

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

EVALUACION DE INDUCTORES DE RESISTENCIA A GEMINIVIRUS Y
PROMOTORES DEL CRECIMIENTO EN EL CULTIVO DEL TOMATE.

Tesis sometida a la consideración del comité técnico
académico del programa de estudios de postgrado en Ciencias
Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical
de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de

MAGISTER SCIENTIAE

POR

Jaime Iván Jiménez López

Turrialba, Costa Rica

1996

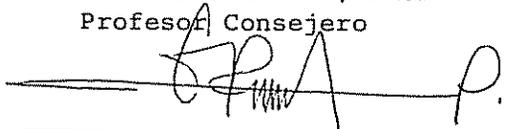
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Jefatura del Area de Postgrado en Ciencias Agricolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

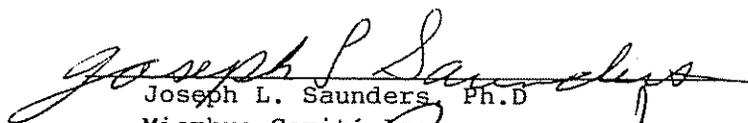
FIRMANTES:



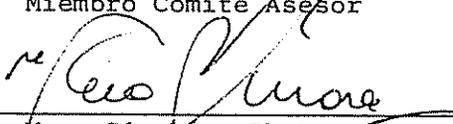
Elkin Bustamante, Ph.D
Profesor Consejero



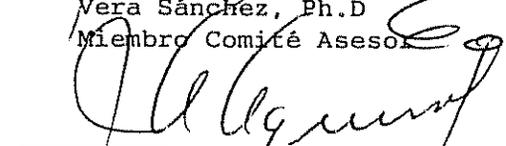
Gonzalo Galileo Rivas, M.Sc
Miembro Comité Asesor



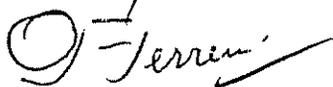
Joseph L. Saunders, Ph.D
Miembro Comité Asesor



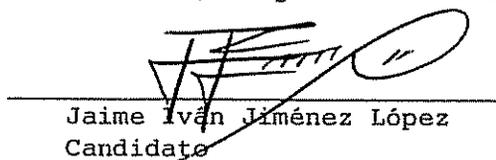
Vera Sánchez, Ph.D
Miembro Comité Asesor



Jean Antonio Aguirre, Ph.D
Jefe, Area de Postgrado



Pedro Ferreira, Ph.D
Director, Programa de Enseñanza



Jaime Iván Jiménez López
Candidato

DEDICATORIA

A la memoria de mi madre Belia

A mi papá Jaime

A mi niña Belia María

A mis hermanos Luz Dariela, Ana Marlen, Luis Darío, Lesly
Yadira y Cruz Mideyvi

A mi tía Margarita

A mis queridos sobrinos

A Susana y su querida familia.

AGRADECIMIENTO

Mi más sincero agradecimiento a las siguientes personas:

A OVERSEAS DEVELOPMENT ADMINISTRATION (ODA) por haber financiado mis estudios.

A la FUNDACION HONDUREÑA DE INVESTIGACION AGRICOLA (FHIA) por haberme otorgado el permiso para poder realizar mis estudios.

Al Dr. Elkin Bustamante, por su asesoría en esta investigación.

Al Ing. Galileo Rivas Platero M.Sc por su valiosa cooperación como miembro del comité asesor.

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

A la Dra. Vera Sánchez Garita por su asesoría.

Al Ing. Gustavo López por su orientación estadística.

A mi compañero Pedro Pineda por su amistad y colaboración en el análisis estadístico de datos.

A Nick Muir por su especial amistad.

A mis compañeros y amigos de la promoción 95-96.

Al personal del laboratorio de fitopatología de MIP-CATIE por su colaboración y amistad: Arturo Gamboa, Roberto González, Manrique González, Herbert González y Mario Cervantes.

Al Centro de Documentación MIP por su valiosa ayuda.

A Guiselle, Isabel y Asalia por su amistad y cooperación

Al personal de la biblioteca conmemorativa Orton por su amable cooperación, en especial al Bach. Rigoberto Aguilar.

Al personal del Centro de Cómputo y de Postgrado.

A todas aquellas personas que de diferente forma contribuyeron a la realización de este trabajo.

INDICE

RESUMEN.....	vii
SUMMARY.....	viii
LISTA DE CUADROS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xi
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	4
2.1. DESCRIPCION BOTANICA DEL CULTIVO	4
2.1.1. Fenología del cultivo.....	4
2.2. EL VECTOR: TAXONOMIA, BIOLOGIA Y ECOLOGIA	5
2.3. GEMINIVIRUS	7
2.3.1. Detección de geminivirus mediante la hibridación de ácidos nucleicos.....	9
2.3.2. Relación virus-vector.....	10
2.4. CONTROL BIOLOGICO	11
2.4.1. Uso de rizobacterias en el control biológico.....	12
2.4.2. Uso de agentes químicos no tóxicos como inductores de resistencia sistémica.....	16
2.4.3. Enmiendas orgánicas.....	18
2.4.4. Mecanismos bioquímicos involucrados en la inducción de resistencia.....	18
2.5. INDUCCION DE RESISTENCIA EN LAS SOLANACEAS	21
III. OBJETIVOS	24
3.1. OBJETIVO GENERAL	24
3.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	24
IV. HIPOTESIS	24
V. MATERIALES Y METODOS	25
5.1 LOCALIZACION DE LOS EXPERIMENTOS	25
5.2. Aislamiento de microorganismos de la rizósfera.....	25
5.3. prueba de inducción de resistencia.....	27
5.3.2. Manejo de vectores.....	27
5.3.3. Tratamiento con "bocashi"	28
5.3.4. Plantas utilizadas.....	28
5.3.5. Inoculación de microorganismos.....	28
Experimento # 1. Inoculación al suelo al momento de la siembra.....	29
Experimento # 2. Inoculación a las semillas al momento de la siembra.....	29
5.3.6. Aplicación del agente químico.....	29
5.3.7. Transmisión del virus.....	30
5.4. VARIABLES DE RESPUESTA Y ANALISIS ESTADISTICO	31
5.4.1. Altura.....	31
5.4.2. Diámetro.....	31
5.4.3. Evaluación de la severidad de síntomas.....	31

5.4.4. Producción de biomasa.....	32
5.4.5. Detección del geminivirus.....	32
A) Toma de muestras foliares.....	32
B) Preparación de las muestras.....	32
5.5. DISEÑO EXPERIMENTAL	33
5.6. TRATAMIENTOS	33
5.7. MODELO ESTADISTICO	33
5.8. ANALISIS ESTADISTICO	34
VI. RESULTADOS Y DISCUSION	35
6.1. AISLAMIENTO DE RIZOBACTERIAS	35
6.2. CONDICIONES DEL SUELO Y TEMPERATURA	35
6.3. MANEJO DE LAS PLANTAS EN LOS EXPERIMENTOS.	36
6.4. Promoción del crecimiento.....	37
6.5. DETECCION DEL GEMINIVIRUS	42
6.6. INDUCCION DE RESISTENCIA EVALUADA SEGUN LA SEVERIDAD DE SINTOMAS	42
6.7. PRODUCCION DE BIOMASA	48
6.8. CORRELACION ENTRE INDICE DE SEVERIDAD DE SINTOMAS CON ALTURA, DIAMETRO Y PRODUCCION DE BIOMASA.	52
VII. CONCLUSIONES	54
VIII. RECOMENDACIONES	55
IX. BIBLIOGRAFIA	56
X. ANEXOS	67

JIMENEZ LOPEZ, J.I. 1996. Evaluación de inductores de resistencia a geminivirus y promotores del crecimiento en el cultivo del tomate.

Palabras claves: Rizobacterias, fosfatos, "bocashi", resistencia sistémica, inducción, inoculación, tomate, geminivirus, *Bemisia tabaci*, virosis.

RESUMEN

Se evaluó a nivel de invernadero el efecto de rizobacterias, un fosfato y "bocashi" en la inducción de resistencia sistémica contra geminivirus y en la promoción del crecimiento de las plantas de tomate de mesa, var. Haylip de crecimiento determinado.

Se estableció un diseño completamente al azar con 4 repeticiones. Todos los tratamientos fueron inoculados con geminivirus, a excepción del testigo absoluto, a los 24 días después de la germinación (ddg). Los tratamientos en estudio fueron tres rizobacterias aisladas de raíces de plantas de tomate colectadas en el campo: CS-10, LE-2 y LE-12 y tres de la colección MIP-CATIE: *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus* y *Pseudomonas cepacia*. La inoculación de los microorganismos se realizó de dos formas: al suelo y a la semilla al momento de la siembra.

También se evaluó un fosfato (K_2HPO_4) inoculado en la segunda hoja apical a los 16 ddg. El abono orgánico "bocashi" se mezcló con el suelo en una proporción de 12 % v/v. Se incluyó dos testigos, uno absoluto y uno relativo, ambos sin ningún tratamiento y el primero sin virus y el segundo inoculado con geminivirus.

Para infectar las plantas con virus se utilizaron adultos de moscas blancas que se mantuvieron sobre plantas infectadas con el mosaico amarillo del tomate dentro de otro invernadero. Para la detección del geminivirus en las plantas se utilizó el método de hibridación de ácidos nucleicos. Las películas de detección mostraron señales de la presencia del virus en las plantas de tomate inoculadas.

Se evaluó la altura, diámetro de tallo y producción de biomasa de la planta y la severidad de la enfermedad.

La cepa A30 de *Bacillus cereus* promovió el crecimiento y redujo la severidad del mosaico amarillo cuando fue inoculada a la semilla, no así, cuando fue inoculada al suelo. La aspersión del fosfato K_2HPO_4 sobre una hoja de la planta promovió el crecimiento y redujo la severidad de la enfermedad. También los tratamientos con el abono orgánico "bocashi" promovieron sustancialmente el crecimiento de las plantas y disminuyeron el daño por la virosis.

JIMENEZ LOPEZ, J.I. 1996. Evaluation of resistance inducers to geminivirus, and growth promoters in the cultivation of tomato.

Keywords: rhizobacteria, phosphates, ``bocashi``, systemic resistance, induction, inoculation, tomato, geminivirus, *Bemisia tabaci*, virosis.

Summary

The effects of rhizobacteria, a phosphate and ``bocashi`` were evaluated for induction of systemic resistance against geminivirus and in the promotion of growth of the tomato cultivar ``Hayslip``, of determinant growth.

A completely random design with four repetitions was established. All treatments were inoculated 24 days after germination with geminivirus with the exception of the absolute control. The treatments were three rhizobacteria strains isolated from the roots of field collected tomato plants: CS-10, LE-2 and LE-12 and three of the MIP-CATIE collection: *Serratia marcescens*, *Bacillus cereus* and *Pseudomonas cepacia*. The inoculation was carried out two forms: to the soil and to the seed at planting.

A phosphate (K_2HPO_4) was also evaluated, inoculating the second apical leaf 16 days after germination. In the treatment with the organic fertiliser ``bocashi`` this was mixed with the soil to 12% of the total. Two controls were included, one absolute and one relative, neither with a treatment, the first without virus and the second inoculated with geminivirus.

To infect plants with virus adult whiteflies previously kept on plants infected with the tomato yellow mosaic virus were introduced to the glass house. Nucleic acid hybridization was used to detect the geminivirus in plants. This technique detected the presence of the virus in inoculated tomato plants.

Height, stem diameter, biomass production and the severity of the disease were evaluated.

The A30 strain of *Bacillus cereus* promoted growth and reduced the severity of the tomato yellow mosaic virus when inoculated to the seed, though not when inoculated to the soil. The spraying of the phosphate K_2HPO_4 on one leaf of each plant promoted growth and reduced the severity of the disease. The treatments with the organic fertiliser ``bocashi`` also substantially promoted growth and reduced viral damage to the plants.

LISTA DE CUADROS

Cuadro	pag.
1. Características morfológicas de las cepas aisladas de plantas colectadas en el campo.	35
2. Prueba de Duncan para las medias de ABCPE, según los tratamientos en cada experimento.	43
3. Correlaciones entre índices de severidad con altura, diámetro y producción de biomasa en inoculación al suelo.	51
4. Correlaciones entre índices de severidad con altura, diámetro y producción de biomasa en inoculación a la semilla.	52

LISTA DE FIGURAS

Figura	pag.
1. Promedios de altura según los tratamientos en inoculación al suelo.	40
2. Promedios de altura según los tratamientos en inoculación a la semilla.	41
3. Promedios de índices de severidad según los tratamientos en inoculación al suelo.	46
4. Promedios de índices de severidad según los tratamientos en inoculación a la semilla.	47
5. Promedios de peso fresco y peso seco (g) según los tratamientos en inoculación al suelo.	50
6. Promedios de peso fresco y peso seco (g) según los tratamientos en inoculación a la semilla.	51

LISTA DE ANEXOS

Anexo	pág.
1. Promedios de peso fresco y peso seco (g) según los tratamientos.	68
2. Promedios finales de altura (cm), diámetro (mm) e índice de severidad de síntomas según los tratamientos.	68
3. Condiciones ambientales durante los experimentos.	69
4. Medias de altura, diámetro y severidad de síntomas según los tratamientos.	70
5. Correlación entre índices de severidad de síntomas y producción de biomasa.	70
6. Lecturas de radiación durante los experimentos.	71
7. Análisis de varianza para las variables: altura, diámetro y síntomas.	71
8. Contrastes ortogonales para las variables: altura, diámetro y síntomas en inoculación al suelo.	72
9. Contrastes ortogonales para las variables: altura, diámetro y síntomas en inoculación a la semilla.	72
10. Análisis de varianza para las variables: peso fresco y peso seco.	73
11. Contrastes ortogonales para las variables: peso fresco y peso seco en inoculación al suelo.	73
12. Contrastes ortogonales para las variables: peso fresco y peso seco en inoculación a la semilla.	74

I. INTRODUCCION

El tomate (*Lycopersicon esculentum*) es el cultivo hortícola más importante a nivel centroamericano, debido al área sembrada que es de aproximadamente 21,000 ha/año, como también por el valor de su producción que supera los US\$50 millones por año. Por la magnitud de su explotación este cultivo genera entrada de divisas, es fuente de empleos y promueve una importante actividad económica por el monto de insumos y horas/hombre utilizados en su producción, agroindustria y comercialización. Además, es fuente importante de vitaminas y de minerales, por lo que tiene un alto valor nutricional (CATIE/MIP 1990).

La producción de tomate en Centro América se destina principalmente al consumo fresco. Pero se ha incrementado su uso en la industria de alimentos lo que ha provocado un aumento en el área sembrada. La mayor parte del área cultivada en Centro América se siembra en Guatemala (9.600 ha.) y Honduras (3.500 ha.) (CATIE/MIP 1990).

A pesar de que las explotaciones tomateras son intensivas y tecnificadas, los rendimientos son bajos (12.75 ton/ha) en comparación con Estados Unidos y Europa, donde se obtiene un promedio de 25 ton/ha. Una de las causas de esta baja producción es la incidencia de plagas, que en ocasiones destruyen por completo el cultivo o reducen de manera sustancial el rendimiento, haciendo de estas explotaciones una actividad poco rentable (CATIE/MIP 1990).

El principal problema en la actualidad en el cultivo del tomate, es la presencia de la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae) como vector de geminivirus, los que provocan enormes pérdidas en el cultivo, ya que afectan el rendimiento y la calidad del fruto. Es común observar, que las plantas se encuentren totalmente infectadas al momento de la cosecha (Hilje y Arboleda 1993).

Como reacción a los severos daños provocados por los virus transmitidos por la mosca blanca, los productores en su afán de asegurar la cosecha, han incrementado el uso de insecticidas como medida casi exclusiva de control del vector. Whitaker (1993) reporta que el consumo de plaguicidas en las regiones menos desarrolladas es cada vez mayor y se cree que al año 2000 el tercer mundo representará el 35% de la demanda mundial de plaguicidas. Los daños graves que esto provoca a la vida humana y animal y al entorno ecológico hace necesario la búsqueda de otras alternativas de manejo de los problemas agrícolas. Una alternativa prometedora es el uso del control biológico a través de técnicas como la inducción de resistencia sistémica a enfermedades por microorganismos no patógenos, agentes orgánicos y químicos no tóxicos.

Liu *et al.* (1992) y Raupach *et al.* (1995) encontraron que cepas de rizobacterias, además de promover el crecimiento, activan los mecanismos de defensa natural presentes en las plantas de pepino dándoles protección contra el virus del mosaico del pepino (CMV); similares resultados encontraron Maurhofer *et al.* (1994) evaluando rizobacterias en plantas de tabaco contra el virus de la necrosis (TNV).

Doubrava *et al.* (1988), Gottstein y Kuc (1989) y Mucharromah y Kuc (1991), encontraron que la aspersión de fosfatos en plantas de pepino inducen resistencia sistémica en las plantas contra el virus de la necrosis del tabaco (TNV). Reuveni *et al.* (1993) demostraron que la aspersión de sales de fosfatos en la primera hoja verdadera de plantas de pepino promovieron el crecimiento e indujeron resistencia sistémica en las plantas contra el mildio polvoriento.

Los abonos orgánicos, además de mejorar la fertilidad y la productividad de los suelos, contienen microorganismos benéficos y aumentan la población y la actividad benéfica de la microflora nativa (Higa y Wididana 1989). Los efectos benéficos que genera la incorporación de abonos orgánicos al suelo se expresan en un crecimiento vigoroso de las plantas, lo que las hace más resistentes a situaciones adversas.

Este trabajo tuvo como propósito determinar la actividad de las bacterias de la rizosfera, las sales de fosfato y abonos orgánicos, en la promoción del crecimiento e inducción de resistencia sistémica contra geminivirus en las plantas de tomate.

II. REVISION DE LITERATURA

2.1. Descripción botánica del cultivo

El tomate (*Lycopersicon esculentum*) cultivado en la actualidad se deriva de un ancestro que aún se encuentra en forma silvestre en los trópicos de Centro América y que se conoce comúnmente como "tomatillo" (*L. esculentum* var. *cerasiforme*). Ambos pertenecen a la familia Solanaceae. Esta familia se reconoce fácilmente en el campo por particulares características botánicas. En forma característica sus miembros contienen alcaloides (en el caso del tomate, tomatina), cuyas concentraciones varían dependiendo de la especie y parte de la planta (CATIE/MIP 1990).

2.1.1. Fenología del cultivo

El desarrollo de una variedad de tomate de hábito determinado, en condiciones del trópico seco bajo y con riego, comienza con la plántula en el semillero, en donde se mantiene por 20 a 25 días. Luego del transplante, el tomate continúa en su etapa vegetativa por 30 a 35 días más, y de los 50 a 60 días (30 a 35 días después del transplante), inicia la floración. La etapa reproductiva, floración y fructificación, se extiende por 32 a 40 días antes de la cosecha, la cual se inicia de los 62 a 75 días después del transplante. Bajo condiciones de buena nutrición y sanidad del cultivo, se realizan 6 o 7 cortes, según la variedad, durante un periodo de 20 a 25 días. En este caso el ciclo total del cultivo, desde el transplante hasta el último corte, oscila entre 82 y 100 días (CATIE/MIP 1990).

2.2. El vector: Taxonomía, biología y ecología

Bemisia tabaci (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae), mosca blanca.

Se han reportado aproximadamente 1,200 especies de moscas blancas (Bink-Moenen y Mound 1990). Por lo menos 30 especies están en América Central, el Caribe y Colombia (Caballero 1993). *B. tabaci* es la más importante y le sigue *Trialeurodes vaporariorum* (Hilje y Arboleda 1993).

Los adultos de varias especies son similares, por lo que su identificación a simple vista podría no ser acertada. La separación de las especies se basa en las características del cuarto estadio ninfal (Bink-Moenen y Mound 1990).

B. tabaci tiene una gran complejidad genética; las ninfas del cuarto estadio desarrolladas sobre hojas pubescentes también son pubescentes, mientras que las encontradas sobre hojas glabras carecen de setas (Mound 1963). Tiene capacidad de desarrollar resistencia a los insecticidas, debido a su corto ciclo de vida y a la partenogénesis arrenotóquica, que se presenta ocasionalmente (Byrne y Bellows 1991). Existen varias razas o biotipos, asociadas con hospedantes específicos. En el mundo existen muchos biotipos, de los cuales siete están en América Central y el Caribe, denominados A, B, C, D, E, F, G y N (Brown 1993). El biotipo B tiene más importancia, y difiere con el biotipo A en varios aspectos: tiene mayor fecundidad; completa su desarrollo en el cultivo del tomate; ataca más cultivos, incluyendo crucíferas (coliflor y brócoli), cítricos y papaya; e induce los síndromes de la "hoja plateada" en algunas cucurbitáceas y de la maduración irregular en el tomate (Brown 1993). Este biotipo fue descrito recientemente como *Bemisia argentifolii* (Bellows et al. 1994).

Bemisia tabaci presenta una alta capacidad de adaptación a nuevas zonas geográficas. Aunque *B. tabaci* históricamente ha

habitado regiones tropicales y subtropicales, el biotipo B tiene mayor tolerancia al frío y ha extendido su ámbito de distribución a zonas marcadamente templadas (Brown 1993).

Lo complejo del problema con *B. tabaci* se debe a dos factores: sus altas poblaciones y la asociación con geminivirus. Los geminivirus son bastante dañinos ya que se reproducen en el floema y se translocan en toda la planta (Lastra 1993). Las densidades altas dependen del potencial reproductivo, el cual está determinado por la fecundidad, tiempo generacional y proporción de sexos (Hilje 1994).

Los datos sobre fecundidad (numero de huevos por hembra) son variables. Los valores reportados en algunas regiones fluctúan entre 72 y 127.5 típicamente, dependiendo del hospedante, la edad del follaje, la humedad relativa, e incluso del biotipo (Gerling *et al.* 1986).

La proporción de sexos, que es la relación entre el número de hembras y el número machos en la progenie, es muy variable. Las hembras tienen la capacidad para reproducirse sin fertilización, originando sólo machos, lo que se conoce como partenogénesis arrenotóquica (Byrne y Bellow 1991).

La estabilidad de las temperaturas máximas en los trópicos así como la elevada humedad relativa permite a *B. tabaci* reproducirse ininterrumpidamente y presentar generaciones superpuestas (Hilje *et al.* 1993).

Las ninfas de *B. tabaci* son sedentarias, por lo que sólo los adultos se desplazan y transmiten virus (Byrne y Houck 1989). Tanto los adultos como las ninfas permanecen en el envés de las hojas. La hembra prefiere ovipositar en el follaje tierno de tomate, que contiene bastantes azúcares y nitrógeno (van Lenteren y Noldus 1990).

Se ha demostrado la polifagia de *B. tabaci* y la preferencia por ciertas familias de hospedantes (Greathead 1986). Además de hospedantes silvestres, ataca a 16 cultivos, pertenecientes en su mayoría a las familias Convolvulaceae, Cucurbitaceae, Leguminosae, Malvaceae y Solanaceae (Hilje y Arboleda 1993).

En América Central y el Caribe los principales cultivos atacados por la mosca blanca son el tomate, frijol (*Phaseolus vulgaris*), berenjena (*Solanum melongena*), pepino (*Cucumis sativus*), sandía (*Citrullus lanatus*), melón (*Cucumis melo*), papa (*Solanum tuberosum*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), algodón (*Gossypium hirsutum*), soya (*Glycine max*), kenaf (*Hibiscus cannabinus*), okra (*Hibiscus esculentus*), ajonjolí (*Sesamum indicum*), camote (*Ipomoea batatas*) y pimiento (*Capsicum annum*) (Hilje y Arboleda 1993).

La mosca blanca tiene varios enemigos naturales entre los que se encuentran los parasitoides pertenecientes al orden Hymenoptera de las familias: Aphelinidae y Platygasteridae y el superparasitoide *Signiphora aleyrodis* (Hanson et al. 1994).

Como depredadores se reportan algunos coleópteros de la familia Coccinellidae, neurópteros de la familia Chrysopidae, hemípteros de las familias Miridae y Lygaeidae, y dípteros de la familia Dolichopodidae (Alvarez et al. 1993, Caballero 1993, Serrano et al. 1993).

2.3. Geminivirus

El nombre geminivirus se deriva de su característica de doble partícula (del latín gemini=gemelo). Estas partículas isométricas miden aproximadamente de 18 a 20 nm y se presentan predominantemente en pares que miden aproximadamente 20x30 nm. Los geminivirus son marcadamente uniformes en otras propiedades. Contienen una molécula de ADN de cadena simple con un peso molecular de $0.7-0.9 \times 10^6$, cuya característica es única para ellos por el momento. La mayoría de virus de plantas

colectadas en Centro América (Gálvez y Castaño, 1976) y en el Caribe (Goodman *et al.* 1977). Goodman (1977) demostró por primera vez que las partículas virales gemelas del mosaico dorado del frijol proveniente de Puerto Rico (bean golden mosaic virus-PR) contenían una molécula simple de ADN. La primera secuencia de nucleótidos de un geminivirus transmitido por mosca blanca, el "african cassava mosaic" (ACMV), fue publicada en 1983 por Stanley and Gay. Por el momento se han publicado por lo menos la secuencia de 14 geminivirus diferentes (Ramírez y Maxwell 1994).

Según el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV), de acuerdo al insecto vector, rango de hospederos y estructura del genoma, los geminivirus se dividen en tres subgrupos que constituyen los géneros de lo que hoy se conoce como la familia *Geminiviridae*. Del subgrupo I forman parte los virus con genoma monopartita que infectan a monocotiledóneas al ser transmitidos por saltahojas. Dentro del subgrupo II se encuentran los virus que también son transmitidos por saltahojas pero a dicotiledóneas, en cambio, los virus que conforman el subgrupo III presentan genoma bipartita. El rango de hospederos de cada subgrupo no está correlacionado con las secuencias de nucleótidos de las diferentes especies de geminivirus, por lo que se propone considerar como criterio de clasificación dentro de la familia *Geminiviridae*, a dichas secuencias (Ramírez 1996).

2.3.1. Detección de geminivirus mediante la hibridación de ácidos nucleicos

Una técnica efectiva para el diagnóstico de los geminivirus es la hibridación de ácidos nucleicos (Gilbertson *et al.* 1991). La hibridación molecular se basa en la condición monocatenaria de dos bandas de ácidos nucleicos con una secuencia de bases complementarias que al reaccionar forman un híbrido bicatenario. Los métodos de diagnóstico de viroides y virus están basados en la capacidad de hibridación de los ácidos

nucleicos complementarios, por la cual, el ácido nucleico que debe detectarse se fija a un soporte sólido (filtro o membrana de nitrocelulosa o nylon.) para que la sonda ("probe") en solución pueda hibridarse sobre ese ácido nucleico ya fijado en la membrana. Esta técnica detecta el ácido nucleico viral por el reconocimiento específico de la correspondiente secuencia de nucleótidos (Rivas Platero 1993).

2.3.2. Relación virus-vector

El vínculo entre los virus y sus vectores no consiste simplemente de una transmisión mecánica de las partículas virales. Algunos virus bastante infecciosos como el virus del mosaico del tomate (TMV) y el virus x de la papa (PVX), son eficientemente transmitidos por contacto o por insectos masticadores, como es el caso de los saltamontes y larvas de lepidópteros. Sin embargo, los virus son por lo general altamente específicos en su relación con un grupo taxonómico y en la mayoría de los casos su transmisión depende de una sola especie de insecto (Lastra 1993).

De acuerdo a la persistencia del virus en el vector y en la habilidad de éste de transmitir la enfermedad, se han caracterizado los siguientes tipos de transmisión viral: no persistente, semipersistente y persistente. Esta última puede ser circulativa o propagativa (Lastra 1993).

Cuando el vector mantiene su capacidad infectiva a lo largo de su vida o por un tiempo relativamente largo es del tipo persistente y cuando las partículas virales solamente circulan en el cuerpo del insecto, la transmisión se conoce como persistente circulativa. En cambio, en la transmisión persistente propagativa, las partículas virales tienen la habilidad de infectar y multiplicarse en las células del insecto vector (Uzcategui y Lastra 1978).

liquefaciens actúa como protectora ante infecciones causadas por *Fusarium oxysporum* fsp *dianthi* (Sneh et al. 1985).

Los microorganismos epífitos más comúnmente encontrados son las bacterias Gram-negativas: *Erwinia*, *Pseudomonas*, *Xantomonas* y Flavobacterias; y las Gram-positivas: *Lactobacillus*, *Bacillus* y *Corynebacterium* (Blakeman y Fokkema 1982).

Contrario a la creencia de que la presencia de bacterias en el interior de los tejidos de las plantas se debía solamente a condiciones patológicas, se da la colonización de bacterias benéficas en el interior de los tejidos de las plantas, como es el caso de las bacterias *Rhizobium* fijadoras de nitrógeno en leguminosas (Jacobs et al. 1985).

2.4.1. Uso de rizobacterias en el control biológico

Investigaciones a través de muchos años han usado la introducción de microorganismos para el control de enfermedades del suelo en las plantas. Se han realizado numerosos estudios con la utilización de microorganismos no parásitos en el control biológico y estos trabajos han dejado evidencia de que la inoculación con bacterias al suelo y a semillas promueven el crecimiento en las plantas (Broadbent et al. 1977, Kloepper et al. 1990, Kloepper y Schroth 1991).

La capacidad de colonizar raíces es específica de algunas cepas. No todas las *Pseudomonas* fluorescentes exhiben la capacidad de colonizar las raíces en el campo, en suelos que contienen microorganismos competitivos. A las bacterias de la rizosfera que colonizan las raíces se les conoce como "rizobacterias" (Schroth y Hancock 1982).

La teoría de "equilibrio microbioal" sostiene que la microflora de la rizosfera se encuentra en un estado de equilibrio dinámico tal que la población de algún microorganismo introducido declina rápidamente después de su inoculación en el suelo. El primer informe sobre la

introducción de una bacteria específica que podría superar el "balance biológico" de la rizosfera se produjo en 1980 con el uso de la resistencia antibiótica de algunas cepas de *Pseudomonas* fluorescentes. Estas cepas alteraron la población nativa de hongos y bacterias de la raíz y colonizaron las raíces de las plantas durante toda la etapa de crecimiento (Kloepper *et al.* 1980).

Las rizobacterias pueden ejercer uno de los siguientes tipos de efectos en la planta hospedera: nocivo, neutral o benéfico. Las rizobacterias benéficas son aquellas que promueven el crecimiento en las plantas. Los efectos generales de las rizobacterias benéficas son de dos tipos: promoción del crecimiento de la planta y como agentes de control biológico (Kloepper y Schroth 1981).

Investigaciones acerca del modo de acción de las rizobacterias han demostrado que ellas promueven el crecimiento de la planta de dos maneras; una es en forma indirecta, ya que las rizobacterias benéficas reducen la actividad de los hongos y bacterias patógenos nativos en el rizoplano. Tal promoción indirecta del crecimiento puede ser considerada como control biológico, aún cuando esto no necesariamente está asociado con control de patógenos parásitos de la planta (Kloepper y Schroth 1981).

Algunas rizobacterias promueven directamente el crecimiento de la planta, por la producción de metabolitos que estimulan el crecimiento de la planta independientemente de la microflora nativa del suelo. *Pseudomonas putida*, cepa GR12-2, promueve la emergencia y el crecimiento de *Brassica campestris*. Cuando se estudió en un ensayo con una enfermedad provocada por *Pythium* en el suelo, GR12-2 mostró actividad de control biológico. Esto se debe supuestamente a que la rizobacteria, al acelerar las tasas de crecimiento, hace que las raíces escapen a la enfermedad (Kloepper *et al.* 1990).

Cepas específicas del grupo *Pseudomonas fluorescens-putida* fueron usadas por Kloepper *et al.* (1980) como inóculo en semillas de cultivos para promover el crecimiento e incrementar la producción. Estas *Pseudomonas* expresaron la promoción del crecimiento de la planta y rápidamente colonizaron las raíces de papa, remolacha azucarera y rábano. La promoción del crecimiento por las rizobacterias se da por antagonismo contra los hongos y bacterias perjudiciales que se encuentran en el rizoplasma, pero la naturaleza de este antagonismo no ha sido determinada. Según este trabajo se encontró evidencia de que la promoción del crecimiento por rizobacterias resulta por su actividad de privar del hierro a la microflora nativa. Las rizobacterias generan la producción extracelular de sideróforos (agentes transportadores del hierro microbiano) los cuales aprovechan el hierro ambiental, cualidad que es menos disponible en la cierta microflora nativa (Kloepper *et al.* 1980).

Liu *et al.* (1992), evaluaron la habilidad de cepas de rizobacterias de inducir resistencia sistémica contra el virus del mosaico del pepino (cucumber mosaic virus, CMV). Estas cepas de rizobacterias que promueven el crecimiento de las plantas previamente demostraron su actividad de inducir resistencia sistémica contra *Colletotrichum orbiculare* en pepino. Se inocularon las semillas de pepino con dos cepas de rizobacterias y las plantas fueron inoculadas con extractos de CMV. El tratamiento con una cepa de rizobacteria resultó en una significativa disminución en el porcentaje de síntomas manifestados 7 días después de haber sido infectadas con CMV, en relación a las plantas sin tratar. Una de las cepas no tuvo efectos significativos sobre los síntomas. Los autores concluyeron que el mecanismo por el cual estas rizobacterias promotoras del crecimiento inducen resistencia sistémica contra patógenos fúngicos y virus no es la producción de un metabolito bacteriano sino por otro mecanismo particular que aún no ha sido determinado.

En otro trabajo realizado por Raupach *et al.* (1995), cepas de rizobacterias promotoras del crecimiento, que previamente habían demostrado actividad en la inducción de resistencia sistémica contra otras enfermedades del pepino, fueron evaluadas en su actividad de inducir resistencia sistémica contra el virus del mosaico (CMV) en pruebas de invernadero. La inoculación de las rizobacterias se hizo tanto al suelo como a las semillas y el virus fué inoculado mecánicamente en los cotiledones o en la primera hoja de plantas con 2 o 3 hojas verdaderas. El virus se detectó mediante la prueba ELISA. La reducción en la severidad de la enfermedad por la actividad de las rizobacterias estuvo ligada a la forma en que se infectó a la planta. En las plantas en las cuales se inoculó los cotiledones no se presentaron los síntomas de la enfermedad y no se detectó el virus en las hojas no inoculadas. Al contrario, cuando se inocularon con CMV las primeras hojas verdaderas, en las plantas tratadas con rizobacterias disminuyó la severidad de la enfermedad, aunque los niveles de acumulación del virus fué similar a las plantas no tratadas. De estos resultados se desprende que las rizobacterias, además de su habilidad de promover el crecimiento, por su actividad de inducción de resistencia sistémica se pueden constituir en una forma de control biológico.

Maurhofer *et al.* (1994), evaluando la cepa CHAO de *Pseudomonas fluorescens* en la inducción de resistencia sistémica en tabaco contra el virus de la necrosis (TNV), encontraron que todas las plantas tratadas mostraban resistencia en las hojas a la infección con TNV en la misma magnitud que plantas previamente inmunizadas con TNV (protección cruzada).

2.4.2. Uso de agentes químicos no tóxicos como inductores de resistencia sistémica

Doubrava *et al.* (1988), Gottstein y Kuc (1989) y Mucharromah y Kuc (1991) mostraron que la aspersion de una hoja de plantas de pepino con oxalato, K_2HPO_4 , o K_3PO_4 le confiere al pepino protección sistémica contra antracnosis, después de haber sido inoculado con *Colletotrichum lagenarium*. La protección se expresó en la reducción del número y diámetro de las lesiones en pruebas de laboratorio y de invernadero.

Los tratamientos con oxalato, así como la inoculación con *C. lagenarium* le dan protección al pepino contra *C. cucumerinum*, *Dydimella bryonae*, *Sphaerotheca fuliginea* cuando estos se compararon con sus respectivos controles.

Todos los químicos que se probaron también protegieron al pepino contra la mancha angular (*Pseudomonas lachrymans*) y contra el virus de la necrosis del tabaco (TNV). El tratamiento con K_3PO_4 dió protección contra el virus del mosaico del pepino (CMV).

Debido a la inconsistencia en la aplicación de las soluciones químicas, el nivel de protección varió de experimento a experimento. Los tres químicos también causaron daños variables sobre la hoja asperjada. La mayor capacidad de *C. lagenarium* que los químicos probados de inducir resistencia sistémica, sugiere que el estrés provocado por la infección es más efectivo para la inducción. El mecanismo por el cual actúan los químicos restringiendo la enfermedad es aún desconocido.

Los mecanismos de defensa de las plantas pueden ser activados por infecciones causadas por varios patógenos o por el estrés causado por químicos. Este estudio provee información preliminar que puede facilitar la aplicación de tecnología de inmunización, usando compuestos químicos no tóxicos para la protección de plantas (Mucharromah y Kuc 1991).

Reuveni *et al.* (1993), encontraron que la aspersión de sales de potasio (K_2HPO_4 , KH_2PO_4 , $Na_4P_2O_7$ y Na_3PO_4) en el as de la primera hoja verdadera de plantas de pepino 2 h después de la inoculación con una suspensión conidial de *Sphaerotheca fuliginea*, indujo protección sistémica contra el mildew polvoriento en las hojas 2 y 3. La inducción con K_2HPO_4 o KH_2PO_4 fué la más efectiva, manifestándose con menos pústulas de mildew polvoso por planta al compararlas con las plantas asperjadas con agua. Una aspersión de K_2HPO_4 sobre la hoja 1, dos o cuatro días después de la inoculación también estimuló el crecimiento de la planta, a pesar de la inoculación con el patógeno. Las sales de fosfatos actúan como fertilizantes foliares y como agentes inductores de resistencia sistémica en las plantas.

Gottstein y Kuc[´] (1989), encontraron que la resistencia a antracnosis causada por *Colletotrichum lagenarium* puede ser inducida por tratamientos químicos con fosfatos. Mucharromah y Kuc[´] (1991), encontraron que estos compuestos inducen resistencia sistémica contra *Sphaerotheca fuliginea*.

Todos estos resultados respaldan la evidencia de que las plantas susceptibles poseen mecanismos de defensa y que éstos pueden ser activados por infecciones atenuadas por varios patógenos o por un estrés provocado por la aplicación de un químico. Esto se cree que es posible porque los químicos inductores pueden disparar un signo el cual puede activar la expresión de los genes de defensa los cuales hacen que las plantas respondan más después de la infección (Mucharromah y Kuc[´] 1991).

El traslado de la inducción de la hoja inducida a otras partes de la planta disminuye con el tiempo. Estos resultados respaldan la hipótesis de que la hoja inducida es la fuente de los "signos" de resistencia transmitidos (Dean y Kuc[´] 1986).

2.4.3. Enmiendas orgánicas

Los abonos orgánicos pueden ser de origen animal, vegetal y mixtos. Las enmiendas orgánicas aumentan los rendimientos agrícolas, mejoran la estructura del suelo y su fertilidad. Un abono orgánico debidamente descompuesto agrega nutrientes y humus al suelo y además mejora su capacidad de retención de agua, el drenaje y la aireación. También agrega y promueve el aumento de la población de microorganismos protectores y la formación de antibióticos, hormonas y otras sustancias beneficiosas que protegen las plantas de enfermedades, insectos y nemátodos dañinos (BUN 1993).

Adiciones regulares de enmiendas orgánicas al suelo, incluyendo residuos de cosechas, estiércol de animales, abonos verdes y residuos de compuestos orgánicos, aumentan la fertilidad del suelo y la productividad. Las enmiendas orgánicas incrementan significativamente el número de microorganismos benéficos en el suelo. Por muchos años los científicos han investigado los efectos benéficos de sus actividades como la fijación biológica del nitrógeno, la descomposición de la materia orgánica, mineralización, nitrificación, antagonismo (contra patógenos del suelo) y fermentación (Higa y Wididana 1989).

La microflora benéfica del suelo tiene actividad en la promoción del crecimiento y en la inducción de resistencia sistémica en las plantas contra patógenos y esa actividad se ve favorecida por la incorporación al suelo de abonos orgánicos.

2.4.4. Mecanismos bioquímicos involucrados en la inducción de resistencia

La resistencia inducida se presenta en las plantas de diferentes maneras y envuelve una serie compleja de procesos en la planta que se manifiestan después de la llegada del patógeno. Además la resistencia inducida puede ser localizada o

sistémica. El término que con frecuencia se les identifica es resistencia local inducida y resistencia sistémica inducida, respectivamente. Los procesos fisiológicos involucrados pueden ser considerados a varios niveles: a nivel citológico observado a través del microscopio como una respuesta hipersensitiva o cambios en la estructura de la pared celular o en los niveles bioquímicos y moleculares, por ejemplo, como una acumulación inducida de proteínas particulares o sus moléculas de ARN. La acumulación inducida de enzimas biosintéticas puede resultar en la producción de metabolitos secundarios tóxicos mientras otras proteínas del huésped detienen el desarrollo del patógeno directamente, por ejemplo, por el fortalecimiento de la pared celular. Un ejemplo de activación inducida de proteínas pre-existentes por patógenos es la calosa sintetasa (Basra 1994).

Mientras los efectos patológicos pueden ser considerados como evidencia directa de inducción de resistencia, algunos datos bioquímicos son necesarios para concluir que la reducción observada en la severidad de las enfermedades son el resultado de las reacciones de defensa del hospedero antes que de los metabolitos antifúngicos producidos por las bacterias promotoras del crecimiento en las plantas (PGPR, siglas en inglés). La resistencia en la clásica inmunidad de las plantas se expresa como una reducción del tamaño y número de las lesiones y en una menor esporulación. En cucurbitáceas, apresorios de *Colletotrichum lagenarium* penetraron mucho menos en plantas de pepino inmunizadas que en las plantas control (Richmond *et al.* 1979). La inmunización de tabaco, sin embargo, muestra un desarrollo limitado del hongo dentro de las hojas después de la penetración (Stolle *et al.* 1988).

En general, la inmunización por la sensibilización de las plantas hace que éstas respondan rápidamente contra agentes infecciosos. Tratamientos con agentes inmunizadores activan rápidamente múltiples mecanismos de resistencia a enfermedades los cuales, en plantas susceptibles, están latentes o se

expresan tardíamente para controlar la enfermedad. Estos mecanismos incluyen la acumulación de antimicrobios químicos de bajo peso molecular como fitoalexinas (Tuzun *et al.* 1989) y biopolímeros protectores como lignina, calosa y glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (Hammerschmidt *et al.* 1982). También hay incrementos en la actividad de enzimas dirigidas a la producción de los citados productos, e incrementos en la cantidad de otros productos primarios tales como quitinasas, β -1,3-glucanasas, peroxidasas y otras proteínas relacionadas con la patogénesis (Lawton *et al.* 1987).

Quitinasas y β -1,3-glucanasas son biológicamente activas contra hongos ya que hidrolizan polímeros de la pared celular, y peroxidasas que generan peróxidos y fenoles oxidantes, importantes en la biosíntesis de la lignina. Estas enzimas también, probablemente, forman parte de los multicomponentes de los efectivos mecanismos de la inmunización de plantas contra enfermedades. Los multicomponentes naturales de los mecanismos de defensa asociados con inmunización generan una resistencia muy estable (Tuzun *et al.* 1995).

Varios estudios indican que PGPR específicas pueden estimular la producción de compuestos bioquímicos asociados con las defensas del hospedero. Van Peer *et al.* (1991) observaron un incremento en la acumulación de fitoalexinas en plantas de clavel tratadas con PGPR antes de la inoculación del patógeno. La colonización de las raíces de las plantas por PGPR está asociada con el incremento de la lignificación de tallos y hojas en frijoles (Anderson *et al.* 1985) y en trigo (Frommel *et al.* 1991).

Reportes de investigaciones en frijol demuestran que la inoculación de las semillas o raíces con una bacteria particular puede provocar cambios en el sistema fisiológico de las plantas (Zdor *et al.* 1992). Recientes investigaciones con PGPR asociadas a la inducción de resistencia en pepino sugieren

que la respuesta bioquímica de la planta puede depender de la inducción por la cepa de PGPR. Algunas inducciones por PGPR están asociadas con el incremento de la actividad de la peroxidasa similar a lo observado en los controles con inducción clásica. Algunas cepas de PGPR inductoras están asociadas con el incremento de moléculas de ARN que codifican la síntesis de quitinasas (Wei *et al.* 1992).

Maurhofer *et al.* (1994) encontraron que cepas CHAO de *Pseudomonas* indujeron la síntesis de proteína PR y resistencia al virus de la necrosis del tabaco, pero también encontraron que hubo otras cepas que no tuvieron la capacidad de lograrlo. Ellos también señalan que no puede ser excluida la posibilidad de que los metabolitos microbiales sean atraídos por la planta y ser transportados a los sitios de infección donde pueden interactuar directamente con el patógeno o pueden inducir resistencia local.

2.5. Inducción de resistencia en las solanáceas

Para producir hortalizas libres de residuos químicos y mejorar el medio ambiente, existe la necesidad de utilizar alternativas, como métodos libres de contaminantes para el control de enfermedades. Una de las técnicas más prometedoras para la protección de plantas es el método de inducción de resistencia. Este método se basa en la estimulación de los mecanismos de defensa natural en los tejidos de las plantas y no en la supresión directa del patógeno como ocurre con la aplicación de plaguicidas (Ozeretskoyevskaya 1995).

Cuando las plantas son sometidas a estrés, sus defensas pueden ser suprimidas. Una amplia aplicación de plaguicidas químicos clásicos para la protección de plantas y mantener las cosechas en el campo no puede reemplazar las defensas naturales de las plantas. La inducción de resistencia es frecuentemente referida como inmunización, sensibilización, vacunación, inmunidad adquirida y algunas veces protección cruzada. En

principio, todos estos términos denotan algún fenómeno que es una activación artificial de los mecanismos de defensa de las plantas en el curso de su ontogénesis (Ozeretskoykaya 1995).

Existen varias maneras de inducir resistencia en plantas, incluyendo las solanáceas. Esto se puede lograr inoculando las plantas con patógenos o con patógenos inactivados, tratamiento con metabolitos microbiales, tratamiento con químicos o mediante la inoculación con razas avirulentas y/o microorganismos no patogénicos. Se conocen dos tipos de resistencia inducida: local y sistémica. La resistencia inducida local se desarrolla dentro de un área limitada de tejidos de plantas, i.e. en el sitio de inducción. La resistencia sistémica inducida se desarrolla en los tejidos de las plantas mas allá del sitio de inducción (Ozeretskoykaya 1995).

La inducción de resistencia sistémica en plantas de papa es ilustrada por el trabajo de Stromberg y Brishammar (1991), cuando varias hojas bajas de papa fueron infectadas con esporas de *Phytophthora infestans* (razas 1, 3, 4, 7, 8) o con *P. cryptogea*, un microorganismo no patogénico de papa aislado del trigo. Infecciones localizadas en las hojas bajas inducen resistencia sistémica en hojas superiores que resulta en 30-70 % de protección contra la enfermedad causada por *P. infestans*. El microorganismo no patógeno de la papa, *P. cryptogea*, induce un grado de resistencia superior al de *P. infestans*. La infección inicial de hojas bajas produjo señal sistémica que indujo resistencia en las hojas superiores. La inducción de resistencia local y sistémica en papa no solamente puede lograrse por infecciones limitadas a patógenos o no-patógenos sino también por tratamiento de los tejidos de las plantas con compuestos químicos producidos por microorganismos (Ozeretskoykaya 1995).

El termino "inductores biogénicos" usualmente denota metabolitos producidos por microorganismos o plantas, que inducen la producción de fitoalexinas en los tejidos de las plantas. Sin embargo es bien conocido que la resistencia de la planta está basada en una combinación de respuestas de defensa donde la acumulación de fitoalexinas es solamente un componente. Por esta razón, la habilidad de un compuesto particular para inducir la acumulación de fitoalexina en las plantas no confirma definitivamente que este compuesto pueda proteger los tejidos de la planta contra enfermedades por inducción de resistencia (Metlitskii y Ozeretskoyanskaya 1985).

La infección del gen-N del tabaco con el virus del mosaico del tabaco (TMV) resultó en inducción de resistencia local para siguientes inoculaciones con TMV. Así también, la inoculación de una hoja con TMV generó resistencia que se expresó en otras hojas no inoculadas de la misma planta (Ross 1961).

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Determinar el efecto de los microorganismos presentes en la rizosfera, un agente orgánico y uno químico como activadores de los mecanismos de defensa y promotores del crecimiento en las plantas.

3.2. Objetivos específicos

-Evaluar la eficiencia de las rizobacterias como inductoras de resistencia sistémica a geminivirus y como promotoras del crecimiento en plantas de tomate.

-Estudiar el efecto del Bocashi y de K_2HPO_4 en la inducción de resistencia sistémica a geminivirus y en la promoción del crecimiento en las plantas de tomate.

IV. HIPOTESIS

Los microorganismos presentes en la rizosfera de las plantas de tomate y el uso de agentes orgánicos y químicos no activan los mecanismos de defensa natural de la planta, por lo que no le confieren resistencia contra los geminivirus, ni promueven su crecimiento.

V. MATERIALES Y METODOS

5.1 Localización de los experimentos

Los experimentos se realizaron en el laboratorio de diagnóstico MIP-CATIE y en un invernadero del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE); Turrialba, Costa Rica. La temperatura promedio anual es de 21°C, con una máxima promedio de 26°C y una mínima promedio de 18°C. El promedio anual de la humedad relativa es de 87% y una radiación solar promedio de 16.4 Mj/cm² (Jiménez 1994). Se hicieron lecturas de la radiación fotosintéticamente activa dentro del invernadero y se reportaron mínimas de 105 y máximas de 456 $\mu\text{moles/m}^2.\text{s}$ (Anexo 6).

5.2. Aislamiento de microorganismos de la rizosfera

Se tomaron muestras de raíces de plantas de tomate en un campo de cultivo del cantón de Grecia. Se muestreó aleatoriamente dentro del campo de cultivo tratando, en cada lugar de muestreo, de incluir plantas con la expresión típica de la virosis y plantas libres de síntomas.

Se utilizaron dos formas para obtener la solución con los microorganismos:

- Se removió la mayor cantidad de suelo posible y se hizo un lavado de las raíces con agua destilada estéril para obtener una solución con las pequeñas partículas de suelo adheridas a la superficie de las raíces.

- Las raíces se cortaron en trozos pequeños y se obtuvo de cada planta una muestra de 5 g. Cada una de las muestras se colocó en un erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de agua destilada estéril agitándose por 45 min.

De cada una de las dos soluciones obtenidas se tomó 1 ml y se colocó en un tubo de ensayo con 9 ml de agua destilada estéril.

Posteriormente se procedió a realizar diluciones decimales hasta 10^{-5} , según la técnica empleada por Leben (1961). De las diluciones se tomaron 20 μ l y se rayaron en platos de Petri cuyo contenido era el medio nutritivo agar-nutriente (AN) para el crecimiento de bacterias. Los platos de Petri se depositaron en una incubadora a 26°C para favorecer el crecimiento de los distintos microorganismos. Los aislamientos se seleccionaron con base en sus diferencias morfológicas; estas se refieren a la forma del crecimiento de la bacteria en el medio, la cual puede mostrar un crecimiento plano o en forma de pequeños abultamientos, y al color de la cepa. Se purificaron en el medio nutritivo mencionado y se conservaron en viales a los que se les colocó, en forma inclinada, aceite mineral estéril, para evitar la contaminación y degeneración de las características de los microorganismos.

En el campo muestreado las plantas estaban totalmente establecidas con una edad aproximada de 35 días según informe del productor. Aunque el productor hacía aplicaciones periódicas de insecticidas siempre se observaban en el campo adultos de moscas blancas como también plantas infectadas mostrando síntomas externos de la virosis.

Las plantas y el suelo de la parte radicular fueron transportados en una nevera con paquetes refrigerantes para mantener frescas las muestras. Una vez en el laboratorio se aislaron las rizobacterias según los procedimientos recomendados. Del lavado de raíces se obtuvieron un menor número de diferentes colonias en comparación con las obtenidas de las muestras de suelo, aproximadamente 20 y 60 respectivamente. Por la evaluación visual de las características morfológicas que presentaban las bacterias

aisladas de las raíces de las plantas se concluyó que también estaban presentes en el grupo de bacterias aisladas del suelo circundante a las raíces de las mismas plantas.

Las diferentes colonias que permitieron ser diferenciadas claramente por sus características morfológicas se pusieron a crecer en el medio de cultivo Agar nutriente-Agua. Cada una de las cepas se transfirieron a platos de petri varias veces hasta obtener un crecimiento puro de cada una de ellas. Con el fin de ser evaluadas en este estudio se seleccionaron tres cepas, LE-2 de color crema, LE-12 de color rojo y CS-10 de color amarillo.

5.3. Prueba de inducción de resistencia

5.3.1. Vectores.

Colonias no virulíferas de *B. tabaci* se mantuvieron en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) en la casa de mallas a temperatura ambiente (21°C en promedio). Inicialmente se introdujeron moscas blancas portadoras de geminivirus colectadas en el campo y las plantas de tomate en la casa de mallas eran sustituidas constantemente de tal manera de mantener siempre plantas jóvenes.

5.3.2. Manejo de vectores.

Las moscas blancas (*B. tabaci*) se manipularon con aspiradores, que consisten de tubos de goma con dos orificios en un extremo en los que se conectan dos pequeñas mangueras una de las cuales sirve para aspirar, succionando por medio de la boca la mosca blanca que se encuentra en el extremo de la otra manguera.

5.3.3. Tratamiento con ``bocashi``

En este tratamiento el sustrato sobre el cual se sembraron las semillas de tomate fue una mezcla entre suelo esterilizado y el abono orgánico ``bocashi`` como tratamiento en estudio. El ``bocashi`` se mezcló con el suelo en una proporción de 12% v/v. En el tratamiento con ``bocashi`` las semillas no se inocularon con microorganismos.

5.3.4. Plantas utilizadas

Se cultivaron plantas de tomate de la variedad Hayslip en recipientes plásticos de aproximadamente 21 cm de diámetro y 20 cm de profundidad. El sustrato que se utilizó fue suelo, el cual se sometió a un tratamiento con Dazomet para ser desinfectado.

5.3.5. Inoculación de microorganismos

Los microorganismos que se utilizaron en este experimento fueron: *Serratia marcescens*, *Pseudomonas cepacia*, y *Bacillus cereus* pertenecientes a la colección del laboratorio MIP-CATIE. Estos microorganismos, en estudios previos realizados por Okumoto (1992), González *et al.* (1996) y Rodríguez Osorno (1995), han mostrado actividad en el control biológico. También se aislaron bacterias de las muestras de plantas de tomate colectadas en el campo, de las cuales se seleccionaron tres aislamientos (CS-10, LE-2 Y LE-12) para ser utilizados en este estudio, por lo que se utilizaron un total de seis cepas.

Los microorganismos se evaluaron en dos experimentos por separado, en donde se utilizaron los mismos tratamientos pero en cada uno de ellos se empleó un método diferente de inoculación de los microorganismos, con el propósito de observar cuál método ofrece los mejores resultados. Los métodos de inoculación utilizados fueron los siguientes:

Experimento # 1. Inoculación al suelo al momento de la siembra.

Colonias simples fueron depositadas en 8 ml de extracto de levadura y se pusieron a crecer durante la noche a 27°C, agitándose a 150 rpm. Al siguiente día, 200 µl de todas las diluciones se colocaron en platos con agar-nutriente y se incubaron por 48 h a 27°C. La bacteria se removió de los platos con 20 ml de agua destilada estéril; las suspensiones se centrifugaron, y con los pellets obtenidos se volvió a formar una suspensión con 20 ml de agua destilada estéril e inmediatamente se inocularon al suelo (Maurhofer *et al.* 1994). Después se depositaron aproximadamente 5 semillas por macetero, debidamente espaciadas entre si.

Experimento # 2. Inoculación a las semillas al momento de la siembra.

Las bacterias fueron incubadas en caldo de soya (TSB) con agitación de 150 rpm a 28°C por 24 h. Los cultivos fueron centrifugados a 5,000 x g por 10 min, y el sobrenadante se descartó. Los pellets de bacterias se mezclaron con las semillas de tomate, utilizando aproximadamente 10 unidades formadoras de colonias (UFC) por semilla antes de sembrarse (Liu *et al.* 1995).

5.3.6. Aplicación del agente químico

La aplicación se hizo en plantas con una edad entre 16 y 18 días. Una solución acuosa o suspensión del químico (K₂HPO₄) se preparó a un pH de 6.0 a 7.0. se asperjó el envés de las hojas 1 y 2 con 1-2 ml de la solución o suspensión (50 mM). Para evitar la contaminación de otras partes de la planta, se cubrió con una bolsa plástica perforada el resto de la misma. Las plantas creciendo en el invernadero fueron inoculadas con el virus 7 días después de haber sido asperjadas con el químico (Gottstein y Kuc, 1989).

5.3.7. Transmisión del virus

Como fuente de inóculo, se mantuvieron en el invernadero, plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum*) infectadas con el virus del mosaico amarillo del tomate (TYMV) que comúnmente ataca a las plantaciones tomateras en Costa Rica.

Para las pruebas de transmisión, se utilizaron 3 insectos virulíferos por planta. Esta condición fue comprobada por Rivas Platero *et al.* (1996) mediante una prueba de hibridación molecular de los insectos. Los vectores se colocaron sobre la hoja en cilindros plásticos de 2.5 cm de alto y 2.5 cm de diámetro, con el fondo de esponja (descubierto), para permitir la transpiración de la hoja y no causar la muerte del vector y la parte superior cubierta con cedazo; estos cilindros se sujetaron a las hojas de las plantas con prensas metálicas (Rivas Platero 1993).

La transmisión del virus se realizó a los 30 días después de la inoculación de los microorganismos, es decir, a los 24 días después de la germinación (24 ddg). Se permitió un tiempo de 4 h para la alimentación-adquisición del virus, aproximadamente 20 h para el período de latencia y un período de 48 h para la alimentación-inoculación. Después de la transmisión, se esperó un intervalo de 15 días (45 ddg) para la observación visual de los síntomas característicos de la virosis y estimar la severidad (Uzcátegui y Lastra 1978, Rom *et al.* 1993).

Para controlar las moscas blancas que se escaparon al momento de retirar las jaulas utilizadas para la inoculación de virus se hizo, inmediatamente después, una aplicación de insecticida. Los adultos de moscas blancas utilizadas ovopositaron por lo que en el transcurso del experimento fue necesario la aplicación de insecticida para combatir la presencia de moscas blancas.

5.4. Variables de respuesta y análisis estadístico

5.4.1. Altura

A intervalos de 5 días se midió la altura de todas las plantas, desde la base hasta la yema apical, con una cinta métrica graduada en centímetros.

5.4.2. Diámetro

Las lecturas de diámetro se tomaron, al igual que las de altura, a intervalos de 5 días, utilizando para ésto un vernier graduado en milímetros.

5.4.3. Evaluación de la severidad de síntomas

Los síntomas visibles de la virosis se empezaron a evaluar 15 días después de haber hecho la inoculación con el geminivirus, haciéndose evaluaciones a intervalos de 5 días. La severidad fue evaluada mediante la siguiente escala (Rom *et al.*, 1993):

- 1 = leve amarillamiento de los márgenes de los folíolos de la hoja apical;
- 2 = amarillamiento de la punta de los folíolos;
- 3 = amarillamiento de la hoja, disminución del tamaño de la hoja, achaparramiento de la planta, y retorcimiento hacia arriba de las hojas (rizado);
- 4 = amarillamiento de la hoja, sustancial reducción del tamaño de los folíolos, severo rizado de la hoja, y achaparramiento de la planta; y
- 5 = achaparramiento muy severo de la planta, ramas erectas, hojas con folíolos muy pequeños exhibiendo severa clorosis intervenal.

5.4.4. Producción de biomasa

Se registró el peso fresco de todas las plantas al momento de cosecharlas (65 ddg), posteriormente se depositaron en bolsas de papel y se sometieron a una temperatura de 70°C durante 5 días, al final de los cuales, se pesaron para obtener el peso seco.

5.4.5. Detección del geminivirus

A) Toma de muestras foliares

Utilizando tubos Eppendorf de 1.5 ml se tomaron dos discos de aproximadamente 5 mm de diámetro y un peso promedio de 0.026 g (Rivas Platero *et al.* 1995). Las muestras siempre se tomaron de la hoja apical muestreando dos folíolos, tomando un disco por folíolo a los 5, 15, 20, 25, 30 y 35 días después de la inoculación con el virus (ddi). Las muestras se llevaron al laboratorio de biotecnología del CATIE en donde se prepararon las membranas para su posterior hibridación en el laboratorio del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica (UCR).

B) Preparación de las muestras.

A los discos de hojas contenidos en los tubos Eppendorf se les agregó 135 µl de 10x ssc (500 ml 20x ssc/l) como amortiguador de extracción (Abad y Moyer 1992). Se maceraron con pistilos Kontes. Los extractos se centrifugaron a 10,000 rpm durante 1 min. Del sobrenadante se tomaron 3 µl y se colocaron sobre la cuadrícula respectiva de una membrana nylon (PhotoGene^R), humedecida previamente en 10x ssc durante 3 min. Las membranas se secaron a temperatura ambiente sobre papel 3 MM por 15 min. Al secarse se hornearon al vacío a 80°C durante 45 min, para fijar el ADN viral a la membrana. Mientras las membranas eran enviadas al laboratorio del CIBCM de la UCR, se conservaron en cámaras secas con sílica gel.

C) Las condiciones de prehibridación, hibridación y detección del geminivirus se realizaron de acuerdo a la metodología sugerida por Rivas-Platero *et al.* (1995).

5.5. Diseño experimental

Se establecieron 5 repeticiones de 5 plantas cada una para cada tratamiento en un diseño completamente al azar. En cada macetero se depositaron 5 semillas. Después de 10 días de haber germinado se dejó una sola planta por macetero, eliminando el resto.

5.6. Tratamientos

Se evaluaron 10 tratamientos y se incluyó 2 testigos, haciendo un total de 12 tratamientos cuya descripción es la siguiente:

T1 = *Serratia marcescens*

T2 = *Bacillus cereus*

T3 = *Pseudomonas cepacia*

T4 = CS-10

T5 = LE-2

T6 = LE-12

T7 = Agente químico K_2HPO_4

T8 = Agente orgánico "bocashi"

T9 = Agente químico K_2HPO_4 + *Bacillus cereus*

T10 = Agente orgánico "bocashi" + *Bacillus cereus*

T11 = Sin geminivirus y sin rizobacteria (Testigo Absoluto)

T12 = Con geminivirus y sin rizobacteria (Testigo Relativo)

5.7. Modelo estadístico

$$X_{ij} = \mu + t_i + \epsilon_{ij}$$

donde:

X_{ij} = Variable aleatoria observable

μ = Media general

t_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

ϵ_{ij} distribuidos normalmente, con promedio cero,
 varianza δ^2 y no correlacionados
 i = Tratamientos
 j = repeticiones

5.8. Análisis estadístico

Con los datos obtenidos de las variables: altura, diámetro, peso fresco y peso seco de las plantas e índice de severidad se realizaron análisis de varianza y contrastes ortogonales utilizando el paquete estadístico SAS. También se realizaron pruebas de correlación y regresión entre la severidad de síntomas y las demás variables.

Para evaluar la severidad de la enfermedad se utilizó el parámetro área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE)(Rivas Platero, 1996). La fórmula para calcularla es la siguiente:

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

Donde:

y_i = proporción de enfermedad (severidad) afectada en la i ésima observación.

t_i = tiempo (días) después de la inoculación en la i ésima observación.

Σ = sumatoria de n observaciones.

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Aislamiento de rizobacterias

De los aislamientos de bacterias de plantas de tomate colectadas en el campo se seleccionaron tres cepas para ser evaluadas en este estudio, las cuales tenían una coloración diferente: la cepa LE-12, roja; la cepa LE-2, crema y la cepa CS-10, amarilla (cuadro 1). Además se observó que eran estas las cepas que en menor porcentaje aparecían en relación al total de aislamientos.

Cuadro 1. Características morfológicas de las cepas aisladas de plantas colectadas en el campo.

CEPAS	COLOR	CONSISTENCIA	CRECIMIENTO (AN)	BORDE
LE-12	Roja	Cremosa	Abundante	irregular
LE-2	Crema	Cremosa	Moderado	redondeado
CS-10	Amarilla	Cremosa	Moderado	redondeado

Las bacterias de la rizosfera con habilidad de ejercer control biológico aparecen en un porcentaje menor al 10% del total de la población de bacterias en la rizosfera (Suslow y Schroth, 1982). La posibilidad de seleccionar las cepas efectivas es mayor al aislar las bacterias del mismo ambiente el cual van a ser usadas, como en este caso, seleccionando de la rizosfera del tomate porque el patógeno a controlar causa una enfermedad en el dicho cultivo (Schroth y Hancock 1982).

6.2. Condiciones del suelo y temperatura

El suelo utilizado en esta investigación tenía una textura franco-arcillosa, lo que además de proveer una porosidad adecuada, también ofreció una adecuada aireación, movimiento y retención de humedad. El pH ligeramente ácido del suelo utilizado también favorece el crecimiento de rizobacterias, ya que a este pH posiblemente es menor la competencia por la microflora nativa (Bahme y Schroth 1987). Las condiciones de

temperatura en la zona del experimento (Anexo 3) resultaron favorables para el establecimiento y mantenimiento de las rizobacterias. Para el caso, Loper *et al.* (1984) encontraron que la temperatura óptima para el crecimiento de *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida in vitro* es de 25-30°C, pero una mayor colonización de las raíces por estas bacterias se da a temperatura de 20°C .

En inoculación a la semilla los tratamientos con *Bacillus* cepa A30 mostraron un mejor comportamiento que en inoculación al suelo, esto puede deberse a que la misma semilla se constituyó en un adecuado sustrato para las rizobacterias, previo a la germinación de la planta. En banano, *Pseudomonas cepacia* y *P. fluorescens*, trabajaron mejor cuando se aplicaron en los sustratos broza de café y cachaza que cuando se aplicaron sólo en agua (Francisco Gutiérrez 1996, CATIE, com.pers.).

6.3. Manejo de las plantas en los experimentos.

Cuando los microorganismos se inocularon al suelo la germinación fue aproximadamente del 95% y, aparte de los síntomas de virosis mostrados por algunas plantas, el desarrollo del cultivo fue normal (Anexo 2) , Cuando se inoculó a la semilla se presentó un menor porcentaje de germinación (80%), y en los tratamientos con "bocashi" se observó el daño por un insecto que cortaba las plantas al nivel del suelo, por lo que se resembró en un 50%. Esto provocó que las plantas con "bocashi" no mostraran un mejor desarrollo desde el inicio como cuando se inoculó al suelo. Posterior al control de la plaga con el insecticida Oxamilo, en una dosis de 8 cc/l de agua, el crecimiento de las plantas fue en aumento, tanto en altura como en diámetro (Anexo 2).

En consideración a la altura y al diámetro de tallo alcanzado por las plantas, se concluye que las condiciones ambientales no fueron desfavorables (Figura 1). Durante los

experimentos las condiciones de temperatura, humedad relativa y radiación solar global variaron entre: 20.9 y 23.8°C, 78.5 y 98.0%, y 4.48 y 27.14 Mj/cm², respectivamente (Anexo 3) (Francisco Jiménez 1996, CATIE, com.pers.). Dentro del invernadero se registraron variaciones en las condiciones de clima con respecto a las del medio exterior (Anexo 6), las cuales no afectaron el desarrollo de las plantas.

Se trató de mantener la humedad uniforme y constante en los maceteros mediante la aplicación de riego según fuera necesario. Para poder lograr lo anterior en los tratamientos con "bocashi" se hizo necesario regar con más frecuencia en comparación a los demás. Uno de los atributos del abono orgánico es mejorar la retención de humedad en el suelo (Bun, 1993), pero en este caso en los tratamientos con abono orgánico se observó mayor pérdida de humedad debido, posiblemente, a algunos de sus componentes como el carbón y la cáscara de arroz o a la proporción utilizada en la mezcla suelo-"bocashi" y, sumado a esto, la mayor absorción de humedad por plantas que, en este sustrato, mostraron un crecimiento vigoroso.

Aunque se hizo aplicación preventiva con mancozeb, se presentó ataque del hongo *Cladosporium sp.* en las hojas bajas pero se controló a tiempo con una mezcla de mancozeb y benomil por lo que no llegó a afectar el desarrollo normal del cultivo.

6.4. Promoción del crecimiento

A) Altura y diámetro

En inoculación al suelo, al hacer comparaciones entre el testigo absoluto (TA) vs el resto de tratamientos, testigo relativo (TR) vs los tratamientos inoculados (de T1 a T10) y orgánicos (T8 y T10) vs no orgánicos (Anexo 8), se presentaron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) para la variable altura de planta y diámetro de tallo. Para esta misma variable se detectaron diferencias altamente significativas (P

diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) para la variable altura de planta y diámetro de tallo. Para esta misma variable se detectaron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.01$) al hacer comparaciones entre los microorganismos del laboratorio (T1, T2 y T3).

Los tratamientos que desde el inicio mostraron una mayor altura fueron: "bocashi" y "bocashi" + *Bacillus* (Fig. 1) y los tratamientos con *B. cereus*, *P. cepacia* y el testigo absoluto mostraron la menor. Los mismos tratamientos presentaron el mayor diámetro de tallo y *B. cereus* el menor. El testigo absoluto, aunque no mostró una altura igual al testigo relativo, se observó en las plantas un crecimiento uniforme en las diferentes repeticiones y un diámetro ligeramente mayor, que los demás tratamientos, después de "bocashi" + *B. cereus* y "bocashi" (Anexo 2). El hecho de que el testigo relativo haya alcanzado un buen crecimiento puede ser atribuido a que la fertilización al suelo y al follaje, ~~permitió fortalecer las plantas~~ (Kaplan et al., 1985).

En inoculación a la semilla al hacer comparaciones entre grupos de ellos la mayoría resultaron altamente significativas ($P \leq 0.01$) a excepción del testigo relativo vs tratados, que también mostraron diferencias, pero con una significancia estadística menor ($P \leq 0.05$) (Anexo 9).

En este experimento los tratamientos que al inicio mostraron una mayor altura fueron: *B. cereus*, K_2HPO_4 y el testigo absoluto (Fig. 2), pero al final del experimento fueron el testigo absoluto y K_2HPO_4 los que reportaron mayor altura, superando a *B. cereus*, y en los tratamientos CS-10, *S. marcescens* y LE-2 se observó la menor altura. En cuanto a diámetro de tallo, los tratamientos K_2HPO_4 + *B. cereus*, "bocashi" + *B. cereus*, *B. cereus*, "bocashi" y el testigo absoluto reportaron el mayor diámetro y *P. cepacia* y CS-10 el menor al final del experimento. En este caso el testigo

y un diámetro ligeramente mayor, que los demás tratamientos, después de K_2HPO_4 + *B. cereus*, "bocashi" + *B. cereus*, *B. cereus* y "bocashi" (Anexo 2).

Así también cuando se inoculó a la semilla las plantas asperjadas con K_2HPO_4 (T7) mostraron un incremento significativo en el crecimiento (Anexo 2). Esto quizá se debió a que la aspersión del fosfato en una hoja de la planta, activó mecanismos de defensa y además las plantas alcanzaron un desarrollo significativo. Se deduce que el fosfato indujo una respuesta sistémica ya que se aplicó en una sola hoja y el efecto benéfico se observó en toda la planta.

Reuveni *et al.* (1992) también encontraron que las sales de fosfato inducen resistencia contra *Puccinia sorghi* y *Exserohilum turcicum* en el cultivo de maíz, además de que se incrementa el crecimiento de las plantas. En otro trabajo Reuveni *et al.* (1992), encontraron que además del papel que juegan como agentes inductores de resistencia contra el mildio polvoriento, una sola aplicación de K_2HPO_4 sobre la hoja 1 de plantas de pepino dos o cuatro días antes de la inoculación con el patógeno incrementó el crecimiento de la planta a pesar de la infección. Ellos encontraron que las plantas inducidas e inoculadas reportaron un peso fresco 36% mayor que las plantas control.

Las plantas cuyas semillas fueron inoculadas con A30 alcanzaron, desde el inicio del experimento, mayor altura y diámetro (Anexo 2). Esto pudo deberse a que estas rizobacterias tienen la capacidad de promover el crecimiento en las plantas de tomate. Kloepper *et al.* (1980) utilizaron cepas de rizobacterias inoculadas a semillas de cultivos y encontraron que promovían el crecimiento e incrementaron la producción.

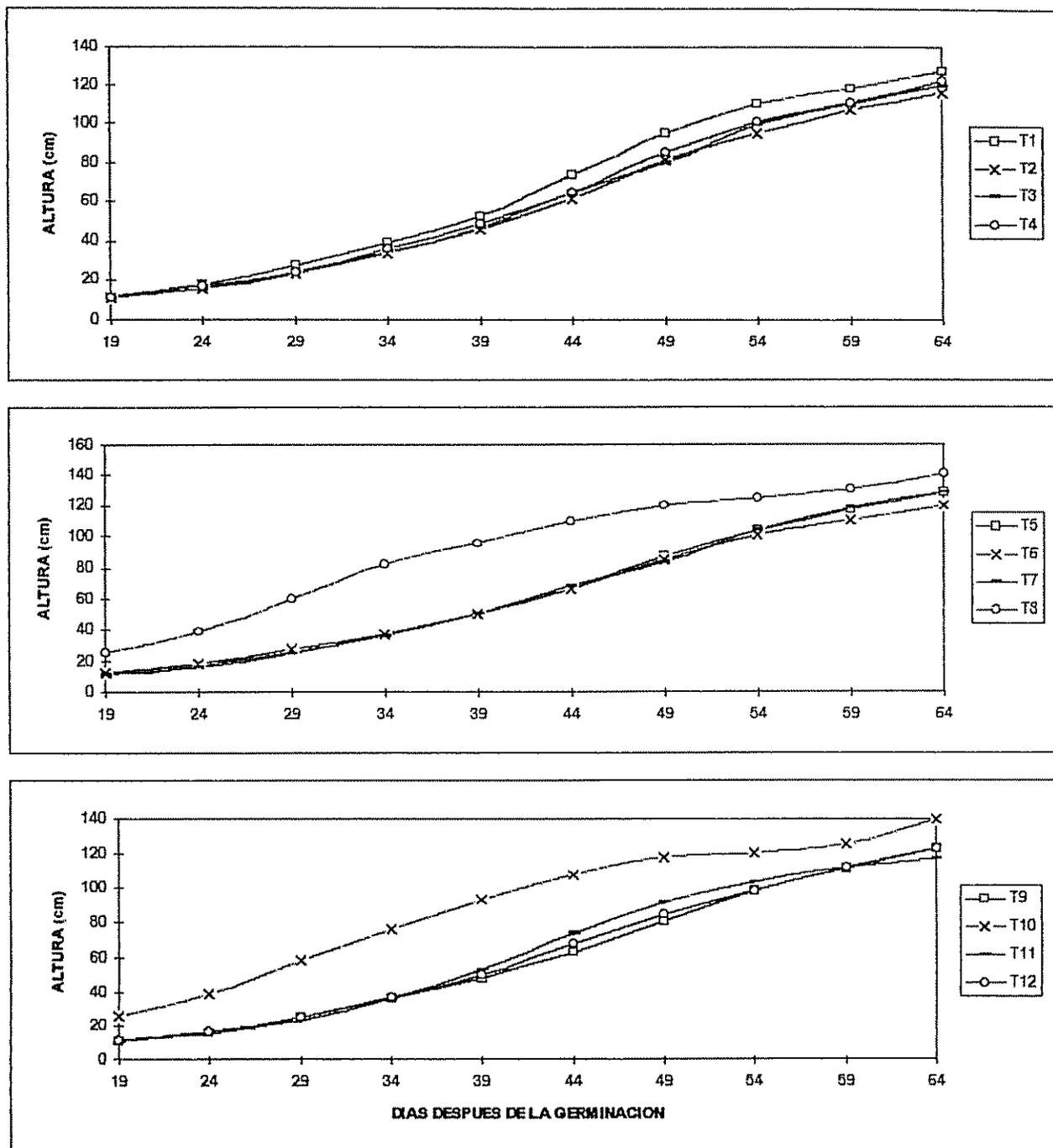


Fig. 1. Promedios de altura según los tratamientos en inoculación al suelo. T1= *S. marcescens*, T2= *B. cereus*, T3= *P. cepacia*, T4= CS-10, T5= LE-2, T6=LE-12, T7= K_2HPO_4 , T8= "bocashi", T9= K_2HPO_4 + *B. cereus*, T10= "bocashi" + *B. cereus*, T11= testigo absoluto, T12= testigo relativo.

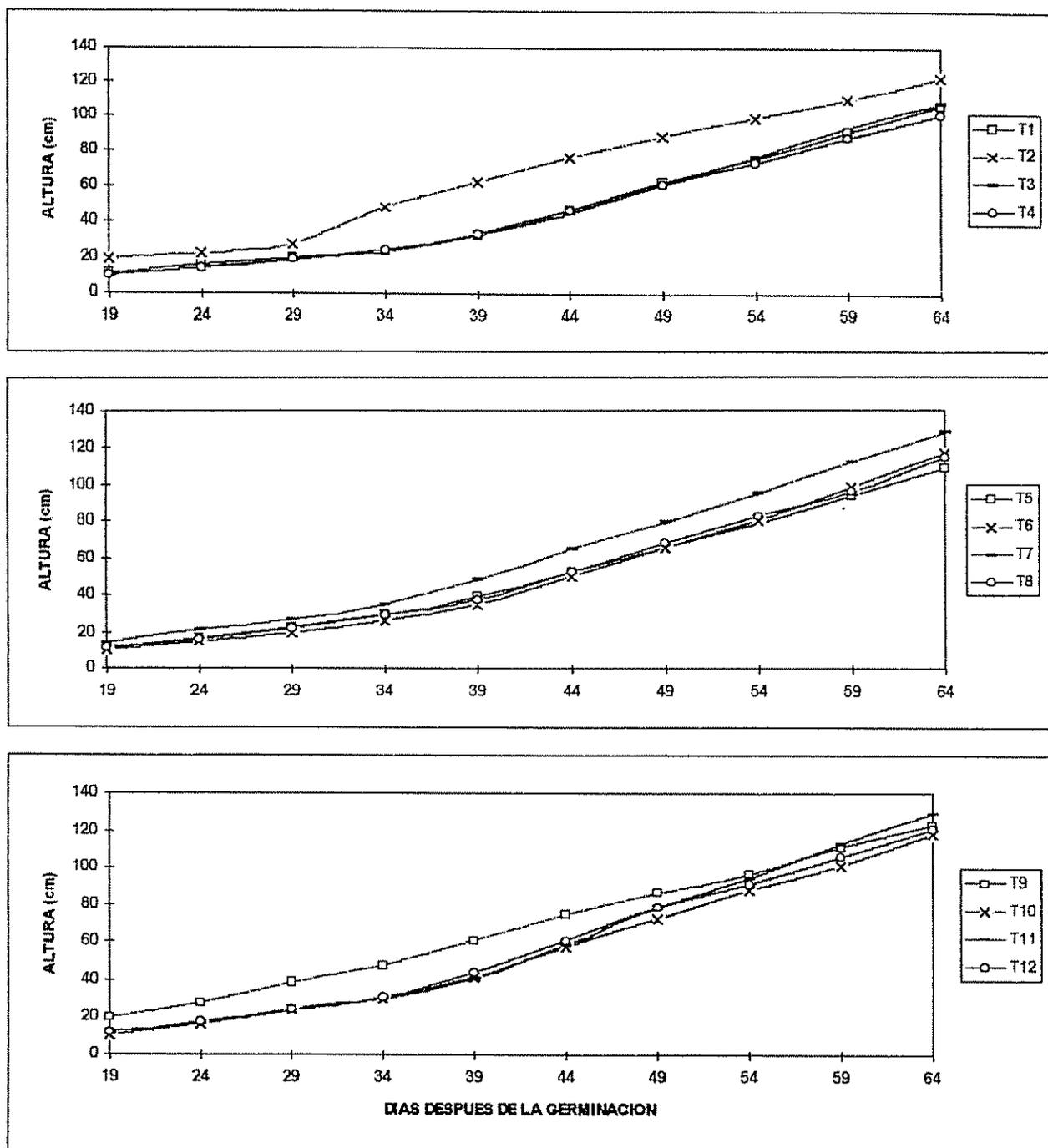


Fig. 2. Promedios de altura según los tratamientos en inoculación a la semilla. T1= *S. marcescens*, T2= *B. cereus*, T3= *P. cepacia*, T4= CS-10, T5= LE-2, T6=LE-12, T7= K_2HPO_4 , T8= "bocashi", T9= K_2HPO_4 + *B. cereus*, T10= "bocashi" + *B. cereus*, T11= testigo absoluto, T12= testigo relativo.

6.5. Detección del geminivirus

Mediante el método de hibridación del ácido nucleico se detectó el geminivirus en todos los tratamientos, aunque las señales en la película de diagnóstico fueron bajas. La aparición de una mancha en la película de diagnóstico es una señal positiva que indica la presencia de geminivirus (Rivas Platero 1996).

6.6. Inducción de resistencia evaluada según la severidad de síntomas

Para la variable severidad de síntomas, en ambos experimentos se encontraron diferencias altamente significativas al comparar el testigo absoluto con el resto de tratamientos y los tratamientos orgánicos (T8 y T10) con el resto (Anexo 8 y 9).

En inoculación al suelo el progreso de la enfermedad, expresado como área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE), mostró diferencias estadísticas significativas ($P \leq 0.05$) entre los tratamientos. Los tratamientos con ABCPE mayores fueron: $K_2HPO_4 + B. cereus$, $B. cereus$ y CS-10, y con menor el testigo absoluto y $S. marcescens$ (Cuadro 2). El testigo absoluto mostró síntomas leves de severidad (Anexo 2), lo que no se esperaba ya que dichas plantas no fueron inoculadas con virus, pero debido a que al momento de retirar las jaulas, utilizadas en la inoculación de los otros tratamientos, se escaparon algunos adultos de mosca blanca que provocaron la infección en el testigo.

Los tratamientos K_2HPO_4 , "bocashi" y "bocashi" + $B. cereus$ mostraron un menor índice de severidad en relación a los demás tratamientos (Fig. 4). Esto puede ser atribuido a la acción inductora de resistencia en las plantas por parte del fosfato (K_2HPO_4), el "bocashi" y a la combinación de este último con $B. cereus$, cepa A30. Se deduce que la protección

generada fue sistémica, ya que habiendo sido aplicados localmente la protección se dio en toda la planta.

A los 15 ddi la severidad fue leve. A los 20 ddi la severidad se incrementó y, en general, se estabilizó en todos los tratamientos hasta los 30 ddi, incrementándose al final (Fig. 4).

También en inoculación a la semilla, el ABCPE mostró diferencias altamente significativas. Los tratamientos con mayor ABCPE fueron el CS-10 y *S. marcescens* (Cuadro 2).

Cuadro 2. Prueba de Duncan para las medias de ABCPE, según los tratamientos en cada experimento.

TRATAMIENTOS	EXPERIMENTO 1	EXPERIMENTO 2
	MEDIAS	MEDIAS
<i>S. marcescens</i>	13.125 bc	35.625 ab
<i>B. cereus</i>	30.938 ab	27.500 ab
<i>P. cepacia</i>	25.000 ab	29.063 ab
CS-10	30.625 ab	39.938 a
LE-2	25.000 ab	27.813 ab
LE-12	28.438 ab	28.125 ab
K ₂ HPO ₄	20.313 abc	31.250 ab
``bocashi``	20.625 abc	22.813 b
K ₂ HPO ₄ + <i>B. cereus</i>	33.125 a	33.125 ab
``bocashi``+ <i>B. cereus</i>	18.750 abc	24.063 ab
Testigo absoluto	4.375 c	00.000 c
Testigo relativo	25.313 ab	29.063 ab

- Medias con letras iguales no son significativamente diferentes.

- Experimento 1= inoculación al suelo

- Experimento 2= inoculación a la semilla

La severidad mostrada a los 15 ddi, al igual que cuando se inoculó al suelo, fue baja (Fig. 3 y 4), a los 20 ddi se incrementó estabilizándose un poco hasta los 30 ddi y se registró un incremento a los 35 ddi (63 ddg). En este caso en el testigo absoluto no se observaron síntomas (Fig. 4).

En ambos experimentos y en algunos tratamientos, aproximadamente a los trece días después de la inoculación con el virus, ya se empezaban a observar los primeros síntomas de la virosis. Esto pudo deberse a que las plantas se

desarrollaron normalmente lo que les permitió una óptima actividad metabólica y a que los geminivirus se traslocan sistémicamente y en forma rápida (Rivas-Platero, *et al.*, 1995).

El tratamiento sólo con K_2HPO_4 (T7) mostró un menor índice de severidad y el tratamiento con K_2HPO_4 más "bocashi" (T9) reportó una mayor severidad (Figura 4), a pesar de lo cual las plantas mostraron un buen crecimiento (Anexo 2). El hecho de que existieran tratamientos cuyas plantas, aun habiendo alcanzado un aceptable desarrollo, mostraran una mayor severidad en comparación a los otros tratamientos, se debió a que el evaluador midió el grado de severidad considerando sólo el rizado de las hojas, obviando la altura de la planta, ya que en esos casos no se presentó achaparramiento.

La aspersión del químico se realizó sobre una sola hoja, pero asumiendo que el efecto es sistémico, esto generó un mejor comportamiento de toda la planta. Resultados obtenidos por Reuveni *et al.* (1993) demostraron claramente que compuestos simples tales como sales de fosfato inducen protección sistémica contra el mildio polvoriento del pepino. Al igual que en este trabajo, ellos hicieron aplicaciones de K_2HPO_4 y encontraron que se promovió altos niveles de protección sistémica. Aunque los mecanismos por los cuales estos químicos actúan para disminuir el desarrollo de las enfermedades todavía son desconocidos, resultados de investigaciones sugieren que los químicos disparan rápidamente las defensas generales de las plantas, respondiendo a la inducción con una rápida traslocación de los "signos de inmunidad" de la hoja asperjada a las demás partes de la planta (Reuveni *et al.* 1993).

Sin embargo, no siempre el uso de fosfatos ha resultado en inducción de resistencia, Descalzo *et al.* (1990), reportan que la aplicación de K_2HPO_4 no fue efectiva en inducir resistencia sistémica contra el mildio polvoriento en plantas de pepino.

La cepa A30 de *Bacillus cereus* (T2) al ser inoculada a la semilla mostró un comportamiento muy diferente al mostrado cuando se inoculó al suelo. La cepa A30 además de inducir cierto grado de protección sistémica contra la virosis en las plantas de tomate, también promovieron el crecimiento de éstas expresado en una mayor altura, diámetro y en una mayor producción de biomasa. El mejor resultado de esta cepa cuando fue inoculada a la semilla quizá se debió a que hubo una mejor colonización a diferencia de cuando fue aplicada al suelo. Similares resultados encontraron Maurhofer *et al.* (1995), cuando la colonización de las raíces de tabaco por la cepa CHAO de *Pseudomonas fluorescens* provocó la reducción de la necrosis de las hojas provocada por el virus de la necrosis del tabaco.

Debido a que la inoculación de la cepa A30 se realizó a las semillas de tomate y los efectos benéficos se observaron en toda la planta hace pensar que la protección de hojas y tallos contra el daño provocado por la virosis es debido a la inducción sistémica de resistencia. Van peer *et al.* (1991), encontraron que se podría proteger al clavel contra la marchitez provocada por *Fusarium* mediante la inoculación de las raíces con la cepa WCS417r de *Pseudomonas fluorescens*. En el anterior trabajo los autores no han encontrado en las hojas ni en los tallos de las plantas las cepas de PGPR las cuales fueron aplicadas a las semillas o a las raíces, por lo que se deduce que la protección generada en toda la planta es debida a inducción sistémica.

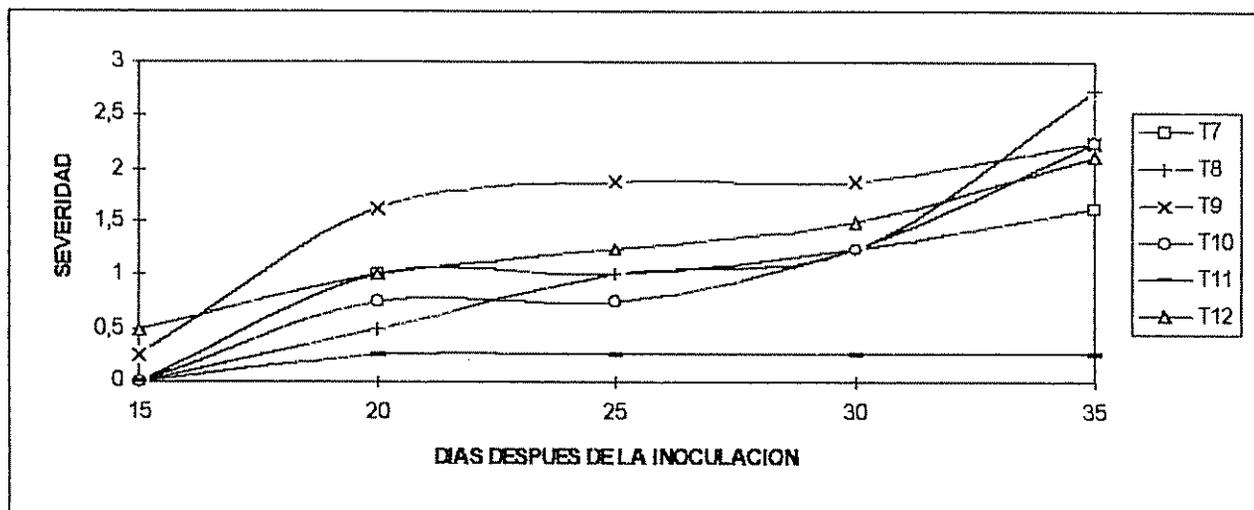
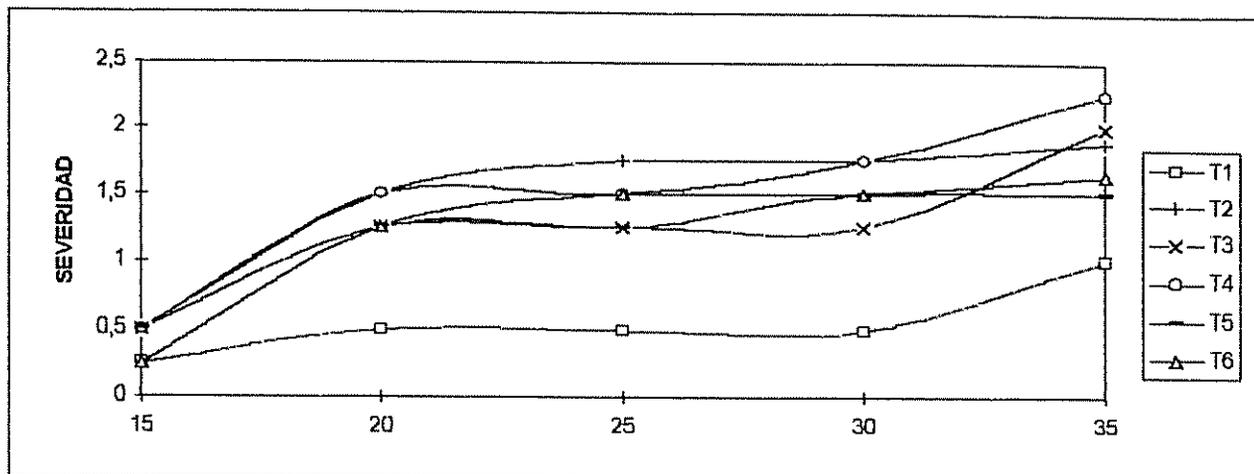


Fig. 3. Promedios de índices de severidad según los tratamientos en inoculación al suelo. T1= *S. marcescens*, T2= *B. cereus*, T3= *P. cepacia*, T4= CS-10, T5= LE-2, T6=LE-12, T7= K_2HPO_4 , T8= "bocashi", T9= K_2HPO_4 + *B. cereus*, T10= "bocashi" + *B. cereus*, T11= testigo absoluto, T12= testigo relativo.

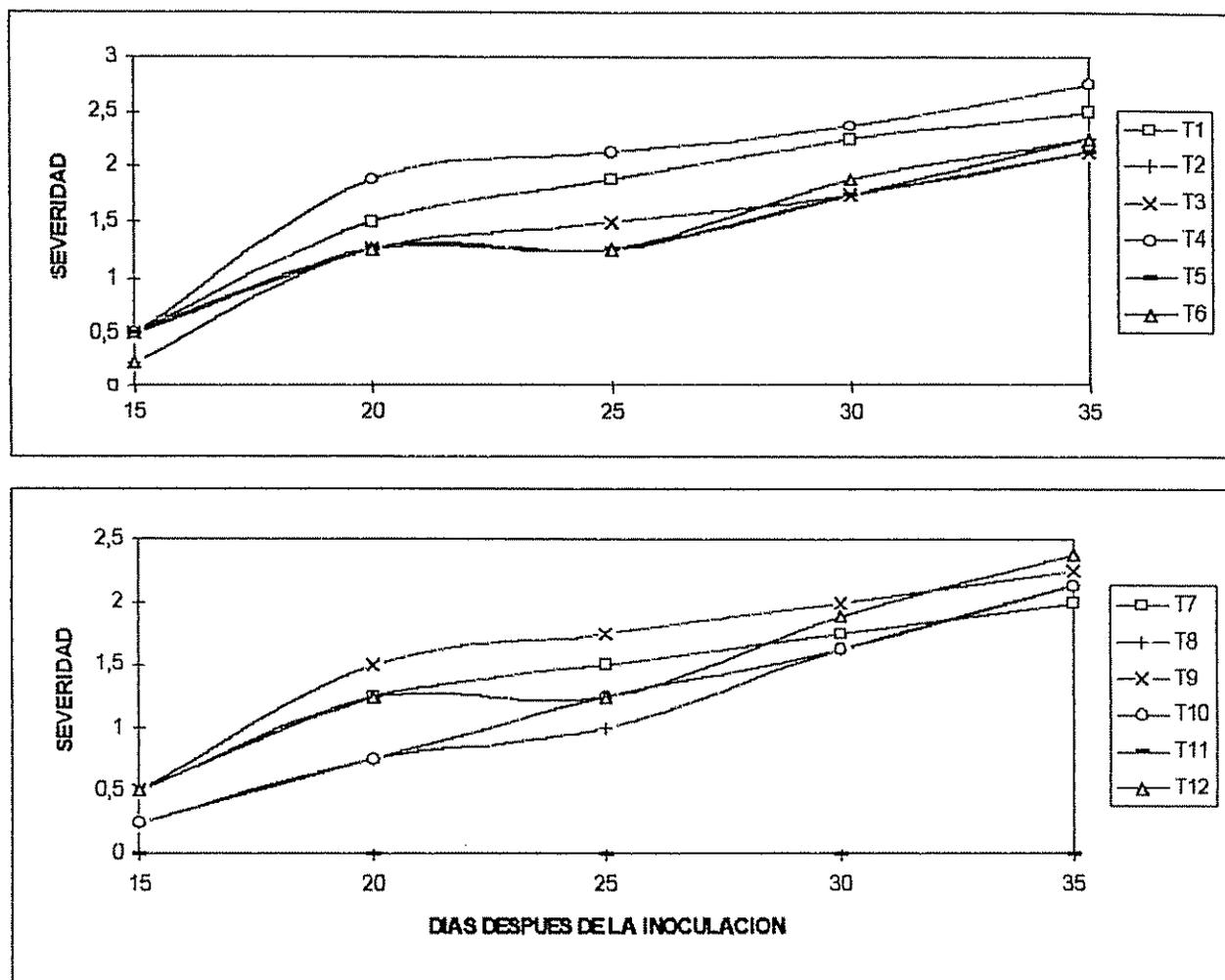


Fig. 4. Promedios de índices de severidad según los tratamientos en inoculación a la semilla. T1= *S. marcescens*, T2= *B. cereus*, T3= *P. cepacia*, T4= CS-10, T5= LE-2, T6= LE-12, T7= K_2HPO_4 , T8= "bocashi", T9= K_2HPO_4 + *B. cereus*, T10= "bocashi" + *B. cereus*, T11= testigo absoluto, T12= testigo relativo.

6.7. Producción de biomasa

Para producción de biomasa se dieron diferencias entre los dos métodos de inoculación ($P < 0.01$), así como también entre los tratamientos y para la interacción entre éstos y el método de inoculación (Anexo 10). Al hacer comparaciones, en inoculación al suelo los contrastes que mostraron significancia estadística fueron: testigo absoluto vs el resto de tratamientos, testigo relativo vs tratamientos con inoculación y tratamientos orgánicos vs no orgánicos (Anexo 11) y en inoculación a la semilla fueron: testigo absoluto vs el resto de tratamientos, orgánicos vs no orgánicos (pero con menor significancia que en el experimento anterior), químicos vs no químicos, microorganismos de la colección del laboratorio vs microorganismos recolectados en el campo y *Bacillus cereus* vs *Pseudomonas cepacia* y *Serratia marcescens* (Anexo 12). En inoculación al suelo los tratamientos que mostraron mayor producción de biomasa, tanto en peso fresco como en peso seco, fueron los tratamientos con "bocashi" y "bocashi" + *B. cereus* seguidos del testigo absoluto (Fig. 5). Dentro de todas las diferencias mostradas entre tratamientos en inoculación a la semilla, los tratamientos que exhibieron los mayores promedios de producción de biomasa fueron: *Bacillus cereus*, "bocashi", K_2HPO_4 + *B. cereus* y el testigo absoluto (Fig. 6).

En este trabajo, en inoculación al suelo el tratamiento con "bocashi" y "bocashi" + *B. cereus* mostraron una producción de biomasa significativamente mayor que los demás tratamientos (Anexo 1). En inoculación a la semilla, los tratamientos con "bocashi", K_2HPO_4 , *B. cereus* cepa A30 y las mezclas de ellos fueron los que mostraron una producción de biomasa, tanto en peso fresco como en peso seco, significativamente mayor (Fig. 6). Esto puede ser atribuido a un incremento de la tasa fotosintética debido precisamente a la autoprotección de la planta estimulada por la acción de los agentes inductores y evitando, con esto, un mayor daño al follaje. Salt *et al.*

(1988), observaron que los carbohidratos solubles incluyendo glucosa, fructuosa y sucrosa incrementaron la protección contra el moho azul en hojas y tallos de tabaco y que, por lo tanto, la fotosíntesis neta de las plantas protegidas puede ser incrementada. Así también Murray y Walters (1992), observaron incremento en la fotosíntesis y en la retención de asimilados en las hojas superiores de plantas de frijol en las cuales las inferiores habían sido infectadas con el hongo *Uromyces vicia-faba*.

En general las plantas en el invernadero mostraron un buen desarrollo (Anexos 1 y 2), esto posiblemente se deba a condiciones favorables de temperatura, humedad relativa, mantenimiento de una adecuada humedad en el suelo y al manejo del cultivo con fertilización al suelo y al follaje, y al control de plagas y enfermedades, cuya presencia fue baja. En el caso de las plantas C3, como es el caso del tomate, se ha encontrado que el máximo de fijación de CO₂, es decir la máxima tasa fotosintética, ocurre entre 20°C y 30°C (Bjorkman, 1975).

El hecho de que los niveles de severidad mostrados por las plantas de tomate en el invernadero no hayan sido altos (Anexo 4) permitieron que las plantas alcanzaran un alto nivel de producción de biomasa, principalmente "bocashi" y "bocashi" + *B. cereus* en inoculación al suelo y *B. cereus* en inoculación a la semilla (Anexo 1), lo cual pudo deberse a la activación de mecanismos de defensa de la planta permitiéndole protección contra la virosis. Respuestas similares en cuanto a producción de biomasa encontraron Tuzun *et al.* (1986) a través de la inmunización de plantas de tabaco contra la enfermedad del moho azul por la inoculación dentro de los tejidos del tallo de suspensiones de esporangios de *Peronospora tabacina* lo que permitió incrementar la producción de biomasa (peso fresco y peso seco) del tabaco.

El incremento significativo del crecimiento de las plantas de los tratamientos con "bocashi" y de la combinación de éste con *B. cereus*, cepa A30 se debió, probablemente, a que la adición del abono orgánico al suelo mejora la actividad de la población de microorganismos que actúan como agentes de biocontrol. Estos agentes pueden ser rizobacterias y hongos que pueden inducir protección sistémica contra enfermedades foliares en las plantas (Hoitink *et al.*, 1996).

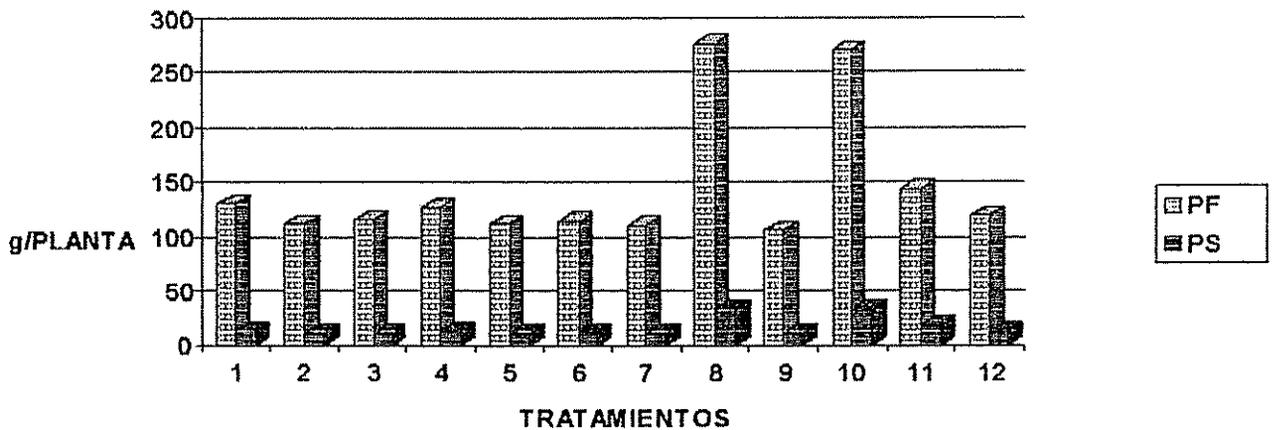


Fig. 5. Promedios de peso fresco y peso seco (g) según los tratamientos en inoculación al suelo. T1= *S. marcescens*, T2= *B. cereus*, T3= *P. cepacia*, T4= CS-10, T5= LE-2, T6=LE-12, T7= K_2HPO_4 , T8= "bocashi", T9= K_2HPO_4 + *B. cereus*, T10= "bocashi" + *B. cereus*, T11= testigo absoluto, T12= testigo relativo.

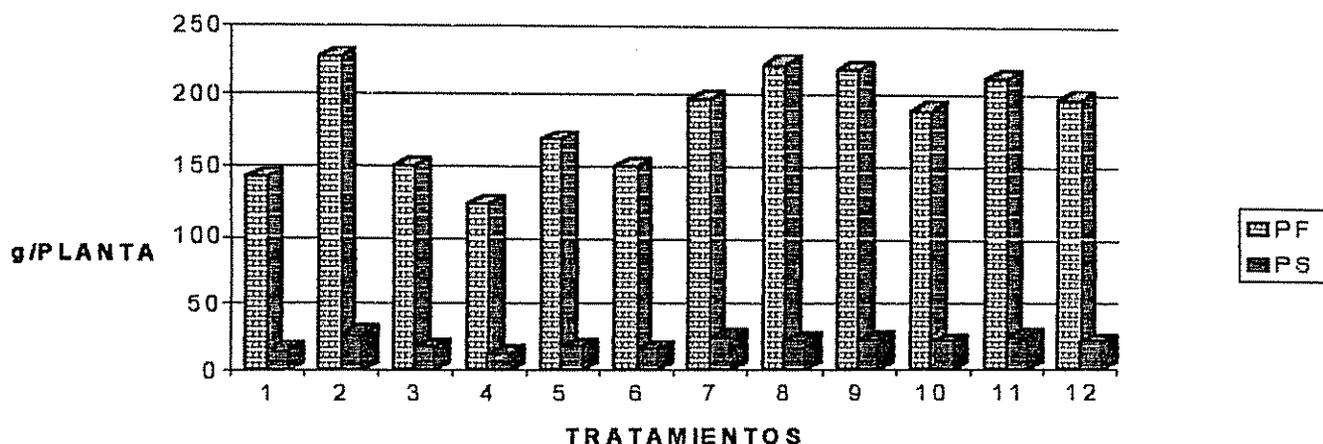


Fig. 6. Promedios de peso fresco y peso seco (g) según los tratamientos en inoculación a la semilla. T1= *S. marcescens*, T2= *B. cereus*, T3= *P. cepacia*, T4= CS-10, T5= LE-2, T6=LE-12, T7= K_2HPO_4 , T8= "bocashi", T9= K_2HPO_4 + *B. cereus*, T10= "bocashi" + *B. cereus*, T11= testigo absoluto, T12= testigo relativo.

Cuadro 3. Correlaciones entre índices de severidad con altura, diámetro y producción de biomasa en inoculación al suelo.

TRATS.	ALTURA		DIAMETRO		PESO FRESCO		PESO SECO	
	Coef. Correl.	P > R						
T1	-0.3753	0.6247	-0.5657	0.4343	-0.9100	0.0900	0.3801	0.61
T2	-0.1579	0.8421	-0.3957	0.6043	-0.8532	0.1468	-0.7977	0.20
T3	-0.6445	0.3555	-0.5556	0.4444	0.0530	0.9470	0.1458	0.85
T4	-0.4636	0.5364	0.5774	0.4226	-0.2824	0.7176	-0.5782	0.42
T5	-0.8987	0.1014	0.8111	0.1889	-0.1836	0.8164	0.4831	0.51
T6	-0.6185	0.3815	-1.0000	0.0	-0.9982	0.0018	-0.8049	0.40
T7	0.3925	0.7432	-0.7998	0.4099	-0.1944	0.8056	-0.3443	0.77
T8	0.0940	0.9060	-0.3015	0.6985	-0.0776	0.9224	-0.3875	0.61
T9	0.1048	0.8952	0.4777	0.5223	0.9260	0.0740	0.8278	0.17
T10	-0.9104	0.0896	0.1783	0.8217	-0.9610	0.0390	-0.8663	0.13
T11	-0.9836	0.0164	0.0	1.0	0.9396	0.0674	0.4580	0.54
T12	-0.5635	0.4365	0.1601	0.8399	-0.1070	0.8930	0.1562	0.84

T1= *S. marcescens*, T2= *B. cereus*, T3= *P. cepacia*, T4= CS-10, T5= LE-2, T6=LE-12, T7= K_2HPO_4 , T8= "bocashi", T9= K_2HPO_4 + *B. cereus*, T10= "bocashi" + *B. cereus*, T11= testigo absoluto, T12= testigo relativo.

Cuadro 4. Correlaciones entre índices de severidad con altura, diámetro y producción de biomasa en inoculación a la semilla.

TRATS.	ALTURA			DIAMETRO			PESO FRESCO			PESO SECO		
	Coef. Correl.	P > R		Coef. Correl.	P > R		Coef. Correl.	P > R		Coef. Correl.	P > R	
T1	-0.1474	0.8526		-0.6554	0.3446		0.9100	0.0900		-0.6350	0.36	
T2	0.0859	0.9141		0.2077	0.7923		-0.2142	0.7858		0.0859	0.91	
T3	0.7618	0.2382		0.9515	0.0485		0.7904	0.2096		0.5517	0.44	
T4	-0.5735	0.4265		0.3015	0.6985		-0.7619	0.2381		0.1038	0.89	
T5	0.8561	0.1439		-0.3333	0.6667		0.6533	0.3467		-0.1731	0.82	
T6	-0.6281	0.3719		0.9300	0.0700		0.2166	0.7834		0.8313	0.37	
T7	-0.7690	0.4416		-0.9623	0.0377		0.0856	0.9144		-0.9053	0.27	
T8	-0.4436	0.5564		-0.4472	0.5528		0.2968	0.7032		-0.9439	0.05	
T9	0.9027	0.0973		0.7620	0.2380		-0.2332	0.7668		0.8853	0.11	
T10	-0.9122	0.0878		-0.4851	0.5149		0.7700	0.2300		-0.6748	0.32	
T11	0.8916	0.1084		0.7494	0.2506			0.7073	0.29	
T12	-0.6917	0.3083		1.0	0.0		0.2708	0.7292		-0.6312	0.36	

T1= *S. marcescens*, T2= *B. cereus*, T3= *P. cepacia*, T4= CS-10, T5= LE-2, T6=LE-12, T7= K₂HPO₄, T8= "bocashi", T9= K₂HPO₄ + *B. cereus*, T10= "bocashi" + *B. cereus*, T11= testigo absoluto, T12= testigo relativo.

6.8. Correlación entre índice de severidad de síntomas con altura, diámetro y producción de biomasa.

Al relacionar la variables altura, diámetro, peso fresco y peso seco con la severidad de síntomas, en la mayoría de los tratamientos en ambos experimentos se dio una correlación negativa, es decir, que a mayor severidad menor altura, diámetro y menor producción de biomasa. Sin embargo, hubo casos en que la correlación fue positiva, aunque generalmente con coeficientes de correlación bajos (Cuadros 3 y 4). Esto posiblemente se debió a que al momento de evaluar se consideraron índices de severidad altos aun cuando las plantas habían alcanzado un desarrollo significativo, tanto en diámetro, altura y, consecuentemente, alta producción de biomasa.

En los análisis de regresión sólo se encontró significancia estadística al relacionar la severidad con la altura cuando se inoculó a la semilla ($P \leq 0.05$). Los valores estimados para a y b fueron 1.476 y -0.082, respectivamente, y la ecuación de regresión fue:

$$\text{Altura} = 1.476 - 0.082(\text{severidad})$$

Esto quiere decir, que por cada unidad de incremento en la severidad la altura se redujo 0.082 veces.

VII. CONCLUSIONES

- La adición de "bocashi" al suelo mejoró el crecimiento de las plantas de tomate y redujo la severidad del mosaico amarillo.

- La inoculación de la cepa A30 de *Bacillus cereus* a las semillas del tomate promovió el crecimiento de las plantas y redujo la severidad de la virosis provocada por geminivirus, en cambio, cuando fue inoculada al suelo no mostró el mismo efecto.

- La inoculación al suelo de la cepa R1 de *Serratia marcescens* disminuyó la severidad de la enfermedad en las plantas de tomate.

- La aspersion de una hoja de la planta de tomate con K_2HPO_4 promovió el crecimiento y disminuyó la severidad de la virosis.

VIII. RECOMENDACIONES

- Realizar aislamientos de microorganismos de suelos supresivos de enfermedades y de la misma especie de planta en que serán usados , para tener una mayor probabilidad de encontrar microorganismos eficientes en el control biológico.

- Mejorar la técnica de inoculación del virus de tal manera de no infectar las plantas testigo.

- Ajustar la escala tradicional de evaluación de síntomas de acuerdo a lo mostrado por las plantas en el invernadero y practicar su empleo por parte del evaluador.

- Seleccionar en la investigación el método de diagnóstico de geminivirus y de análisis foliar que se ajuste al objetivo del estudio para obtener conclusiones más precisas.

IX. BIBLIOGRAFIA

- AGRIOS, G.N. 1989. Fitopatología. Editorial LIMUSA. México DF. México. p. 597-628.
- ALVAREZ, P.; ALFONSECA, L.; ABUD, A.; VILLAR, A.; ROWLAND, R.; MARCANO, E.; BORBON, J.C.; GARRIDO, L. 1993. Las moscas blancas en la República Dominicana. *In: Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe*. CATIE. Serie Técnica. Informe Técnico No 205. p. 34-37.
- ANDERSON, A.J.; D. GUERRA. 1985. Responses of bean to root colonization with *Pseudomonas putida* in a hydroponic system. *Phytopathology*. 75:992.
- BAHME, J.B.; M.N. SCHROTH. 1987. Spatial-temporal colonization patterns of a rhizobacterium on underground organs of potatoes. *Phytopathology*. 77:1093-1100.
- BASRA, A.S. 1994. Mechanisms of plant growth and improved productivity. Modern approaches. Punjab Agricultural University, Ludhiana, India. p 391-433.
- BJORKMAN, O. 1975. Environmental and biological control of photosynthesis. *In: Marrele, R. (ed.). Environmental and biological control of photosynthesis*. p. 1-16.
- BOCK, K.R. 1982. Geminivirus diseases in tropical crops. *Plant Disease*. 66(3): 266-270.
- BINK-MOENEN, R.M.y L.A. MOUND. 1990. Whiteflies: Diversity, biosystematics and evolutionary patterns. *In: Whiteflies: Their bionomics, pest status and management*. D. Gerling (ed.). Athenaeum press, New Castle, UK. P. 1-12.

- BOVEY, R. 1971. La defensa de las plantas cultivadas. Tratado Práctico de fitopatología y Zoología Agrícola. Estación Federal de Investigaciones Agronómicas. Trad. A.P. Iglesias. Ediciones OMEGA, S.A. Barcelona. p. 106.
- BYRNE, D.N. y T.S. BELLOWS Jr. 1991. Whitefly biology. Annu. Rev. Entomol. 36: 431-457.
- BROWN, J.K. 1993. Evaluación crítica sobre los biotipos de mosca blanca en América, de 1989 a 1992. *In*: Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe. L. Hilje y O. Arboleda (eds.). Serie Técnica. Informe Técnico No. 205. CATIE. p. 1-9.
- BELLOWS, T.S. Jr., T.M. PERRING, R.J. GILL y D.H. HEADRICK. 1994. Description of a species of *Bemisia* (Homoptera: Aleyrodidae). Ann. Entomol. Soc. Amer. 87: 195-206.
- BROADBENT, P.; K.F. BAKER; N. FRANKS; J. HOLLAND. 1977. Effect of *Bacillus* spp. On increased growth of seedings in steamed and in nontreated soil. Phytopathology. 67: 1027-1034.
- BUN. 1993. Manual de procedimientos para la elaboración de compost. Biomass Users Network. Oficina Regional para Centro América y el Caribe. Apdo. Postal 1800-2100, Guadalupe, Costa Rica. 16 p.
- BYRNE, D.N. y M.A. HOUCK. 1989. Morphometric identification of wing polymorphism in *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae). Ann. Entomol. Soc. Amer. 83: 487-493.
- CATIE. 1990. Guía para el Manejo Integrado de Plagas del cultivo de tomate. CATIE, Proyecto Regional MIP. Turrialba, Costa Rica. 138 p.

- CABALLERO, R. 1993. Moscas blancas neotropicales (Homoptera: Aleyrodidae): hospedantes, distribución, enemigos naturales e importancia económica. *In: Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe*. I. Hilje y O. Arboleda (eds.). Serie Técnica. Informe Técnico No. 205. CATIE. p. 10-15.
- COSTA, A.S. 1965. Three whitefly-transmitted virus diseases of beans in Sao Paulo, Brazil. *FAO Plat. Prot. Bull.* 13: 121-130.
- DEAN, R.A.; J. KUC. 1986. Induced systemic protection in cucumbers: The source of the "signal". *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 28:227-233.
- DRY, Y.B., J.E. RIGDEN, L.R. KRAKE, P.M. MULLINEAUX and M.A. REZAIAN. 1993. Nucleotide sequence and genome organization of tomato leaf curl geminivirus. *J. Gen. Virol.* 74: 147-151.
- DUBON, R., V. SALGUERO y G. PAREJA. 1993. Metodología para muestrear mosca blanca en tomate. *In: V. Salguero, D. Dardón y R. Fischer (eds.). Manejo Integrado de Plagas en Tomate. Fase I: 1991-1992. Proyecto MIP-ICTA-CATIE-ARF. Guatemala.* p. 53-74.
- DUPLER, M.; R. BAKER. 1984. Survival of *Pseudomonas putida* a biological control agent in soil. *Phytopathology*. 74:195-200.
- FRENCH, E. R., T.T. HERBER. 1982. Métodos de investigación fitopatológica. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). San José, Costa Rica. 289 p.
- FROMMEL, M.I.; J. NOWAK; G. LAZAROVITS. 1991. Growth enhancement and developmental modifications of *in vitro* grown potato as affected by a nonfluorescent *Pseudomonas* sp. *Plant Physiology*. 96:928.

- GERLING, D., A.R. HOROWITZ y J. BAUMGAERTNER. 1986. Autecology of *Bemisia tabaci*. Agriculture, Ecosystems and environment 17: 5-19.
- GONZALEZ, R.; E. BUSTAMANTE; P. SHANNON; S. OKUMOTO; G. LEANDRO. 1996. Selección de microorganismos quitinolíticos en el control de sigatoka negra (*Mycosphaerella figiensis*) en banano. Manejo Integrado de Plagas. 40:6-11.
- GREATHEAD, A.H. 1986. Host plants. In: *Bemisia tabaci*- A literature survey. M.J.W. Cock. (ed.) CAB Intl. Inst. Biol. Control. Silwood Park. UK. p. 17-26.
- GILBERTSON, R.L., S.H. HIDAYAT, E.J. PAPLOMATAS, M.R. ROJAS, Y.M.HOU and D.P. MAXWELL. 1993. Pseudorecombination between the infectious cloned DNA components of tomato mottle and bean dwarf mosaic geminiviruses. J. Gen Virol. 74: 23-31.
- GILBERTSON, R.L., S.H. HIDAYAT, R.T. MARTINEZ, S.A. LEONG, J.C. FARIA and D.P. MAXWELL. 1991. Differentiation of bean-infecting geminiviruses by nucleic acid hybridization probes and aspects of bean golden mosaic in Brazil. Plant. Dis. 75:336-342.
- GOTTSTEIN, H.D. and j. KUC. 1989. Induction of sistemic resistance to anthracnose in cucumber by phosphates. Phytopathology 79:176-179.
- GALVEZ, G.E. and M.J. CASTAÑO. 1976. Purification of the whitefly-transmitted bean golden mosaic virus. Turrialba 26: 205-207.
- GOODMAN, R.M., J. BIRD, and P. THONGMEEARKOM. 1977. An unusual viruslike particle associated with golden yellow mosaic of beans. Phytopathology 67: 34-42.

- HAMMERSCHMIDT, R.; J. KUC. 1982. Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. *Physiology Plant Pathology*. 20:61.
- HANSON, P.; BERNAL, J.; ANGULO, C.; MORA, R.; LEZAMA, H. 1994. Estudio preliminar para la implementación del control biológico de la mosca blanca por parasitoides. *In: Resúmenes. XL Reunión Anual del PCCMCA. San José, Costa Rica. p. 97.*
- HIGA, T.; G.N. WIDIDANA. 1989. The concept and theories of effective microorganism. *In: First International Conference of Kyusei Nature Farming. J.F. Parr, S.B. Hornik, C.E. Whiteman. (eds.). USDA/USAID, Beltsville, Maryland, USA. P. 118-124.*
- HILJE, L. y O. ARBOLEDA. 1993. Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe. Serie Técnica. Informe Técnico No. 205. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 66 p.
- HILJE, L., D. CUBILLO y L. SEGURA. 1993. Observaciones ecológicas sobre la mosca blanca *Bemisia tabaci* (Gennadius) en Costa Rica. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 30: 24-30.
- HOITINK, H.A.J.; A.G. STONE; D.Y. HAN. 1996. Suppression of plant diseases by compost. *In: VI Congreso Internacional de Manejo Integrado de Plagas y V Taller Latinoamericano Sobre Moscas Blancas y Geminivirus. (Memorias, Sep. 29 - Oct. 4, Acapulco, México). p. 47-52.*
- HOWIE, W.J.; R.J. COOK; D.M. WELLER. 1987. Effects of soil matric potential and cell motility on wheat root colonization by fluorescent pseudomonads suppressive to take-all. *Phytopathology*. 77:286-292.

- KAPLAN, R.C.; BERGMAN, E.L. 1985. Virus infection and nutrient elemental content of the host plant. *Ann. Review. Soil Sci. Plant Anal.* 16:439-465.
- KIJIMA, T. 1993. Control de enfermedades a través de microorganismos antagónicos. Uso de productos biológicos. *Noubunkyou. Tokio, Japan.* P. 103-113.
- KLOEPPER, J.W.; M.N. SCHROTH; T.D. MILLER. 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. *Phytopathology.* 70: 1078-1082.
- KLOEPPER, J.W.; M.N. SCHROTH. 1981. Plant growth-promoting rhizobacteria and plant growth under gnotobiotic conditions. *Phytopathology.* 71: 642-644.
- LASTRA, R. 1993. Los geminivirus: un grupo de fitovirus con características especiales *In: Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrodidae) en América Central y el Caribe.* L. Hilje y O. Arboleda (eds.). Serie Técnica. Informe Técnico No. 205. CATIE. p.16-19.
- LAWTON, M.A.; C.J. LAMB. 1987. Transcriptional activation of plant defense genes by fungal elicitor, wounding and infection. *Molecular Cellular Biology.* 7:335.
- LEBEN, C. 1961. Microorganism in cucumber seedlings. *Phytopathology.* 51: 553-557.
- LIU, L.; J.W. KLOEPPER; S. TUZUN. 1995. Induction of systemic resistance in cucumber by plant growth-promoting rhizobacteria: duration of protection and effect of host resistance on protection and root colonization. *Phytopathology* 85:1064-1068.

- LOPER, J.E.; T.V. SUSLOW; M.N. SCHROTH. 1984. Lognormal distribution of bacterial populations in the rhizosphere. *Phytopathology*. 74:1454-1460.
- MAURHOFER, M.; C. HASE; P. MEUWLY; J.P. METRAUX; G. DEFAGO. 1994. Induction of systemic resistance of tobacco necrosis virus by the root-colonizing *Pseudomonas fluorescens* strain CHAO: influence of the *gacA* gene and of pyoverdine production. *Phytopathology* 84:139-146.
- MOUND, L.A. 1963. Host correlated variation in *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Homoptera: Aleyrodidae). *Proc. Royal Entomol. Soc. London (A)* 38: 171-180.
- MUCHARROMAH, E.; J. KUC. 1991. Oxalates and phosphates induce systemic resistance against disease caused by fungi, bacteria and viruses in cucumber. *Crop Protection*. 10:265-270.
- OZERETSKOVSKAYA, O.L. 1995. Induced resistance in the solanaceae. In :Induced Resistance to Disease in Plants. Hammerschmidt, R. And J. KUC (EDS.). p. 31-62.
- RAMIREZ, P., D. MAXWELL. 1994. Geminivirus transmitidos por moscas blancas. *In: Biología y Manejo del Complejo Mosca Blanca-Virosis*. M. Mata, D. Dardón y V.Salguero (eds.). *Memorias: III Taller Centroamericano y del Caribe Sobre Mosca Blanca*. Antigua Guatemala, Guatemala. p. 95-108.
- REUVENI, M.; V. AGAPOV; R. REUVENI. 1992. Local and systemic protection against powdery mildew and growth increase in cucumber plants induced by phosphate salts. (Abstract) *Phytopathology*. 82.
- ROOS, A.F. 1966. Systemic acquired resistance induced by localized virus infections in plants. *Virology*. 14, 340-358.

- RICHMOND, S.; J. KUC; J. ELLISTON. 1979. Penetration of cucumber leaves by *Colletotrichum lagenarium* is reduced in plants systemically protected by previous infection by the pathogen. *Physiology Plant Pathology*. 14: 329.
- RIVAS PLATERO, G.G. y R.LASTRA. 1993. Detección no radiactiva de geminivirus en tomate mediante hibridación de ácidos nucleicos. *Manejo Integrado de Plagas*. 30:7-10.
- RIVAS PLATERO, G.G. 1993. Detección de geminivirus en tomate mediante hibridación de ácidos nucleicos y manejo de semilleros para reducir la incidencia de virosis transmitidas por *Bemisia tabaci* (Gennadius) en el campo. Tesis Mag. Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 92 p.
- RIVAS PLATERO, G.G.; P.RAMIREZ; D.CUBILLO; L.HILHE. 1995. Translocación y cuantificación del ADN viral de geminivirus asociados con el mosaico amarillo del tomate. *Manejo Integrado de Plagas*. 38:20-24.
- RIVAS PLATERO, G.G.; V. VILLALVA VELASQUEZ; P. RAMIREZ; H. GARITA. 1996. Detección del mosaico amarillo del tomate en el vector *Bemisia tabaci* (Gennadius). *In: VI Congreso Internacional de Manejo Integrado de Plagas y V Taller Latinoamericano Sobre Moscas Blancas y Geminivirus*. (Memorias, Sep. 29 - Oct. 4, Acapulco, México). p. 191.
- RIVAS PLATERO, G.G. 1996. Descripción matemática de epidemias. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*. 40:35-39.
- RIVAS PLATERO, G.G. 1996. Identificación de virus fitopatógenos a través de pruebas inmunoenzimáticas y moleculares. *Hoja Técnica No. 17*. 40:I-IV.

- ROM, M., Y. ANTIGNUS; D. GIDONI; M. PILOWSKY; S. COHEN. 1993. Accumulation of tomato yellow leaf curl virus DNA in tolerant and susceptible tomato lines. *Plant Disease*. 77: 253-257.
- RODRIGUEZ OZORNO, L.A. 1995. Antagonismo endofítico de microorganismos a *Mycosphaerella fijiensis* del plátano y *Alternaria solani* del tomate. Tesis Mag. Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 75 p.
- SALT, S.D.; S.Q. PAN; J. KUC. 1988. Carbohydrate changes in tobacco systemically protected against blue mold by stem infection with *Peronospora tabacina*. *Phytopathology*. 78:733-738.
- SCHROTH, M.N.; J.G. HANCOCK. 1982. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science*. 216:1376-1381.
- SERRANO, L. SERMENO, J.M.; LARIOS, J.F. 1993. Las moscas blancas (Homoptera: Aleyrididae) en América Central y el Caribe. CATIE. Serie Técnica. Informe Técnico No. 205. p. 42-49.
- STOLLE, K.; M. ZOOK; L. SHAIN; F. HEBARD; J. KUC. 1988. Restricted colonization by *Peronospora tabacina* and phytoalexin accumulation in immunized tobacco leaves. *Phytopathology*. 78:1193.
- STROMBERG, A.; S. BRISHAMMAR. 1991. Induction of systemic resistance in potato (*Solanum tuberosum*) plants to late blight by local treatment with *Phytophthora infestans*, *P. Cryptogea* or dipotassium phosphate. *Potato Research*. 34: 219-225.
- SUSLOW, T.V.; M.N. SCHROTH. 1982. Rhizobacteria of sugarbeets: effects of seed application and root colonization on yield. *Phytopathology*. 72:199-206.

- TUZUN, S.; M. REUVENI; M.R. SIEGEL; J.KUC. 1989. The effect of removing leaf surface compounds with acetone from immunized and nonimmunized resistant tobacco plants on their susceptibility to blue mold. *Phytopathology*. 79:1024.
- TUZUN, S.; W. NESMITH; R.S. FERRISS; J. KUC. 1986. Effects of stem injections with *Peronospora tabacina* on growth of tobacco and protection against blue mold in the field. *Phytopathology*. 76:938-941.
- VAN PEER, R.; G.J. NIEMANN; B. SCHIPPERS. 1991. Induced resistance and phytoalexin accumulation in biological control of Fusarium wilt of carnation by *Pseudomonas* sp. strain WCS417r. *Phytopathology*. 81: 728.
- VAN LENTEREN, J.C.; L.P.J.J. NOLDUS. 1990. Whitefly-plant relationships: Behavioural and ecological aspects. In: *Whiteflies: Their bionomics, pest status and management*. D. Gerling (ed.): New Castle, UK. Athenaeum Press. p. 47-89.
- WALTERS, D.R.; D.C. MURRAY. 1992. Induction of systemic resistance to rust in *vicia faba* by phosphate and EDTA: effects of calcium. *Plant Pathology*. 41:444-448.
- WHITAKER, M.J. 1993. The challenge of pesticide education and training for tropical smallholders. *Int.Jour. of Pest Management* 39(2): 117-125.
- WEI, G.; S. TUZUN; J.W. KLOEPPER. 1992. Comparison of biochemical responses in cucumber sistemically protected against *Colletotrichum orbiculare* by prior leaf inoculation with the pathogen or seed treatment with rhizobacteria. *Phytopathology*. 82: 1109.

- WEI, G.; J.W. KLOEPPER; S. TUZUN. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum oryculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology*. 81:1508-1512.
- WELLER, D.M.; R.J. COOK. 1983. Suppression of take-all wheat by seed treatments with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*. 73:463-469.
- WELLER, D.M.; W.J. HOWIE; R.J. COOK. 1988. Relationship between in vitro inhibition of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* and suppression of take-all of wheat by fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*. 78.
- XU, G.W.; D.C. GROSS. 1986. Selection of fluorescent pseudomonads antagonistic to *Erwinia carotovora* and suppressive of potato seed piece decay. *Phytopathology*. 76:414-422.
- ZDOR, R.E.; A.J. ANDERSON. 1992. Influence of root colonizing bacteria on defense responses of bean. *Plant Soil*. 140:99.

X. ANEXOS

Anexo 1. Promedios de peso fresco y peso seco (g) según los tratamientos.

TRATAMIENTOS	INOCULACION AL SUELO		INOCULACION A LA SEMILLA	
	PESO FRESCO	PESO SECO	PESO FRESCO	PESO SECO
<i>S. marcescens</i>	130.22	14.02	141.18	13.97
<i>B. cereus</i>	112.11	11.15	227.46	26.01
<i>P. cepacia</i>	115.22	11.74	148.99	16.59
CS-10	127.45	12.68	123.09	12.24
LE-2	111.95	11.45	168.27	17.15
LE-12	114.62	11.98	148.81	14.50
K ₂ HPO ₄	110.75	10.84	197.30	23.40
``bocashi``	276.18	33.81	222.70	21.73
K ₂ HPO ₄ + <i>B. cereus</i>	106.80	10.94	218.43	21.99
``bocashi``+ <i>B. cereus</i>	269.37	33.33	190.39	20.40
Testigo absoluto	143.78	18.95	212.87	24.09
Testigo relativo	118.91	12.74	198.49	19.81

Anexo 2. Promedios finales de altura (cm), diámetro (mm) e índice severidad de síntomas según los tratamientos.

TRATAMIENTOS	INOCULACION AL SUELO			INOCULACION A LA SEMILLA		
	ALT	DIAM	SEVER	ALT	DIAM	SEVER
<i>S. marcescens</i>	127	5.6	1.00	122	5.40	2.50
<i>B. cereus</i>	115	5.4	1.88	132	6.20	2.25
<i>P. cepacia</i>	120	5.7	2.00	127	5.30	2.13
CS-10	122	5.7	2.25	114	5.20	2.75
LE-2	129	5.4	1.50	123	5.90	2.13
LE-12	120	5.6	1.63	131	5.40	2.25
K ₂ HPO ₄	129	5.6	1.63	143	5.80	2.00
``bocashi``	140	8.1	2.75	131	6.10	2.13
K ₂ HPO ₄ + <i>B. cereus</i>	123	5.5	2.25	134	6.30	2.25
``bocashi``+ <i>B. cereus</i>	140	8.2	2.25	132	6.30	2.13
Testigo absoluto	117	6.2	0.25	144	6.10	0.00
Testigo relativo	123	6.0	2.13	136	5.60	2.38

Anexo 3. Condiciones ambientales durante los experimentos

Día	Radiación Solar (Mj/cm ²)				Temperatura (°C)				Humedad Relativa (%)			
	May	Jun	Jul	Ag	May	Jun	Jul	Ag	May	Jun	Jul	Ag
11	6.95	9.09	24.11	14.51	22.7	22.4	22.7	21.5	97.5	96.3	83.5	89.1
12	4.48	9.43	18.22	27.14	21.6	22.3	22.7	23.4	98.0	93.2	89.6	87.5
13	19.13	14.79	15.44	14.39	22.9	23.1	21.8	22.3	86.8	89.5	88.8	92.7
14	13.25	16.11	23.98	9.40	22.7	22.5	23.1	20.9	88.7	90.1	85.5	95.0
15	15.24	14.74	9.20	16.86	22.1	22.5	22.2	21.4	88.4	92.5	90.9	92.5
16	14.76	13.44	10.45	14.39	22.0	22.4	21.6	21.8	87.5	94.1	90.1	93.0
17	12.49	18.44	14.52	20.53	22.5	23.3	22.2	21.5	90.0	85.2	91.2	88.9
18	17.93	15.34	15.09	19.77	23.1	23.1	22.5	22.1	85.1	88.2	95.6	88.9
19	21.16	17.61	12.37	21.14	23.1	23.8	22.1	22.7	84.0	86.5	97.2	84.2
20	19.96	18.85	18.75	24.84	23.2	23.8	22.4	23.4	85.3	83.2	97.5	85.6
21	22.44	9.66	15.94	24.55	23.5	23.5	23.3	22.7	84.2	90.0	93.6	83.8
22	20.49	19.43	13.89	15.10	23.3	23.4	23.2	22.0	84.6	82.8	95.0	90.1
23	23.96	15.12	15.32	20.56	23.4	23.4	23.3	22.6	84.5	87.4	89.7	87.8
24	19.38	15.15	16.87	7.96	22.9	23.5	22.9	21.4	85.0	85.2	87.8	94.8
25	15.02	17.65	16.00	12.38	23.0	23.5	22.8	21.2	88.5	83.8	88.3	93.6
26	10.50	9.40	13.54	13.29	21.8	21.9	22.9	21.4	93.0	89.8	89.2	91.2
27	21.50	14.88	5.89	17.71	23.3	22.1	22.2	21.8	85.4	88.9	97.0	92.0
28	20.74	11.85	6.03	17.80	23.5	21.9	22.6	22.2	84.6	89.5	97.5	93.3
29	16.77	12.47	20.23	25.26	23.2	21.8	22.1	22.7	89.5	88.6	94.5	78.5
30	13.94	6.06	15.46	19.10	22.0	21.4	22.0	23.4	93.5	95.6	88.9	83.6
31	24.15		19.56	23.07	22.5		22.5	23.4	87.0		89.1	86.3

Anexo 4. Medias de altura, diámetro y severidad de síntomas según los tratamientos.

TRATAMIENTOS	INOCULACION AL SUELO			INOCULACION A LA SEMILLA		
	ALT	DIAM	SEVER	ALT	DIAM	SEVER
<i>S. marcescens</i>	67.23	4.52	0.65	48.15	4.01	1.90
<i>B. cereus</i>	59.10	4.40	1.50	67.33	5.25	1.45
<i>P. cepacia</i>	60.48	4.42	1.25	48.18	4.06	1.45
CS-10	61.90	4.50	1.55	46.75	3.92	2.20
LE-2	64.15	4.36	1.20	51.33	4.52	1.50
LE-12	62.70	4.44	1.25	51.53	4.21	1.45
K ₂ HPO ₄	63.85	4.36	1.00	62.35	4.67	1.40
``bocashi``	92.83	7.02	1.25	52.83	4.53	1.20
K ₂ HPO ₄ + <i>B. cereus</i>	61.23	4.35	1.70	68.39	5.32	1.65
``bocashi``+ <i>B. cereus</i>	90.48	6.89	1.05	56.13	4.62	1.30
Testigo absoluto	63.68	4.65	0.20	59.68	4.70	0.00
Testigo relativo	62.55	4.58	1.30	58.68	4.40	1.55

Anexo 5. Correlación entre índices de severidad de síntomas y producción de biomasa (PF).

FECHAS	INOCULACION AL SUELO		INOCULACION A LA SEMILLA	
	Coef. Corr.	PROB. >	Coef. Corr.	PROB. >
1	-0.24228	0.0971	-0.09737	0.5103
2	-0.36817	0.0100	-0.29445	0.0422
3	-0.28883	0.0465	-0.10224	0.4892
4	-0.21031	0.1514	-0.05186	0.7263
5	0.28611	0.0487	-0.02664	0.8574

Anexo 6. Lecturas de Radiación.

DIAS	RADIACION FOTOSINTETICAMENTE ACTIVA ($\mu\text{moles/m}^2 \cdot \text{s}$)	
	DENTRO DEL INVERNADERO	FUERA DEL INVERNADERO
1	105	516
2	413	1802
3	433	1805
4	321	1706
5	378	1534
6	297	1450
7	456	2080
8	295	1752

Anexo 7. Análisis de varianza para las variables: altura, diámetro y síntomas ($\text{Pr}>F$).

FUENTE DE VARIACION	ALTURA	DIAMETRO	SINTOMAS
R2	0.973462	0.923469	0.667889
C.V.	12.41393	9.232549	20.74318
Inoculación (INOC)	0.0001**	0.0001**	0.0001**
Tratamientos (TRAT)	0.0001**	0.0001**	0.0001**
Fecha	0.0001**	0.0001**	0.0001**
INOC*TRAT	0.0001**	0.0001**	0.0004**
INOC*Fecha	0.0001**	0.0564	0.4096
TRAT*Fecha	0.0557	0.9995	0.1353
INOC*TRAT*Fecha	0.0003**	0.5808	0.9988

Las cifras con asterisco fueron significativas ($p < 0.05$) y con dos asteriscos altamente significativas ($p < 0 = 0.01$).

Anexo 8. Contrastes ortogonales para las variables: altura, diámetro y síntomas en inoculación al suelo.

CONTRASTES	ALTURA	DIAMETRO	SINTOMAS
R2	0.980332	0.964262	0.637798
C.V.	9.759402	6.599307	21.49133
TA vs resto	0.0001**	0.0001**	0.0001**
TR vs tratados	0.0001**	0.0001**	0.4384
Orgánicos vs no orgánicos	0.0001**	0.0001**	0.0453*
Químico vs Químico + Bacillus	0.0756	0.8895	0.0016**
Bacillus vs Pseudomonas y Serratia	0.0002**	0.2534	0.0026**
Pseudomonas vs Serratia	0.0001**	0.1549	0.0015**

Las cifras con asterisco fueron significativas ($p < 0.05$) y con dos asteriscos altamente significativas ($p < 0 = 0.01$).

Anexo 9. Contrastes ortogonales para las variables: altura, diámetro y síntomas en inoculación a la semilla.

CONTRASTES	ALTURA	DIAMETRO	SINTOMAS
R2	0.957798	0.859006	0.685149
C.V.	15.37762	11.55418	20.04792
TA vs resto	0.0044**	0.0243*	0.0001**
TR vs tratados	0.0184*	0.1830	0.8704
Orgánicos vs no orgánicos	0.3473**	0.2354	0.0017**
Químicos vs No Químicos	0.0001**	0.0001**	0.6466
Químico vs Químico + Bacillus	0.0018**	0.0001**	0.3274
Microorg. Lab. vs Microorg. Campo	0.0001**	0.0007**	0.6947
Bacillus vs Pseudomonas y Serratia	0.0001**	0.0001**	0.2065

Las cifras con asterisco fueron significativas ($p < 0.05$) y con dos asteriscos altamente significativas ($p < 0 = 0.01$).

Anexo 10. Análisis de varianza para la variables: peso fresco y peso seco(Pr>F).

FUENTE DE VARIACION	PESO FRESCO	PESO SECO
Inoculación (INOC)	0.0001**	0.0001**
Tratamientos (TRAT)	0.0001**	0.0001**
INOC*TRAT	0.0001**	0.0001**

Las cifras con asterisco fueron significativas ($p < 0.05$) y con dos asteriscos altamente significativas ($p < 0.01$).

Anexo 11. Contrastes ortogonales para las variables: peso fresco y peso seco en inoculación al suelo.

CONTRASTES	PESO FRESCO	PESO SECO
R2	0.946170	0.932817
C.V.	11.05188	15.50970
TA vs resto	0.8969	0.0242*
TR vs tratados	0.0016**	0.0125*
Orgánicos vs No Orgánicos	0.0001**	0.0001**

Las cifras con asterisco fueron significativas ($p < 0.05$) y con dos asteriscos altamente significativas ($p < 0.01$).

Anexo 12. Contrastes ortogonales para la variable: peso fresco y peso seco en inoculación a la semilla.

CONTRASTES	PESO FRESCO	PESO SECO
R2	0.589490	0.507975
C.V.	18.02012	24.76066
TA vs resto	0.0682	0.0447*
TR vs tratados	0.2594	0.6879
Orgánicos vs No Orgánicos	0.0113*	0.1429
Químicos vs No Químicos	0.0010**	0.0043**
Microorg. Lab. Vs Microorg. Campo	0.0633	0.0371*
Bacillus vs Pseudomonas y Serratia	0.0002**	0.0008**

Las cifras con asterisco fueron significativas ($p < 0.05$) y con dos asteriscos altamente significativas ($p < 0.01$).