Apisitsantikul, J; Siriraweeikul, C. 2008. Greenhouse evaluation of *Bacillus subtilis* ap-01 and *Trichoderma harzianum* AP-001 in controlling tobacco diseases. *Brazilian Journal of Microbiology* 39:296-300.
- Marinari, S; Masciandaro, G; Ceccanti, B; Grego, S. 2000. Influence of organic and mineral fertilisers on soil biological and physical properties. *Bioresource Technology* 72(1):9-17.
- Marschner, H. 1997. Mineral nutrition of higher plants. Second ed. San Diego, Academic Press. p. 889.
- Martínez-Medina, A; Roldán, A; Albacete, A; Pascual, JA. 2011. The interaction with arbuscular mycorrhizal fungi or *Trichoderma harzianum* alters the shoot hormonal profile in melon plants. *Phytochemistry* 72(2-3):223-229.
- Masunaka, A; Nakaho, K; Sakai, M; Takahashi, H; Takenaka, S. 2009. Visualization of *Ralstonia solanacearum* cells during biocontrol of bacterial wilt disease in tomato with *Pythium oligandrum*. *Journal of General Plant Pathology* 75(4):281-287.
- Matsubara, Y; Harada, T; Yakuwa, T. 1995. Effect of inoculation density of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungal spores and addition of carbonized material to bed soil on growth of Welsh onion seedlings. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science* 64(3):549-554.
- Matsubara, Y; Hasegawa, N; Fukui, H. 2002. Incidence of *Fusarium* root rot in *Asparagus* seedlings infected with arbuscular mycorrhizal fungus as affected by several soil amendments. *Japanese Society for Horticultural Science* 71(3):370-374.
- Melnick, R; Zidack, N; Bailey, B; Maximova, S; Gultinan, M; Backman, P. 2008. Bacterial endophytes: *Bacillus* spp. from annual crops as potential biological control agents of black pod rot of cacao. *Biological Control* 46(1):46-56.

- Mendoza-Netzahual, H; Carrillo-Rodríguez, JC; Perales-Segovia, C; Ruiz-Vega, J. 2003. Evaluación de fuentes de fertilización orgánica para tomate de invernadero en Oaxaca, México. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 70:30-35.
- Mönkemann, H; Hölker, U; Höfer, M. 1997. Components of the ligninolytic system of *Fusarium oxysporum* and *Trichoderma atroviride*. *Fuel Processing Technology* 52(1-3):73-77.
- Murphy, JF; Reddy, MS; Ryu, C-M; Kloepper, JW; Li, R. 2003. Rhizobacteria-mediated growth promotion of tomato leads to protection against *Cucumber mosaic virus*. *American Phytopathological Society* 93(10):1301-1307.
- Myint, AK; Yamakawa, T; Zenmyo, T; Thao, HTB; Sarr, PS. 2011. Effects of organic-manure application on growth, grain yield, and nitrogen, phosphorus, and potassium recoveries of rice variety Manawthuka in paddy soils of differing fertility. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 42(4):457-474.
- Nemec, S; Datnoff, L; Strandberg, J. 1996. Efficacy of biocontrol agents in planting mixes to colonize plant roots and control root diseases of vegetables and citrus. *Crop Protection* 15 (8):735-742.
- Nguyen, MT; Ranamukhaarachchi, SL. 2010. Soil-borne antagonists for biological control of bacterial wilt disease caused by *Ralstonia solanacearum* in tomato and pepper. *Journal of Plant Pathology* 92(2):395-405.
- Niroshini Gunasinghe, W; Karunaratne, A. 2009. Interactions of *Colletotrichum musae* and *Lasiodiplodia theobromae* and their biocontrol by *Pantoea agglomerans* and *Flavobacterium* sp. in expression of crown rot of “Embul” banana. *BioControl* 54(4):587-596.
- O’Neill, B; Grossman, J; Tsai, M; Gomes, J; Lehmann, J; Peterson, J; Neves, E; Thies, J. 2009. Bacterial community composition in brazilian anthrosols and adjacent soils characterized using culturing and molecular identification. *Microbial Ecology* 58(1):23-35.
- Pengthamkeerati, P; Motavalli, PP; Kremer, RJ. 2011. Soil microbial activity and functional diversity changed by compaction, poultry litter and cropping in a claypan soil. *Applied Soil Ecology* 48(1):71-80.
- Peña, W; Alfaro, M; Leirós de la Peña, M. 2004. Indicadores bioquímicos para la calidad de suelos forestales desarrollados sobre serpentinitas en Galicia, España. 14 p.
- Pietikäinen, J; Kiiikkilä, O; Fritze, H. 2000. Charcoal as a habitat for microbes and its effect on the microbial community of the underlying humus. *Oikos* 89(2):231-242.
- Ping, L; Boland, W. 2004. Signals from the underground: bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *Trends in plant science* 9(6):263-6.
- Podile, AR; Prakash, AP. 1996. Lysis and biological control of *Aspergillus niger* by *Bacillus subtilis* AF 1. *Canadian Journal of Microbiology* 42(6):533-538.
- Prabhu, SA; Frageria, NK; Huber, DM; Rodriguez, FA. 2007. Potassium and plant disease. In Datnoff, LE; Elmer, WH; Huber, DM. eds. 2007. Mineral nutrition and plant disease. The American Phytopathological Society. 57-78 p.

- Pramanik, P; Ghosh, GK; Chung, YR. 2010. Changes in nutrient content, enzymatic activities and microbial properties of lateritic soil due to application of different vermicomposts: a comparative study of ergosterol and chitin to determine fungal biomass in soil. *Soil Use and Management* 26(4):508-515.
- Pramanik, P; Chung, YR. 2011. Changes in fungal population of fly ash and vinasse mixture during vermicomposting by *Eudrilus eugeniae* and *Eisenia fetida*: Documentation of cellulase isozymes in vermicompost. *Waste Management* 31(6):1169-1175.
- Press, CM; Mahaffee, WF; Edwards, JH; Kloepper, JW. 1996. Organic by-product effects on soil chemical properties and microbial communities. *Compost Science & Utilization* 4(2):70-80.
- Prithiviraj, B; Perry, LG; Badri, DV; Vivanco, JM. 2007. Chemical facilitation and induced pathogen resistance mediated by a root-secreted phytotoxin. *New Phytologist* 173(4):852-860.
- Raupach, GS; Kloepper, JW. 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology* 88(11):1158-1164.
- Riveros, AS. 2010. Inducción de resistencia en plantas: interacción planta-patógeno. Ibagué, Colombia, Universidad de Tolima. 238 p.
- Rodríguez, H; Fraga, R. 1999. Phosphate solubilizing bacteria and their role in plant growth promotion. *Biotechnology Advances* 17 319 - 339.
- Rondon, MA; Lehmann, J; Ramírez, J; Hurtado, M. 2006. Biological nitrogen fixation by common beans (*Phaseolus vulgaris* L.) increases with bio-char additions. *Biology and Fertility of Soils* 43(6):699-708.
- Rudresh, DL; Shivaprakash, MK; Prasad, RD. 2005. Effect of combined application of *Rhizobium*, phosphate solubilizing bacterium and *Trichoderma* spp. on growth, nutrient uptake and yield of chickpea (*Cicer aritenium* L.). *Applied Soil Ecology* 28(2):139-146.
- Ryu, C-M; Farag, MA; Hu, C-H; Reddy, MS; Wei, H-X; Pare, PW; Kloepper, JW. 2003. Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*. *PNAS* 100(8):4927-4932.
- Ryu, C-M; Farag, MA; Hu, C-H; Reddy, MS; Kloepper, JW; Pare, PW. 2004. Bacterial volatiles induce systemic resistance in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 134:1017-1026.
- Sailaja, PR; Podile, AR; Reddanna, P. 1998. Biocontrol strain of *Bacillus subtilis* AF 1 rapidly induces lipooxygenase in groundnut (*Arachis hypogaea* L.) compared to crown rot pathogen *Aspergillus niger*. *European Journal of Plant Pathology* 104(2):125-132.
- San-Lang, W; Shih, I-L; Wang, C-H; Tseng, K-C; Chang, W-T; Twu, Y-K; Ro, J-J; Wang, C-L. 2002. Production of antifungal compounds from chitin by *Bacillus subtilis*. *Enzyme and Microbial Technology* 31(3):321-328.
- Schönfeld, J; Gelsomino, A; van Overbeek, LS; Gorissen, A; Smalla, K; van Elsas, JD. 2003. Effects of compost addition and simulated solarisation on the fate of *Ralstonia solanacearum* biovar 2 and indigenous bacteria in soil. *Microbiology Ecology* 43:63-74.

- Sendon, PM; Seo, HS; Song, JT. 2011. Salicylic acid signaling: biosynthesis, metabolism, and crosstalk with jasmonic acid. *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry* 54(4):501-506.
- Shoresh, M; Yedidia, I; Chet, I. 2005. Involvement of jasmonic acid/ethylene signaling pathway in the systemic resistance induced in cucumber by *Trichoderma asperellum* T203. *Phytopathology* 95(1):76-84.
- Steiner, C; Teixeira, WG; Lehmann, J; Zech, W. 2004. Microbial response to charcoal amendments of highly weathered soils and Amazonian Dark Earths in Central Amazonia *In* Glaser, B; Woods, WI. eds. 2004. Amazonian Dark Earth: explorations in space and time. Heidelberg, Springer Verlag. 195-212 p.
- Steiner, C; Teixeira, WG; Lehmann, J; Nehls, T; Macêdo, JLV; Blum, WEH; Zech, W. 2007. Long term effects of manure, charcoal and mineral fertilization on crop production and fertility on a highly weathered Central Amazonian upland soil. *Plant and Soil* 291(1-2):275-290.
- Steiner, C; Das, KC; Garcia, M; Förster, B; Zech, W. 2008. Charcoal and smoke extract stimulate the soil microbial community in a highly weathered xanthic Ferralsol. *Pedobiologia* 51(5-6):359-366.
- Tan, H; Cao, L; He, Z; Su, G; Lin, B; Zhou, S. 2006. Isolation of endophytic actinomycetes from different cultivars of tomato and their activities against *Ralstonia solanacearum* in vitro. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 22(12):1275-1280.
- Thaler, J; Karban, R; Ullman, D; Boege, K; Bostock, R. 2002. Cross-talk between jasmonate and salicylate plant defense pathways: effects on several plant parasites. *Oecologia* 131(2):227-235.
- Thies, JE; Rillig, MC. 2009. Characteristics of biochar: biological properties. *In* Lehmann, J; Joseph, S. eds. 2009. Biochar for environmental management, science and technology. 85-105 p.
- Troeh, FR; Thompson, LM. 2005. Soils and soil fertility. Iowa, US, Wiley-Blackwell 489 p.
- Valenzuela-Soto, J; Estrada-Hernández, M; Ibarra-Laclette, E; Délano-Frier, J. 2010. Inoculation of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) with growth-promoting *Bacillus subtilis* retards whitefly *Bemisia tabaci* development. *Planta* 231(2):397-410.
- van Bruggen, A. 1995. Plant disease severity in high-input compared to reduced-input and organic farming systems. *Plant disease* 79(10):976-984.
- van Staden, J; Sparg, SG; Kulkarni, MG; Light, ME. 2006. Post-germination effects of the smoke-derived compound 3-methyl-2H-furo[2,3-c]pyran-2-one, and its potential as a preconditioning agent. *Field Crops Research* 98:98-105.
- Velmurugan, N; Han, SS; Lee, YS. 2009. Antifungal activity of neutralized wood vinegar with water extracts of *Pinus densiflora* and *Quercus serrata* saw dusts. *International Journal of Environmental Research* 3(2):167-176.
- Verma, M; Brar, S; Tyagi, R; Surampalli, R; Valero, J. 2007. Antagonistic fungi, *Trichoderma* spp.: panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal* 37(1):1-20.

- Vinale, F; Sivasithamparam, K; Ghisalberti, E; Marra, R; Woo, S; Lorito, M. 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40(1):1-10.
- Warnock, D; Lehmann, J; Kuyper, T; Rillig, M. 2007. Mycorrhizal responses to biochar in soil – concepts and mechanisms. *Plant and Soil* 300(1):9-20.
- Warnock, DD; Mummey, DL; McBride, B; Major, J; Lehmann, J; Rillig, MC. 2010. Influences of non-herbaceous biochar on arbuscular mycorrhizal fungal abundances in roots and soils: results from growth-chamber and field experiments. *Applied Soil Ecology* 46(3):450-456.
- Wei, Z; Yang, X; Yin, S; Shen, Q; Ran, W; Xu, Y. 2011. Efficacy of *Bacillus*-fortified organic fertiliser in controlling bacterial wilt of tomato in the field. *Applied Soil Ecology* 48(2):152-159.
- Woitke, M; Hanafi, A; Schnitzler, WH. 2004a. Effect of salinity and *Bacillus subtilis* on white fly (*Trialeurodes vaporariorum*, Westwood) in hydroponically grown tomatoes (*Lycopersicon esculentum* mill.). Proceedings of the Viith International Symposium on Protected Cultivation in Mild Winter Climates: Production, Pest Management and Global Competition. Vol. 1 - 2:323-329.
- Woitke, M; Junge, H; Schnitzler, WH. 2004b. *Bacillus subtilis* as growth promotor in hydroponically grown tomatoes under saline aonditions. Proceedings of the Viith International Symposium on Protected Cultivation in Mild Winter Climates: Production, Pest Management and Global Competition. Vol. 1 - 2:363-369.
- Wu, T; Sharda, JN; Koide, RT. 2003. Exploring interactions between saprotrophic microbes and ectomycorrhizal fungi using a protein–tannin complex as an N source by red pine (*Pinus resinosa*). *New Phytologist* 159(1):131-139.
- Xue, Q-Y; Chen, Y; Li, S-M; Chen, L-F; Ding, G-C; Guo, D-W; Guo, J-H. 2009. Evaluation of the strains of *Acinetobacter* and *Enterobacter* as potential biocontrol agents against *Ralstonia* wilt of tomato. *Biological Control* 48(3):252-258.
- Yamatol, M; Okimori, Y; Wibowo, I; Anshoriz, S; Ogawa, M. 2006. Effects of the application of charred bark of *Acacia mangium* on the yield of maize, cowpea and peanut, and sol chemical properties in South Sumatra, Indonesia. *Soil Science and plant nutrition* 52:489-495.
- Yanai, Y; Toyota, K; Okazaki, M. 2007. Effects of charcoal addition on N₂O emissions from soil resulting from rewetting air-dried soil in short-term laboratory experiments. *Soil Science & Plant Nutrition* 53(2):181-188.
- Yedidia, I; Srivastva, AK; Kapulnik, Y; Chet, I. 2001. Effect of *Trichoderma harzianum* on microelement concentrations and increased growth of cucumber plants. *Plant and Soil* 235(2):235-242.
- Yobo, KS; Laing, MD; Hunter, CH. 2001. Effect of single and combined inoculations of selected *Trichoderma* and *Bacillus* isolates on growth of dry bean and biological control of *Rhizoctonia solani* damping-off. *African Journal of Biotechnology* 10(44):8746-8756.
- Yobo, KS; Laing, MD; Hunter, CH. 2009. Effects of single and dual applications of selected *Trichoderma* and *Bacillus* Isolates on performance of dry bean seedlings grown in composted

- pine bark growth medium under shadehouse conditions. *Journal of Plant Nutrition* 32(8):1271-1289.
- Yoshizawa, S; Tanaka, S; Ohata, M; Mineki, S; Goto, S; Fujioka, K; Kokubun, T; . 2005. Composting of food garbage and livestock waste containing biomass charcoal. Proceedings of the International Conference and Natural Resources and Environmental management 2005. Kuching, Sarawak. 13 p.
- Zackrisson, O; Nilsson, M-C; Wardle, DA. 1996. Key ecological function of charcoal from wildfire in the boreal forest. *Oikos* 77(1):10-19.
- Zarate, SI; Kempema, LA; Walling, LL. 2007. Silverleaf wInduces salicylic acid defenses and suppresses effectual jasmonic acid defenses. *Plant Physiology* 143(2):866-875.
- Zehnder, G; Kloepper, J; Tuzun, S; Yao, C; Wei, G; Chambliss, O; Shelby, R. 1997a. Insect feeding on cucumber mediated by rhizobacteria-induced plant resistance. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 83:81 - 85.
- Zehnder, G; Kloepper, J; Yao, C; Wei, G. 1997b. Induction of systemic resistance in cucumber against cucumber beetle (Coleoptera: *Chrysomelidae*) by plant-growth-promoting rhizobacteria. *Entomological Society of America* 90(2):391 - 396.
- Zhang, S; Moyne, A-L; Reddy, MS; Kloepper, JW. 2002. The role of salicylic acid in induced systemic resistance elicited by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. *Biological Control* 25 288 - 296.
- Zhang, W; Dick, WA; Hoitink, HAJ. 1996. Compost-induced systemic acquired resistance in cucumber to *Pythium* root rot and anthracnose. *Phytopathology* 86(10):1066-1070.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis químicos de los sustratos sometidos a los diferentes Tratamientos utilizados en el experimento de evaluación del crecimiento y producción de biomasa del tomate.

Trat.	pH	Acidez	Ca	Mg	K	-----mg/l-----						
						P	Cu	Zn	Mn	Fe	N	C
-----cmol(+)/l-----												

						%						
						%						
T	5,51	0,19	1,53	0,50	0,08	9,5	18	0,9	12,2	32	0,04	0,45
B	5,58	0,11	1,90	0,62	0,29	9,5	18	1,0	15,4	33	0,04	1,34
L	7,32	0,07	4,26	1,34	4,54	12,5	33	2,4	7,9	127	0,19	1,98
LB	7,32	0,09	4,25	1,34	4,46	13,5	33	2,0	8,0	133	0,19	2,51
G	6,47	0,08	4,23	0,84	0,25	26,6	25	3,1	12,1	35	0,06	0,73
GB	6,17	0,07	4,24	0,90	0,46	30,7	25	3,3	15,2	33	0,07	1,43
S	7,22	0,06	4,70	1,52	4,34	13,9	36	2,4	7,0	118	0,18	1,88
SB	7,33	0,06	4,87	1,63	4,80	14,9	38	2,6	7,7	135	0,23	2,82
TR	7,46	0,06	4,71	1,52	4,71	15,1	37	2,2	8,9	135	0,20	2,04
TRB	7,39	0,08	4,62	1,53	4,97	14,0	37	2,3	7,0	115	0,20	2,71
TRS	7,49	0,07	4,70	1,50	4,67	14,8	37	2,4	7,8	119	0,20	2,06
TRSB	7,4	0,06	4,26	1,39	4,43	12,8	34	2,1	6,8	104	0,20	2,60

Anexo 2. Transformación de los datos para cumplir con los supuestos del experimento de crecimiento y producción de biomasa del tomate.

	modelo y		varIdent		varExp		varPower		varConstPower	
	AIC	BIC	AIC	BIC	AIC	BIC	AIC	BIC	AIC	BIC
Tasa crecimiento	1272.78	1310.33	1277.16	1344.21	1269.59	1309.82	1270.24	1310.47	1272.24	1315.15
Número de Hojas	450.23	487.78	460.27	527.32	452.23	492.46	452.23	492.46	454.23	497.14
Peso seco	201.97	224.14	201.27	240.85	197.34	221.09	193.12	216.87	195.12	220.46

Variable	Normalidad	Homogeneidad de varianza
Crecimiento	Correcta	Transformación logarítmica (ln) de los datos
Producción de hojas	Correcta	Correcta
Peso seco	Correcta	Función de varianza potencia corrida por una constante (<i>VarPower</i>)

Anexo 3. Características de crecimiento no tomadas en cuenta en la evaluación del efecto del biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos y microorganismos benéficos sobre el crecimiento y producción de biomasa del tomate.

Tratamiento	Diámetro (mm)			Peso fresco (g)			Número de flores		
G	9.17	± 0.27	a	138,12	± 6,03	a	20	± 1,35	a
GB	9.05	± 0.27	a	133,82	± 6,68	a	19,5	± 1,35	a
SB	8.30	± 0.23	b	70,39	± 2,07	b	13,1	± 1,12	bc
TRSB	8.21	± 0.27	b	57,87	± 3,27	c	14,6	± 0,72	b
TRB	8.06	± 0.17	b	46,86	± 3,27	de	11,3	± 1,12	cd
L	7.90	± 0.23	b	57,65	± 2,07	c	12,2	± 0,72	c
S	7.78	± 0.37	b	44,84	± 3,27	e	12	± 1,12	cd
TR	7.75	± 0.17	b	47	± 2,07	de	6,9	± 1,12	e
LB	7.73	± 0.17	b	54,95	± 3,27	cd	11,7	± 1,35	cd
TRS	7.65	± 0.27	b	41,11	± 3,27	e	9,6	± 0,72	d
B	6.25	± 0.27	c	17,84	± 0,78	f	3,9	± 0,72	f
T	5.71	± 0.10	d	13,52	± 0,91	g	0,5	± 0,72	g
F	48.07			226.57			63,41		
<i>p</i>	<0,001			<0,001			<0,001		

Anexo 4. Transformación de los datos para la evaluación de la resistencia de plantas de tomate contra la mosca blanca.

Variable	Modelo y		varIdent		varExp		varPower		varConstPower	
	AIC	BIC	AIC	BIC	AIC	BIC	AIC	BIC	AIC	BIC
Ninfas/cm ²	97.59	119.76	73.70	113.29	66.23	89.98	64.17	87.92	66.17	91.51
Adultos/pl.	885.35	1039.42	873.50	1060.16	870.07	1027.10	867.97	1025.00	869.97	1029.96

Variable	NORMALIDAD	Varianzas homogéneas
Número de adultos/planta	Transformación de la variable a Raíz cuadrada	Función de varianza potencia (<i>VarPower</i>)
Número de ninfas/cm ²	Correcta	Función de varianza potencia (<i>VarPower</i>)

Anexo 5. Análisis químico del suelo utilizado en el experimento de inducción de resistencia de la combinación del biocarbón con fertilizantes orgánicos y microorganismos benéficos en plantas de tomate

Elemento químico	Unidad	Valor
Ca	cmol(+)/l	6,30
Mg	cmol(+)/l	1,43
K	cmol(+)/l	0,51
P	mg/l	8,0
Cu	mg/l	13,8
Zn	mg/l	3,6
Mn	mg/l	23
Fe	mg/l	191
N	%	0,34
C	%	3,64
pH	Unidad pH	5,13
Acidez	cmol(+)/l	0,52

Anexo 6. Salida de identificación de la bacteria *Pseudomonas corrugata*.

Especie	PROB	SIM	DIST	TIPO
1 <i>Pseudomonas corrugata</i>	99	0,61	5,96	GN-NENT OXI+
2 <i>Pseudomonas Fluorescens</i> biotipo G	1	0,003	7,67	GN-NENT GN-NENT
3 <i>Pseudomonas synxantha</i>	0	0,001	8,25	OXI+
4 <i>Pseudomonas syringar</i> pv <i>tagetis</i>	0		8,72	GN-NENT GN-NENT
5 <i>Pseudomonas putida</i> biotipo B	0		8,9	OXI+ GN-NENT
6 <i>Pseudomonas asplenii</i>	0		9,11	OXI+ GN-NENT
7 <i>Ralstonia picketti</i>	0		9,17	OXI+
8 <i>Pseudomonas Fluorescens</i> biotipo C	0		9,63	GN-NENT GN-NENT
9 <i>Pseudomonas marginalis</i>	0		9,66	OXI+ GN-NENT
10 <i>Ralstonia solacearum</i>	0		10,24	OXI+

Identificación realizada por el Centro de Investigación Agronómica (CIA) de la UCR, San José, Costa Rica.

Anexo 7. Transformación de los datos de peso seco de la parte foliar y radicular de las plantas de tomate en el experimento de inducción de resistencia contra *P. corrugata*.

Variable	modelo y		varIdent		varExp		varPower		varConstPower		varIdent ag. *	
	AIC	BIC	AIC	BIC	AIC	BIC	AIC	BIC	AIC	BIC	AIC	BIC
peso seco foliar	-0.39	26.23	13.84	62.08	1.40	29.69	1.40	29.68	3.29	33.23	-	-
Peso seco radicular	52.19	73.50	55.62	94.25	49.50	72.15	-	-	-	-	39.09	65.74

* modelo varIdent donde la varianza esta corregida por la formación de grupos de Tratamientos

Variable	NORMALIDAD	Varianzas homogéneas
Peso seco foliar	Correcta	Transformación logarítmica (ln) de los datos
Peso seco radicular	Correcta	Transformación a raíz cuadrada de los datos Función de varianza identidad (<i>varIdent</i>) con agrupamiento de tratamientos

Anexo 8. Análisis químico abono empleado en el experimento de campo para el pepino y tomate

Elemento químico	Unidad	Valor
Ca	%	5,89
Mg	%	0,50
K	%	1,42
P	%	2,18
N	%	2,39
C	%	24,25
Cu	mg/kg	117
Zn	mg/kg	180
Mn	mg/kg	1443
Fe	mg/kg	17188
Humedad	%	25,4

Anexo 9. Modelos experimento campo

Variable	modelo y	varIdent	varExp	varPower	varConstPower	varIdent ag. *
----------	----------	----------	--------	----------	---------------	----------------

Variable	AIC	BIC	AIC	BIC	AIC	BIC	AIC	BIC	AIC	BIC	AIC	BIC
Incidencia de la marchitez bacterial	1390.0	1501.8	1391.4	1520.9	1392.0	1506.7	1383.6	1498.3	1385.5	1503.2	-	-
Producción del pepino	77.0	89.0	76.6	96.6	78.98	92.3	79.0	92.3	-	-	69.5	84.1

* modelo varIdent donde la varianza esta corregida por la formación de grupos de Tratamientos

Variable	Normalidad	Varianzas homogéneas
Incidencia de la marchitez bacterial	Correcta	Correcta
Producción de frutos del pepino	Correcta	Función de varianza identidad (<i>varIdent</i>) con agrupamiento de tratamientos por rangos varianzas

Anexo 10. Cuadro resultados crecimiento semanal del tomate: cuadro de resultados de la comparación de medias (DGC, $p \leq 0.05$) para la ANOVA realizada bajo diseño en parcelas divididas en bloques (a) y cuadro de resultados reunidos por semana de evaluación (b).

Medias				
TRAT	SEMANA	Crecimiento	E.E.	
SB	7	6.79	0.05	A
L	7	6.70	0.05	B
SB	6	6.69	0.05	B
S	7	6.67	0.05	B
TRSB	7	6.65	0.05	B
LB	7	6.64	0.05	B
TRB	7	6.62	0.05	B
TRS	7	6.60	0.05	B
L	6	6.58	0.05	B
SB	5	6.55	0.05	B
S	6	6.54	0.05	B
TRSB	6	6.53	0.05	B
LB	6	6.52	0.05	B
TR	7	6.52	0.05	B
TRB	6	6.52	0.05	B
GB	7	6.51	0.05	B
TRS	6	6.51	0.05	B
G	7	6.46	0.05	C
L	5	6.46	0.05	C
B	7	6.45	0.05	C

TR	6	6.43	0.05	C	
GB	6	6.42	0.05	C	
LB	5	6.42	0.05	C	
S	5	6.41	0.05	C	
TRSB	5	6.41	0.05	C	
TRB	5	6.40	0.05	C	
SB	4	6.40	0.05	C	
TRS	5	6.39	0.05	C	
G	6	6.39	0.05	C	
B	6	6.35	0.05	C	
TR	5	6.34	0.05	C	
GB	5	6.32	0.05	C	
TRSB	4	6.27	0.05		D
L	4	6.27	0.05		D
G	5	6.26	0.05		D
TRB	4	6.24	0.05		D
T	7	6.24	0.05		D
TRS	4	6.24	0.05		D
B	5	6.23	0.05		D
LB	4	6.21	0.05		D
S	4	6.21	0.05		D
TR	4	6.20	0.05		D
T	6	6.18	0.05		D
GB	4	6.17	0.05		D
SB	3	6.13	0.05		D
G	4	6.12	0.05		D
T	5	6.10	0.05		D
B	4	6.05	0.05		E
TRB	3	6.00	0.05		E
TRSB	3	6.00	0.05		E
TR	3	5.98	0.05		E
TRS	3	5.98	0.05		E
L	3	5.93	0.05		E
T	4	5.93	0.05		E
LB	3	5.92	0.05		E
S	3	5.92	0.05		E
G	3	5.86	0.05		E
GB	3	5.85	0.05		E
B	3	5.76	0.05		F
SB	2	5.72	0.05		F
TRB	2	5.69	0.05		F
TR	2	5.68	0.05		F
TRSB	2	5.68	0.05		F
T	3	5.65	0.05		F

TRS	2	5.62	0.05	F	
LB	2	5.59	0.05	F	
S	2	5.57	0.05	F	
G	2	5.56	0.05	F	
L	2	5.55	0.05	F	
GB	2	5.48	0.05		G
B	2	5.39	0.05		G
T	2	5.29	0.05		G
LB	1	5.16	0.05		H
TR	1	5.13	0.05		H
TRB	1	5.13	0.05		H
SB	1	5.10	0.05		H
G	1	5.10	0.05		H
TRSB	1	5.09	0.05		H
TRS	1	5.08	0.05		H
GB	1	5.05	0.05		H
L	1	5.02	0.05		H
S	1	5.02	0.05		H
B	1	4.93	0.05		I
T	1	4.88	0.05		I

Medias con una letra común no son significativamente diferentes($p \leq 0.05$)

Tratamiento	Crecimiento (%)*						
	semana 1	semana 2	semana 3	semana 4	semana 5	semana 6	semana 7
SB	164,0 a	304,9 a	459,4 a	601,8 a	699,2 a	804,3 a	888,9 a
L	151,4 a	257,2 a	376,2 b	528,5 b	639,1 b	720,5 a	812,4 b
S	151,4 a	262,4 a	372,4 b	497,7 b	607,9 b	692,3 a	788,4 b
TRSB	162,4 a	292,9 a	403,4 b	528,5 b	607,9 b	685,4 a	772,8 b
LB	174,2 a	267,7 a	372,4 b	497,7 b	614,0 b	678,6 a	765,1 b
TRB	169,0 a	295,9 a	403,4 b	512,9 b	601,8 b	678,6 a	749,9 b
TRS	160,8 a	275,9 a	395,4 b	512,9 b	595,9 b	671,8 a	735,1 b
TR	169,0 a	292,9 a	395,4 b	492,7 b	566,8 b	620,2 b	678,6 b
GB	156,0 a	239,8 b	347,2 b	478,2 b	555,6 b	614,0 b	671,8 b
G	164,0 a	259,8 a	350,7 b	454,9 b	523,2 c	595,9 b	639,1 c
B	138,4 b	219,2 b	317,3 c	424,1 c	507,8 c	572,5 b	632,7 c
T	131,6 b	198,3 b	284,3 c	376,2 c	445,9 c	483,0 c	512,9 d

Anexo 11. Análisis químico del suelo para cada tratamiento en el experimento de productividad del pepino

Tratamiento	pH	Acidez	Ca	Mg	K	P	Cu	Zn	Mn	Fe	N	C
	(H ₂ O)	-----cmol(+)/l-----				-----mg/l-----						(%)
T	6,82	0,05	13,88	3,74	0,55	248	13	12	16	130	0,53	5,39
B	6,53	0,07	11,70	3,06	0,80	169	15	9	18	142	0,31	4,19
G	6,81	0,05	13,41	3,62	0,81	257	14	12	15	120	0,42	4,29
G B	6,85	0,05	11,26	3,24	0,90	200	15	9	13	111	0,29	3,86
G B M	6,82	0,05	12,68	3,30	0,96	278	14	12	14	119	0,40	4,87
M	6,43	0,06	11,85	3,61	0,69	235	14	9	22	139	0,45	4,63
M B	6,75	0,05	12,00	3,06	0,71	229	14	9	14	128	0,34	4,56

Anexo 12. Cuadro de comparación de medias (LSD, $p \leq 0.05$) del número de adultos posados en plantas de tomate sometidas a la aplicación de biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos y microorganismos benéficos.

Tratamiento	DDI	Medias del número de adultos	E.E.	
G	15	27.37	1.82	A
GB	15	25.81	2.40	A B
G	8	22.53	1.82	B C
L	15	20.87	1.73	B C D
LB	15	20.20	1.69	C D E
GB	8	19.72	2.40	C D E F
TRS	15	19.58	1.68	C D E F
TR	15	18.13	1.47	C D E F
L	8	17.29	1.73	D E F
S	15	17.04	1.76	D E F
TRB	15	16.71	1.65	D E F
SB	15	16.15	1.50	E F
TRSB	15	14.93	1.54	F G
LB	8	14.44	1.69	F G
SB	8	12.06	1.50	G H
TRSB	8	11.05	1.54	G H I
TRS	8	11.02	1.68	G H I
TR	8	10.69	1.47	G H I
S	8	10.53	1.76	G H I

TRB	8	9.66	1.65	H I
G	1	7.54	1.82	H I J
G	2	7.11	1.82	H I J K
GB	1	6.37	2.40	H I J K L
L	2	6.16	1.73	I J K L
GB	2	5.96	2.40	I J K L
SB	2	5.13	1.50	J K L
L	1	4.74	1.73	J K L
T	15	4.67	1.63	J K L
B	15	4.42	1.80	J K L
TRS	1	4.37	1.68	J K L
TRB	2	4.33	1.65	J K L
SB	1	4.32	1.50	J K L
TRS	2	4.18	1.68	J K L
LB	2	4.15	1.69	J K L
TR	1	3.95	1.47	J K L
S	2	3.82	1.76	J K L
LB	1	3.59	1.69	J K L
TRB	1	3.50	1.65	J K L
S	1	3.47	1.76	J K L
TRSB	2	3.46	1.54	J K L
TR	2	3.28	1.47	J K L
T	8	3.22	1.63	J K L
B	8	2.75	1.80	J K L
TRSB	1	2.74	1.54	K L
T	2	1.49	1.63	L
B	1	1.47	1.80	L
B	2	1.37	1.80	L
T	1	1.25	1.63	L

Anexo 13. Cuadro de comparación de medias (LSD, $p \leq 0.05$) de incidencia de la marchitez bacterial en tomate.

TRAT	DDT	Medias de incidencia (%)	E.E.	
T	53	100.00	10.75	A
M	53	100.00	10.75	A
M	44	100.00	10.75	A
GBM	53	93.33	10.75	A B
G	53	93.33	10.75	A B
M	38	93.33	10.75	A B
B	53	93.33	10.75	A B

T	44	93.33	10.75	A B
MB	53	86.67	10.75	A B C
T	38	80.00	10.75	A B C D
GB	53	80.00	10.75	A B C D
M	31	66.67	10.75	B C D E
G	44	66.67	10.75	B C D E
GBM	44	60.00	10.75	C D E
B	44	60.00	10.75	C D E
T	31	60.00	10.75	C D E
GBM	38	53.33	10.75	D E F
G	38	53.33	10.75	D E F
MB	44	46.67	10.75	E F
T	21	40.00	10.75	E F G
MB	38	40.00	10.75	E F G
B	38	40.00	10.75	E F G
GB	44	40.00	10.75	E F G
MB	31	26.67	10.75	F G H
B	31	26.67	10.75	F G H
M	21	26.67	10.75	F G H
GB	38	26.67	10.75	F G H
GB	31	13.33	10.75	G H
MB	21	13.33	10.75	G H
G	31	6.67	10.75	H
GBM	31	6.67	10.75	H
B	21	6.67	10.75	H
G	21	0.00	10.75	H
GBM	21	0.00	10.75	H
GB	21	0.00	10.75	H

Anexo 14. Cuadro resultados incidencia marchitez bacterial

TRatamiento	Incidencia de la enfermedad (%)														
	21 DDT			31 DDT			38 DDT			44 DDT		53 DDT			
	valor	error		valor	error		valor	error		valor	error	valor	error		
M	26,67	a	10,39	66,67	a	10,39	93,33	a	10,39	100	a	10,39	100	a	10,39
T	40	ab	9,64	60	a	9,64	80	ab	9,64	93,33	ab	9,64	100	a	9,64
B	6,67	ab	11,87	26,67	bc	11,87	40	c	11,87	60	c	11,87	93,33	a	11,87
MB	13,33	b	9,66	26,67	bc	9,66	40	c	9,66	46,67	c	9,66	86,67	a	9,66
G	0	b	13,46	6,67	c	13,46	53,33	bc	13,46	66,67	bc	13,46	93,33	a	13,46
GB	0	b	9,29	13,33	bc	9,29	26,67	c	9,29	40	c	9,29	80	a	9,29
GBM	0	b	8,92	6,67	c	8,92	53,33	bc	8,92	60	c	8,92	93,33	a	8,92

Anexo 15. Peso seco de la parte vegetativa y radicular de las plantas de tomate en presencia de biocarbón, fertilizantes mineral, orgánicos y microorganismos benéficos. Turrialba, Costa Rica, 2011.

Tratamiento *	Peso seco (g)	
	Parte vegetativa	Raíces
GB	28,22 ± 1,03 a	6,30 ± 0,0361 a
SB	23,34 ± 1,05 ab	4,75 ± 0,0676 ab
G	23,10 ± 1,13 abc	5,86 ± 0,0004 a
MB	21,98 ± 1,02 bc	3,61 ± 0,0144 b
S	20,09 ± 1,03 bc	4,67 ± 0,0676 ab
M	20,09 ± 1,06 bc	3,31 ± 0,0049 b
LB	20,09 ± 1,07 bc	3,72 ± 0,0049 b
TRB	19,89 ± 1,07 bc	3,20 ± 0,0049 b
TRSB	19,49 ± 1,11 bc	4,04 ± 0,0361 ab
TRS	19,30 ± 1,06 c	4,28 ± 0,0144 ab
TR	19,30 ± 1,06 c	3,96 ± 0,0361 ab
L	18,36 ± 1,07 c	4,84 ± 0,0049 a
B	8,41 ± 1,09 d	1,74 ± 0,0361 c
T	8,33 ± 1,06 d	1,46 ± 0,0004 c

* T-B: suelo con y sin biocarbón; G-GB: gallinaza con y sin biocarbón ; L-LB : lombricompost con y sin biocarbón ; S-SB: lombricompost + *Bacillus subtilis* con y sin biocarbón; TR-TRB: lombricompost + *Trichoderma harzianum* con y sin biocarbón; TRS-TRSB: lombricompost + *T. harzianum* + *B. subtilis* con y sin biocarbón.