

**DINAMICA POBLACIONAL DE BACTERIAS LITICAS PRESENTES EN LA
FILOSFERA DE BANANO EN CONDICIONES DE CAMPO EN LA ZONA DE
URABA**

ADALBERTO HERRERA ARCILA

**POLITECNICO COLOMBIANO JAIME ISAZA CADAVID
PRODUCCION AGROPECUARIA
APARTADO
2010**

**DINAMICA POBLACIONAL DE BACTERIAS LITICAS PRESENTE EN LA
FILOSFERA DE BANANO EN CONDICIONES DE CAMPO EN LA ZONA DE
URABA**

ADALBERTO HERRERA ARCILA

**TRABAJO DE INVESTIGACION PARA OPTAR AL TITULO DE
TECNOLOGO AGROPECUARIO**

**TUTOR
JORGE ALBERTO GONZÁLEZ CARDENAS
ADMINISTRADOR DE EMPRESAS AGROPECUARIAS**

**LUZ ESTELLA VASQUEZ DAVID
BACTERIOLOGA MSc en BIOTECNOLOGÍA**

**POLITECNICO COLOMBIANO JAIME ISAZA CADAVID
PRODUCCION AGROPECUARIA
APARTADO
2010**

Nota de aceptación

Presidente del jurado

Jurado

Jurado

Apartado, 10 de junio de 2010

DEDICATORIA

A mis padres, mis hermanos y amigos que me guiaron y alentaron por el camino correcto con su constante voz de aliento en los momentos más difíciles y en especial a mi esposa e hijo que son la inspiración y la razón ser de mi vida.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

A Cristian Alonso Higueta Manco, por darme la oportunidad de ser parte de este proyecto.

A Luis Fernando Patiño y Luz Esthela Vásquez, por brindarme todo su apoyo, comprensión y confianza en el trabajo realizado.

A Jackson Danilo Osorio, por sus valiosos aportes transmitidos por sus conocimientos y experiencias.

A María Isabel Aristizábal, por su gran disposición a la hora de brindarme su apoyo y colaboración al momento de necesitar información que ella manejaba.

Al personal de laboratorio CENIBANANO – AUGURA, por su valiosa colaboración en las muchas dificultades dadas durante mi trabajo en el laboratorio y en especial por su calidad humana.

A Carolina Zapata Álvarez y Gabriel Herrera Zapata, por ser la inspiración y la razón de ser de este trabajo.

A Jorge Alberto González, por su buen asesoramiento a la hora de corregir todos mis errores.

A mis compañeros, que de una u otra forma hacen parte de este gran logro, solo me resta decirles muchísimas gracias.

TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN	11
1. INTRODUCCIÓN	13
2. OBJETIVOS	14
2.1. OBJETIVOS GENERALES	14
2.2. OBJETIVOS ESPECIFICOS	14
3. REVISIÓN DE LITERATURA	15
3.1 SIGATOKA NEGRA	15
3.1.1 Origen y distribución de la Sigatoka negra	15
3.1.2 Etiología	17
3.1.3 Sintomatología	18
3.1.4 Evaluación del estado de infección	21
3.1.4.1 Metodología de Stover modificada por Gauhl	22
3.1.5 Ciclo de la enfermedad	24
3.1.6 Epidemiología	27
3.2 METODOS DE CONTROL DE LA SIGATOKA NEGRA	29
3.2.1 Prácticas culturales	30

3.2.2	Mejoramiento genético	31
3.2.3	Control biológico	32
3.2.4	Control químico	33
3.2.4.1	Protectantes	34
3.2.4.2	Sistémicos	35
3.2.4.3	Sistémicos locales	37
3.3	RESISTENCIA A FUNGICIDAS	38
3.4	USO DE LA QUITINA PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES FOLIARES	40
3.4.1	Microorganismos quitinolíticos	41
3.5	USO DE GLUCANO PARA EL MANEJO DE ENFERMEDADES FOLIARES	42
3.5.1	El uso de glucano como sustrato y como activador de las barreras defensivas de la planta	42
3.6	ASPECTOS DE LA FILOSFERA	46
3.6.1	El medio ambiente de la filosfera	46
3.7	CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES CAUSADAS POR HONGOS FITOPATÓGENOS	49
3.8	SUSTRATOS FOLIARES PARA EL INCREMENTO DE BACTERIAS QUITINOLÍTICAS Y GLUCANOLÍTICAS EN LA FILOSERA DE BANANO	59
3.8.1	Efecto de sustratos foliares sobre la Sigatoka negra	62

4.	MATERIALES Y MÉTODOS	66
4.1	LOCALIZACIÓN	66
4.2	DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANALISIS DE RESULTADOS	68
4.3	METODOLOGIA EN CAMPO	71
4.3.1	Toma de muestras en parcelas experimentales.	71
4.4	METODOLOGIA EN LABORATORIO	72
4.4.1	Siembra en laboratorio de muestras provenientes de plantas de las parcelas experimentales.	72
4.5	PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO.	74
4.5.1	Agar bacteriológico (2%) + Harina de cebada (2.5%)	74
4.5.2	Agar bacteriológico (2%) + Quitina coloidal (4%)	75
5.	RESULTADOS Y CONCLUSIONES	78
5.1	Objetivo 1	78
6.	LITERATURA CITADA	87

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Fungicidas utilizados en el control de Sigatoka negra.	38
Análisis estadístico para la variable ufc/cm ² en parcelas experimentales	86

ÍNDICE DE FIGURA

Mapa de distribución de la Sigatoka negra en el mundo.	17
Escala de Stover modificada por Gauhl (1989).	23
Conteo de hojas en la evaluación de incidencia en Sigatoka negra.	23
Ciclo de vida de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> .	25
Localización geográfica de la investigación.	67
Efectos de los sustratos foliares solos y en mezcla con fungicidas sobre la dinámica poblacional de bacterias glucanolíticas.	79
Efectos de los sustratos foliares solos y en mezcla con fungicidas sobre la dinámica poblacional de bacterias quitinolíticas.	80
Efecto de la precipitación sobre la dinámica poblacional de bacterias quitinolíticas.	82
Efecto de la precipitación sobre la dinámica poblacional de las bacterias glucanolíticas.	83
Relación de la dinámica poblacional de bacterias glucanolíticas con el desarrollo de Sigatoka negra.	84
Relación de la dinámica poblacional de bacterias quitinolíticas con el desarrollo de Sigatoka negra.	85

ÍNDICE DE FOTOS

Estado 2	19
Estado 3.	19
Estado 6.	20
Reducción de inóculo en campo por remoción del tejido enfermo.	31
Aplicación aérea de fungicida.	34
Parcela experimental.	69
Parcelas con las barreras.	69
Toma de muestra en campo.	72
Hisopo diluido en buffer fosfato.	72
Materiales para la siembra de muestras.	73
Muestras sembradas.	73
Colonias de bacterias líticas.	74
Medios de cultivos.	75
Servicios de medios de cultivos.	76
Componentes para la preparación de sustratos foliares.	78

DINAMICA POBLACIONAL DE BACTERIAS LITICAS PRESENTES EN LA FILOSFERA DE BANANO EN CONDICIONES DE CAMPO EN LA ZONA DE URABA

RESUMEN

La Sigatoka negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, es la enfermedad foliar más destructora para la producción de los cultivos de banano y plátano en el mundo. Actualmente el control de esta enfermedad se centra en la aplicación de fungicidas químicos; sin embargo, el patógeno ha desarrollado resistencia, aumentando los costos de control, el impacto negativo sobre el ambiente y la exigencia de los consumidores por una fruta cada vez más libre del uso de plaguicidas. Se ha desarrollado investigación para promover el incremento de poblaciones nativas de bacterias con actividad lítica sobre *M. fijiensis* a través de sustratos foliares selectivos de esta microbiota. Se observó que las poblaciones de bacterias glucanolíticas y quitinolíticas tienden a estabilizarse con tendencia al aumento en los últimos muestreos, ello puede deberse a la adaptación de las poblaciones nativas a la aplicación periódica de los sustratos solos o en mezcla con fungicidas o a la incursión de condiciones ambientales que favorecieron el crecimiento de las bacterias.

Palabras clave: *Mycosphaerella fijiensis*, bacterias quitinolíticas, bacterias glucanolíticas, quitina coloidal, harina de cebada, control biológico.

ABSTRACT

The Black Sigatoka caused by the fungus *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, is the most destructive foliar disease in the banana (*Musa × paradisiaca* L.) and plantain (*Musa acuminata* Colla) production around the world. Chemical fungicides are the main control tactics; however, fungicide resistance had increased control costs, besides environmental contamination and consumers demands for a fruit free of pesticide residues. It was observed that populations of bacteria and chitinolytic glucanolytic tend to be stable with a tendency to increase in recent surveys, this may be due to the adaptation of native populations to the periodic use of the substrates alone or in mixtures with fungicides or conditions raid environment that fostered the growth of bacteria.

Key words: *Mycosphaerella fijiensis*, chitinolytic bacteria, glucanolytic bacteria, colloidal chitin, barley flour, biological control.

1. INTRODUCCIÓN

La Sigatoka negra es la enfermedad de mayor impacto económico en los cultivos de banano (*MusaAAA.*) y plátano (*Musa AAB*) debido a la alta demanda de uso de fungicidas de síntesis necesarios para obtener una fruta que cumpla con los estándares de calidad para exportación, los cuales se ven afectados por la enfermedad principalmente en la duración de la vida verde de la fruta cosechada. Dichos fungicidas deben ser aplicados en intervalos de 7-12 días, lo cual genera la aplicación de 35-50 ciclos de fungicidas/ año en los países bananeros, con altos costos de producción en sus cultivos (Chica *et al.*, 2004).

Esta estrategia convencional de control químico de la enfermedad, podría tener una estrategia alternativa y complementaria de manejo, acorde con los lineamientos de una agricultura sostenible, basada en la utilización de microorganismos quitinolíticos y glucanolíticos nativos de la filosfera de musáceas alimenticias, capaces de degradar la quitina y glucanos presentes en la pared celular de hongos ascomicetes (Bartnicki-Garcia, 1968) como *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente etiológico de la enfermedad, hecho que los hace sensibles al ataque de enzimas quitinolíticas o glucanolíticas (Sahai y Manocha, 1993; Mahadevan y Crawford, 1997).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GENERALES.

Conocer bajo condiciones de campo la dinámica de bacterias con potencial lítico sobre *Mycosphaerella fijiensis* en la filosfera de banano.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- 1.** Determinar el efecto de dos sustratos foliares a base de harina de cebada, urea y su combinación con aceite mineral y fungicidas convencionales sobre la cantidad de bacterias quitino y glucanolíticas en la filosfera de banano.
- 2.** Analizar el efecto de la precipitación sobre la dinámica poblacional de las bacterias.
- 3.** Relacionar la dinámica poblacional de las bacterias líticas con el desarrollo de la Sigatoka negra.

3. REVISION DE LITERATURA

3.1 SIGATOKA NEGRA

La Sigatoka negra, es el principal problema fitopatológico del cultivo del banano y el plátano en América, Asia y África (Carlier *et al.* 2000, Lepoivre *et al.* 2003, Marín *et al.* 2003) y es la enfermedad de mayor impacto económico en los cultivos de banano (*MusaAAA.*) y plátano (*Musa AAB*) debido a la alta demanda de uso de fungicidas de síntesis necesarios para obtener una fruta que cumpla con los estándares de calidad para exportación, los cuales se ven afectados por la enfermedad principalmente en la duración de la vida verde de la fruta cosechada. Dichos fungicidas deben ser aplicados en intervalos de 7-12 días, lo cual genera la aplicación de 35-50 ciclos de fungicidas año en los países bananeros, con altos costos de producción en sus cultivos (Chica *et al.*, 2004).

3.1.1 Origen y distribución de la sigatoka negra

La Sigatoka Negra se identificó por vez primera en 1963 en la costa sudeste de Viti Levu (Islas figi) (Rhodes 1964). Seguidamente, se registró su presencia en el Pacífico (estrecho de Torres y península del Cabo York en Australia, Papua Nueva Guinea, Islas Salomón, Vanuatu, Nueva Caledonia, Isla Norfolk, Estados Federales de Micronesia, Tonga, Samoa Occidental, Isla Niue, Isla Cook, Tahití y Hawái). También, fue observada en Asia en la localidad de Bután, Taiwán, sur de

China incluida la Isla Hainan, Vietnam, Filipinas, Malasia Occidental y Sumatra en Indonesia (Stover 1987).

En África, esta enfermedad se documentó por vez primera en Zambia en 1973 y en Gabón en 1978. Luego se extendió a lo largo de la costa occidental hacia Camerún, Nigeria, Benín, Togo, Ghana y Costa de Marfil. Detectada en 1987 en la república democrática de Congo (ex Zaire), alcanzando Burundi, Ruanda, el Oeste de Tanzania, Uganda Kenia y la República Centroafricana.

En América Latina, la Sigatoka negra se describió por primera vez en Honduras en el año de 1972 (Stover y Dickson, 1976), desde donde se diseminó hacia Guatemala y Belice, llegando al sur de México en 1981 (Orozco et al. 2001). Posteriormente, se estableció en El Salvador, Nicaragua, Costa Rica en 1979 (Marín y Romero, 1992) y en Panamá en 1981 (Marcelino y Quintero, 1992), siguiendo hacia Colombia, Ecuador y Perú (Merchán, 1990). Se ha registrado en Venezuela y Cuba en 1991 y en Jamaica y La República Dominicana en 1996, en Bolivia en 1997 y por último en Brasil en 1998. (Figura 1.)

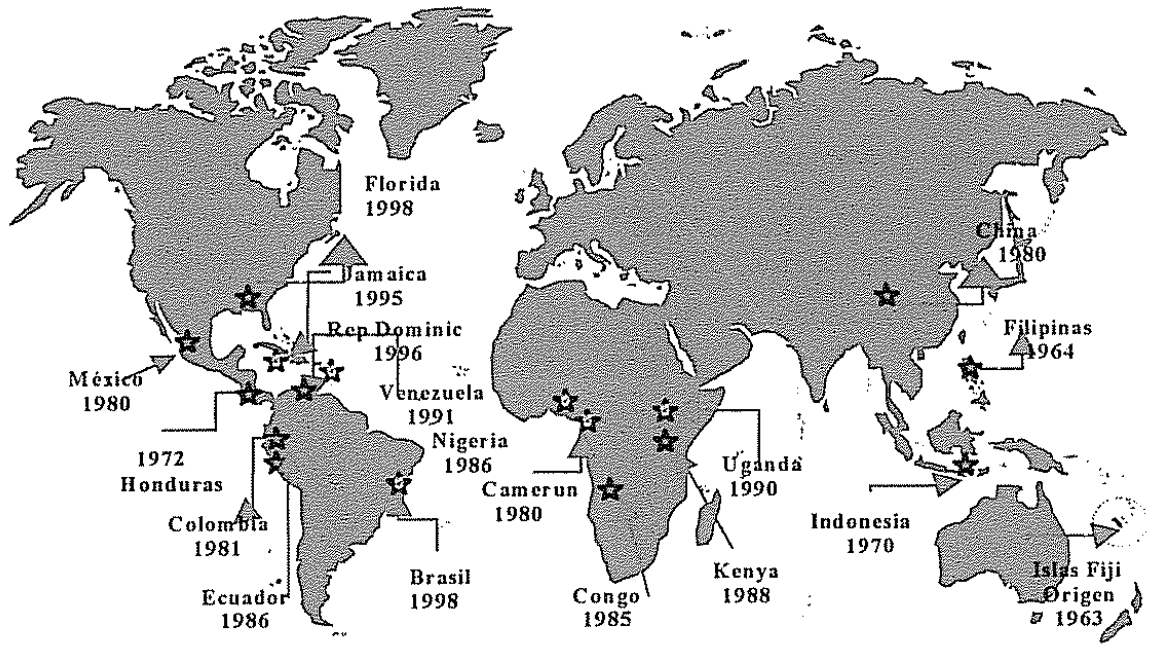


Figura 1. Mapa de distribución de la Sigatoka negra en el mundo.

3.1.2 Etiología

El agente causal de la Sigatoka negra *M. fijiensis* Morelet, con su estado imperfecto correspondiente a la especie *Paracercospora fijiensis* (Morelet) Deighton, renombrado recientemente como *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton, es un hongo de la clase Ascomycetes, orden Dothideales Dothideaceae. (Belalcázar et al, 1991, 253); (Marín et al, 2003, 211); (Patiño y Mejía, 1999, 10); (Ploetz et al, 1994, 7); (UPEB, 1992, 33). Este hongo se reproduce y disemina a través de dos clases de esporas de tamaño microscópico conocidas como **ascosporas** y **conidios** las cuales constituyen el inóculo del patógeno (Merchán, 2000).

Las ascosporas o esporas de origen sexual se encuentran dentro de las ascas, las cuales, se producen en el interior de los pseudotecios o pseudoperitecios que aparecen como puntos negros sobre las manchas cenizas, especialmente, en hojas que están parcial o totalmente necróticas. Los conidios o esporas de origen asexual se producen en las primeras lesiones de la enfermedad, es decir, cuando aparecen los puntos o pizcas y las rayas, principalmente, en el envés de la hoja (Merchán, 2000).

3.1.3 Sintomatología

Como resultado de la acción patogénica de *M. fijiensis* en las hojas de las plantas afectadas se manifiesta una serie de síntomas que van desde puntos y rayas hasta manchas necróticas, pasando por diferentes estados, los cuales han sido descritos por Fouré (Fouré, 1991), de la siguiente manera:

Estado 1. En este estado se puede apreciar el primer síntoma visible de la enfermedad el cual se distingue por la presencia de pequeñas decoloraciones por puntos con menos de un milímetro de longitud, de color café rojizo más conocida como pizca. Este síntoma no es visible al trasluz y solo se puede observar por el envés de la hoja.

Estado 2. Las pizcas aumentan de tamaño en sentido longitudinal paralelas a la venación, formando estrías de 2 a 3 mm de longitud, de color café rojizo visibles primero en el envés y luego en el haz.



Foto 1.Estado 2

Estado 3. Se distingue por la presencia de estrías o rayas con un tamaño mínimo de 5 mm, pudiendo alcanzar hasta 2 a 3 cm de largo. Las estrías conservan el color rojizo por el envés y toman color negro por el haz.



Foto 2. Estado 3

Estado 4. Se caracteriza por la presencia de manchas elípticas u ovals que toman un color café por el envés y negro por el haz.

Estado 5. En este estado la mancha elíptica es totalmente negra en ambas caras de la hoja, aparece rodeada por un halo amarillo y presenta una “depresión” en el centro del tejido.

Estado 6. La mancha está totalmente desarrollada; el área central hundida es de color gris y un borde de color café oscuro o negro forma un anillo bien definido alrededor de la mancha. Además, aparece un halo de color amarillo brillante alrededor de la lesión. Aun cuando la hoja esté muerta, la mancha persiste y el anillo oscuro que rodea la mancha también se mantiene bastante definido.



Foto 3. Estado 6.

La Sigatoka negra ataca solamente las hojas en donde produce una gran cantidad de manchas que coalescen rápidamente, causando necrosis y muerte de toda el área foliar. De esta manera, disminuye la actividad fotosintética afectando el normal crecimiento y productividad de las plantas y trayendo, como consecuencia, la maduración prematura de los racimos lo que se constituye en la mayor causa de pérdidas ligadas al ataque de esta enfermedad (Merchán, 2000, citado por Bornacelly y Bolaño, 2003).

Una vez el patógeno ha penetrado al hospedero, a través de los estomas, inicia el proceso de colonización intercelular e intracelular hasta formar conidióforos de *P. fijiensis*, que emergen por el envés de las hojas desde el primer estadio de la enfermedad hasta el desarrollo completo de la lesión (Belalcázar, 1991).

3.1.4 Evaluación del estado de infección

Es necesario tener una idea clara y precisa del estado sanitario de la finca, para prevenir daños severos al cultivo y su producción. Por esta razón se deben hacer evaluaciones periódicas (semanales o quincenales) sobre la incidencia y severidad de la sigatoka negra en cada finca.

A continuación se presentan dos sistemas que son los más ampliamente usados: la metodología de Stover modificada para la evaluación de incidencia y severidad; y el sistema de preaviso biológico, estado de desarrollo de la enfermedad, para la determinación del momento para aplicar fungicidas.

3.1.4.1 Metodología de Stover modificada por Gauhl

La evaluación de incidencia y severidad por medio de la Metodología de Stover modificada, permite obtener información bastante detallada de la situación sanitaria de la plantación.

El sistema consiste en una estimación visual del área foliar afectada en todas las hojas de plantas próximas a floración, sin necesidad de bajar la hoja. Para esta evaluación se toman en cuenta todas las hojas presentes excepto la hoja candela y las hojas agobiadas.

La hoja más cercana a la hoja candela se considera la hoja N° 1. El conteo se facilita considerando la distribución en espiral (par e impar) de derecha a izquierda a partir de las hojas 1 y 2, contando hacia abajo.

Para determinar el área foliar afectada debe estimarse visualmente el área total cubierta por todos los síntomas de la enfermedad en cada hoja y calcular el porcentaje de la hoja cubierto por los síntomas. Para esto es necesario contar con un patrón o modelo que divide la hoja en proporciones porcentuales.

Figura 2. Escala de Stover modificada por Gauhl (1989)

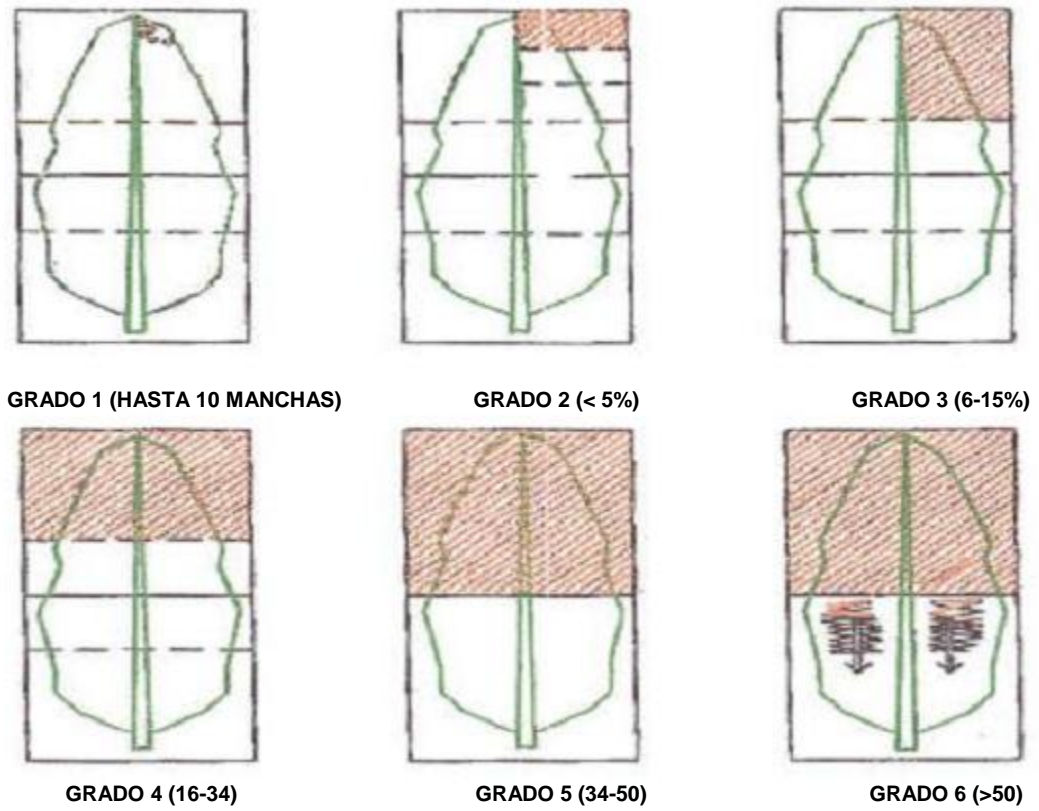
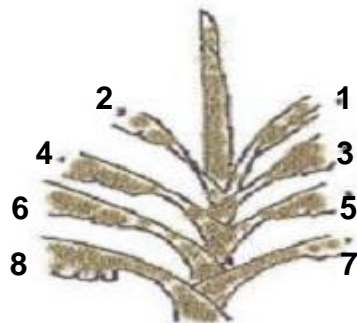


Figura 3. Conteo de hojas en la evaluación de incidencia en Sigatoka Negra



3.1.5 Ciclo de la enfermedad

La sigatoka negra es considerada una enfermedad policíclica por la característica que tiene el hongo de reproducirse repetitivamente durante el curso de la epidemia, es decir, por presentar una secuencia sin fin de infección, colonización, esporulación y dispersión y, además, porque en él existe una infección ramificada dado que produce dos tipos de esporas diferentes aunque ellas no ocurran, necesariamente, en forma alterna o equitativa (Belalcázar, 1991; Patiño y Mejía, 1991, citados por Consuegra y Lorenzo, 2003)

Como se ilustra en la figura 4, el ciclo de vida de *M. fijiensis* se inicia con la deposición de las esporas, ya sean ascosporas o conidios, sobre las hojas libres de la enfermedad o sobre las ya afectadas. Los procesos de germinación y penetración del inóculo solo ocurren cuando hay condiciones favorables con humedad relativa de 90 a 100%, temperaturas de 26 a 28°C y, sobre todo presencia de agua libre sobre las hojas. Bajo tales condiciones, las esporas germinan en un período de 2 a 6 horas, formando tubos germinativos que se extienden y ramifican en busca de las estomas. De este modo, se inicia el proceso de penetración que tarda de 2 a 3 días si las condiciones de humedad relativa, temperatura y mojadura foliar son las adecuadas (Belalcázar et al, 1991; Merchán, 2000; Patiño y Mejía, 1999; Ploetz et al, 1994; Sierra, 1993).

Las ascosporas o esporas de origen sexual se desarrollan en el interior de cuerpos fructíferos conocidos como ascócarpos o seudotecios y se desprenden de las lesiones en estadio 5 y 6, según la escala de Fouré, mientras que las conidias o esporas de origen asexual se producen sobre los conidióforos y se desprenden desde el estadio 2 hasta el 6, según la escala de Fouré.

Las conidias se desprenden del conidióforo, por acción de agentes ambientales como el agua y el viento (AUGURA - Cenibanano, 2007; Merchán, 2000 citado por Aislant y Gámez, 2004).

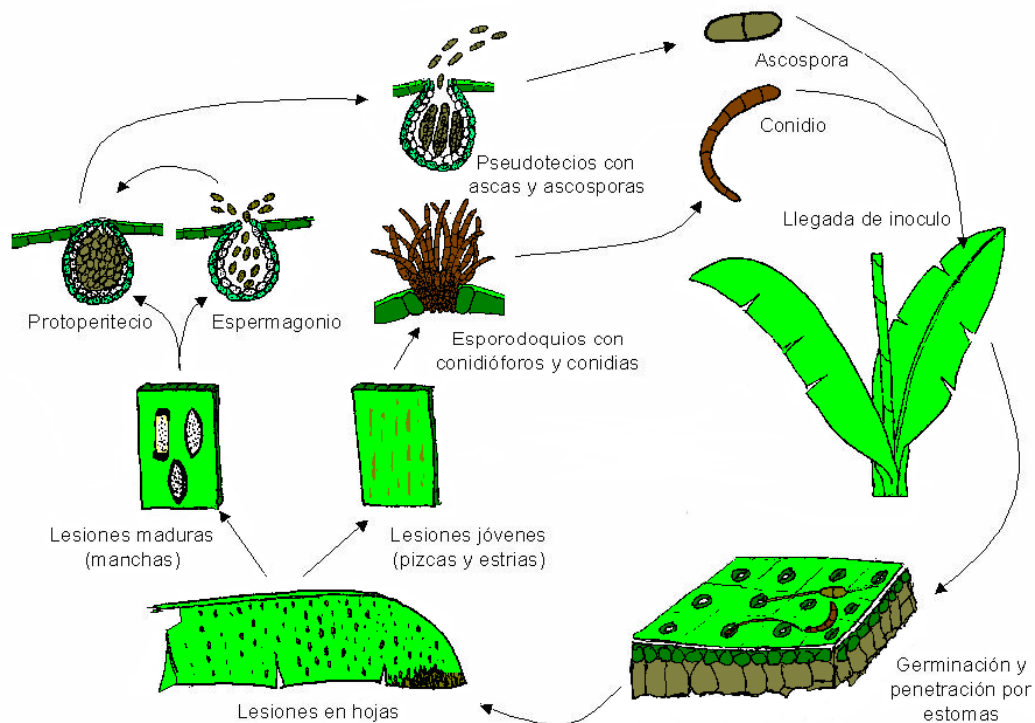


Figura 4. Ciclo de vida de *M. fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra del banano.

Se ha observado que bajo condiciones óptimas en la región bananera de Urabá el período de incubación, definido como el tiempo que transcurre entre la y la aparición de la primera pizca o primer síntoma de la enfermedad, puede llegar a ser de 17 días en el cultivo de banano y los primeros conidios se pueden formar a

los 28 días (Merchán, 2000; Patiño y Mejía, 1999). El período de latencia asexual para *Sigatoka* negra, está definido como el tiempo que transcurre entre la penetración del inóculo y la emisión de conidias, es decir, cuando se observa estado 5 según la escala de Fouré y el período de latencia sexual es considerado como el tiempo que transcurre entre la penetración del inóculo y la formación de las primeras manchas del estado 5 según Fouré, momento en el que comienza la producción de seudotecios y se inicia la liberación o expulsión de las ascosporas (Hoyos, *et al.*, 2006). En banano, el ciclo total de la enfermedad puede tomar de 23 a 70 días; sin embargo, lo normal es que se cumpla en un lapso de 35 a 50 días después de la infección (Sierra, 1993).

La duración del ciclo de la enfermedad está estrechamente ligado a las condiciones ambientales, a la variabilidad del patógeno y al estado fisiológico y grado de nutrición de la planta; sin embargo, la virulencia del patógeno unida a la concentración de ascosporas y de conidios son determinantes tanto para la intensidad de la infección como para la evolución de cada uno de los estados de la enfermedad (Patiño, 2002).

La *Sigatoka* negra se caracteriza por presentar, durante el año, diferentes grados de severidad lo que está en función de las condiciones ambientales, pudiendo alcanzar niveles epidémicos que ocasionan graves daños sobre las plantas y pérdidas sobre el rendimiento e incluso llegar a causar la muerte de las plantas afectadas (Patiño, 2002).

Algunas investigaciones realizadas para estudiar el efecto de las ambientales sobre el desarrollo de la *Sigatoka* negra revelan que, en épocas de invierno, el ciclo de la enfermedad se acorta, alcanzando niveles epidémicos que ocasionan

daños muy severos al follaje y pérdidas considerables sobre el rendimiento anual (Patiño y Mejía, 1999). De igual forma se ha encontrado que, en épocas secas, el ciclo de la enfermedad se alarga notablemente; en consecuencia, se registran los menores niveles de severidad y de daños a la producción (Patiño, 2002).

En Urabá, la curva de severidad muestra una relación directa con los niveles de precipitación, mostrando en las primeras semanas del año niveles relativamente altos de infección, como resultado de las altas infecciones que ocurrieron a finales del año, posteriormente con el descenso en las lluvias cae el nivel de severidad hasta el inicio de las lluvias en abril, momento a partir del cual se incrementa la severidad casi en forma progresiva hasta las últimas semanas, producto del incremento también progresivo de la precipitación (Chica *et al.*, 2004). Los modelos de infección han determinado que el progresivo desarrollo de la infección, puede llegar a causar pérdidas de hasta el 100% del área foliar sana (Chica *et al.*, 2004).

3.1.6 Epidemiología

M. fijiensis tiene una reproducción sexual y otra asexual, lo que dificulta su manejo, dándole al patógeno una mayor capacidad de producir epidemias. En la fase sexual la producción de conidios es mayor cuando la enfermedad atraviesa los estadios tres y cuatro, sobre todo durante los periodos de mayor pluviosidad (Merchán, 1998).

El transporte de conidios por el viento es 100 veces menos que la cantidad de ascosporas. Las esporas son la fuente de inóculo más importantes ya que se transportan a largas distancias por el viento. Los conidióforos se presentan de manera continua hasta el segundo estadio de la mancha. En el centro de la mancha están los primeros conidióforos que dejan de producir conidios. Estos conidióforos salen uno a uno o en grupos de dos a ocho por las estomas del envés de la hoja (Stover y Simmonds, 1987).

La lluvia, el rocío y la temperatura juegan un papel importante en el desarrollo y diseminación del inóculo de la enfermedad. El tiempo seco, con temperaturas nocturnas inferiores a 20°C, disminuye el desarrollo de la enfermedad, aunque parece ser que este patógeno es menos sensible a las bajas temperaturas, cuando las lluvias son abundantes. En general, una rápida propagación y alta infección son favorecidas por el tiempo caluroso, lluvioso y con alta humedad en el ambiente (González, 1987).

La Sigatoka negra presenta una dinámica estacional, determinadas por las variaciones de temperatura y pluviometría a lo largo del año (Pérez 1998), zonas con mayor severidad de la enfermedad están caracterizadas por precipitaciones de más de 1400 mm año y humedades relativas por encima del 80% (Martínez et al. 1998). La germinación y el crecimiento de las esporas es óptimo cuando existe una película de agua sobre la hoja, también la producción de peritecios y la descarga de ascosporas comienza entre 10 y 15 minutos después de iniciado el humedecimiento de los tejidos y termina una hora después (Pérez, 1998).

La humedad relativa es importante en proveer las condiciones las condiciones hídricas necesarias para la germinación de las esporas y el desarrollo de la infección. El viento es el factor que permite la dispersión de las esporas del patógeno, una vez que éstas han sido liberadas. Se han encontrado también correlaciones con otros factores del clima como la evapotranspiración y la duración de la humedad foliar, con el desarrollo de las infecciones (Marín y Romero, 1992).

La liberación de conidios, es primordialmente efectuada por el agua en forma de rocío y por el viento, aunque una alta frecuencia de dispersión se presenta mediante el efecto conjunto de estos dos factores. Gotas de lluvia que se deslizan sobre las hojas arrastran conidios a áreas, plantas y hojas, ubicadas en sitios inferiores al lugar de lesión. Estas gotas, cargadas de conidios, eventualmente son impactadas por nuevas gotas de lluvia que logran impulsar micro-gotas ascendentes que se depositan finalmente en áreas superiores de la planta o logran ser liberadas al ambiente para su diseminación eólica.

3.2 METODOS DE CONTROL DE LA SIGATOKA NEGRA

La Sigatoka negra se maneja, principalmente, a través del control químico. También se utilizan las prácticas culturales tendientes a la reducción del inóculo, el control genético y en la última década, se han investigado métodos de control biológico mediante el empleo de sustratos, antagonistas y enmiendas orgánicas (Ramírez y Rodríguez, 1988; Arango, 2000). Recientemente, se han incorporado como otros métodos alternativos de control a la enfermedad, ciertas moléculas inductoras de resistencia de la familia del Acibenzolar (Actigard) (Patiño, 2001). Estos últimos métodos de control aun se encuentran en fase experimental y

requiere de más investigación, antes de ser incorporados en programas de Manejo Integrado del Cultivo.

3.2.1 Prácticas culturales

Estas prácticas están dirigidas principalmente a reducir la fuente de inóculo del patógeno y siempre están integradas o forman parte de un programa de manejo integrado de la enfermedad. El establecimiento de un buen sistema de drenaje es muy recomendado ya que permite reducir los niveles de humedad en el suelo y microclima dentro de la plantación, reduciendo en cierto grado, las condiciones favorables para el establecimiento de la enfermedad.

La deshoja fitosanitaria, reduce la fuente de inóculo interna en una plantación. Sin embargo, la institución y supervisión debe ser constante y rigurosa para no causar un daño mayor a la plantación. Cuando la infección se encuentra localizada se recomienda cortar solo la parte afectada (“despunte”) o sacrificar solo algunas áreas de la hoja afectada (“cirugía”); pero, cuando la infección se encuentra distribuida, es conveniente eliminar toda la hoja.

En ocasiones, los hijos pueden mostrar infecciones fuertes, por lo que se recurre a cortar esas hojas. Esta labor se completa con la eliminación de las hojas agobiadas (Corrales y Marín, 1992).

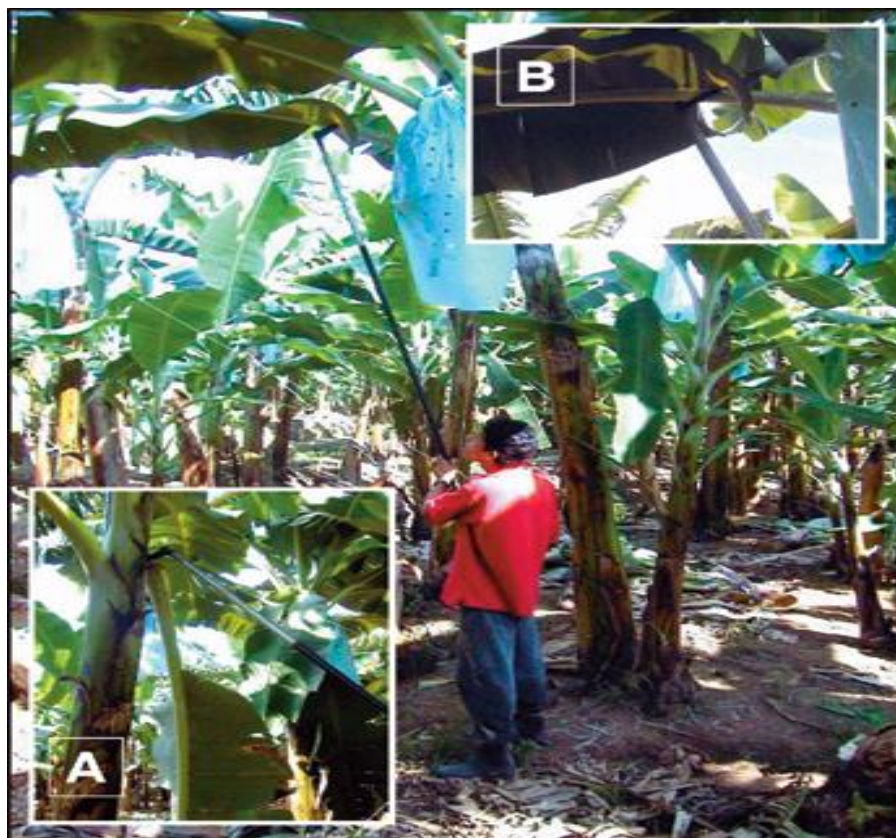


Foto 4.Reducción de inóculo en campo por remoción del tejido enfermo.
A. Deshoje. B. Remoción de ápices con cirugía.

3.2.2 Mejoramiento genético

La Sigatoka negra se favorece por la alta susceptibilidad de los principales clones de banano utilizados en explotaciones comerciales para la explotación (Gran Enano y Valery, Musa AAA), lo que dificulta sustancialmente el manejo del problema. Por ello, la resistencia genética es una de las mejores alternativas para su control. Sin embargo, la obtención de materiales resistentes a la Sigatoka negra

con características de rendimiento y calidad aceptables, es difícil y lento (Guzmán y Romero, 1996).

Se puede afirmar que los programas existentes de fitomejoramiento de banano y/o plátano o banano de cocción, tiene en general un macro objetivo: el desarrollo de cultivares resistentes a enfermedades y plagas, tales como Sigatoka (negra y amarilla), Mal de panamá, Moko o Marchitez bacteria, nematodos, picudo, entre los más importantes. A esto se le agregan las características agronómicas deseables (tamaño y conformación de los dedos) y calidad de la fruta. Además, la reducción del tamaño de la planta (especialmente en plátano), disminución del ciclo del cultivo y el aumento en la producción. La Sigatoka negra fue también la principal justificación para la creación de la red Internacional para Mejoramiento del Banano y el plátano (INIBAP) quien desde 1984 empezó a reposicionar a nivel mundial la importancia de los bananos en general, pero muy particularmente la de los plátanos y bananos de cocción que son alimento importante en África, Asia y América Latina. (Rosales y Poca sangré, 2002).

3.2.3 Control biológico

Los fungicidas tienen un elevado costo para el agricultor, y viene perdiendo su eficacia debido al fenómeno de resistencia. Por otra parte, existe una demanda creciente de los consumidores por una fruta de banano o plátano más libre del uso de plaguicidas. La filosofía de los sustratos foliares para controlar enfermedades en los cultivos, es coherente con los principios de la agricultura sostenible, pues se basa en favorecer nutricionalmente, de manera selectiva, a las poblaciones epifitas de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas con potencial biorregulador

sobre el patógeno y presentes de manera natural en los ecosistemas de las plantas cultivadas.

Una determinación parcial de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas epifitas aisladas de la filosfera de plantaciones comerciales de banano y plátano en Costa Rica y Urabá, Colombia, evidenciaron la presencia de bacterias con potencial biorregulador contra *M. fijiensis* en el área de la infección. Los principales grupos de bacterias encontradas, fueron en un 73% Bacilos Gram negativos, 13% bacilos Gram positivos y 6% cocos Gram positivos, los cuales mostraron habilidad de producir quitinasas y glucanasas en medios de crecimiento selectivos con quitina o glucano, respectivamente, como única fuente de carbono, en periodos inferiores a 48 h de incubación. Esta capacidad lítica puede permitir a las bacterias actuar sobre la quitina y glucanos presentes en la pared celular de las ascosporas del hongo, antes de que penetren en el estoma, pues se ha observado que transcurren al menos 48 h entre la llegada de las ascosporas a la hoja y el inicio del proceso de penetración en el estoma.

3.2.4 Control químico

Según Cordero y González (1988), en los países donde se ha presentado la Sigatoka negra, el control químico se ha realizado utilizando fungicidas protectantes, sistémicos, sistémicos locales y aplicando mezclas de fungicidas sistémicos y protectantes. Estos productos son aplicados por medio de fumigaciones aéreas en avionetas.



Foto 5. Aplicación aérea de fungicidas

3.2.4.1 Protectantes

Los fungicidas protectantes tienen como función básica la de prevención. La planta es tratada con el producto y estas moléculas no entran a su interior, lo que hace que el hongo al ponerse en contacto con el ingrediente activo del fungicida no se desarrolle y por lo tanto, no penetre en la célula del tejido foliar (Cordero y González 1988). Los fungicidas protectantes son recomendados cuando la infección es baja esto sucede en épocas secas; además tienen la desventaja de ser lavados por las lluvias.

El modo de acción de estos fungicidas no es específico, actúan en muchos sitios dentro de las células del hongo, por lo que la probabilidad de obtener resistencia a estos fungicidas es bastante baja. Dentro de este tipo de fungicida están los pertenecientes a los grupos químicos de los ditiocarbamatos como el mancozeb y el clorotalonil que es otro tipo de fungicida (Marín y Romero 1992).

3.2.4.2 Sistémicos

Los fungicidas sistémicos tienen la capacidad de penetrar los tejidos y de ser movilizados a otras partes de la planta. Cuenta con un modo de acción específico. Esto hace que no se deban utilizar en forma continua y prolongada para evitar la tolerancia del hongo hacia estos fungicidas. Se recomienda su uso cuando la presión de infección es alta, 50% de severidad. Tiene la ventaja de no ser lavado por la lluvia, lo que permite reducir el número de tratamientos anuales. Además son compatibles con soluciones aceitosas y acuosas que son empleadas como adyuvantes (Cordero y González 1988).

Se cuenta con tres tipos de familias pertenecientes a este grupo: los Benzimidazoles, los Triazoles y Estrobilurinas. Los Benzimidazoles actúan en la tubulina de las células, proteína que se encuentra en el citoplasma y es de vital importancia para la formación del huso acromático, por lo tanto es un inhibidor de la mitosis. El fungicida más utilizado de este grupo es el Benomil. El modo de acción de los Triazoles es inhibir el citocromo P-450 de la enzima mono oxigenada, que cataliza la reacción de demetilación del C-14 en la senda de biosíntesis del ergosterol.

Son llamados Demethyl inhibitors por que inhiben el proceso de metilación, (Marín y Romero 1992). En 1987, el propiconazole era el primer fungicida DMI registrado para uso registrado en el plátano en América Central. Debido a su alta eficacia contra *M. fijiensis*. Otros triazoles registrados para uso en banano son Fusilazole (registrado en Europa, pero no en Estados Unidos); fenbuconazole, bitertanol,

tebuconazole, hexaconazole y cyproconazole. Hay diferencias en la eficacia de estos componentes y en su movimiento sistémico dentro de la hoja. Los fungicidas inhibidores de la biosíntesis del ergosterol, son la base de los programas de combate de la Sigatoka negra en la mayoría de los países donde la enfermedad está presente. Los fungicidas de este tipo más comúnmente utilizados son, el ya mencionado propiconazole y más recientemente el bitertanol (Guzmán y Romero, 1996).

La resistencia a los fungicidas de modo de acción específica como el Benomil y el propiconazole, es uno de los factores que más influyen en las dificultades de controlar efectivamente la enfermedad en el cultivo de banano. Estudios recientes han demostrado la existencia de una alta frecuencia de aislamiento de *M. fijiensis* resistentes a los fungicidas Benomil y propiconazole en las plantaciones de Costa Rica (Calvo y Romero, 1996).

Los fungicidas sistémicos del grupo de Estrobilurinas presentan las sustancias químicas más nuevas registradas para el uso contra Sigatoka negra. Estos compuestos se encuentran en forma natural y son producidos por ciertas especies de hongos que descomponen la madera con el fin de eliminar a otros hongos con ellos por nutrientes.

Las Estrobilurinas A y B SON metabolitos fúngicos secundarios aislados del hongo del género *Strobilurus*; especialmente de las especies *tenacellus* (De Lange et al, 1993). Estos compuestos impiden la respiración mitocondrial, bloqueando el

transporte de electrones en la posición complejo citocromo y frenando así la síntesis de ATP (Clough et al, 1994). En 1996, azoxystrobina era la primer estrobilurina registrada para el uso en plátano en América Central (Guzmán y Romero, 1996)

3.2.4.3 Sistémicos locales

Los fungicidas sistémicos locales es un grupo intermedio de fungicidas, los cuales penetran en las hojas pero no se traslocan al resto de la planta. El Tridemorph es el único fungicida utilizado en banano, que se incluye en este grupo.

Pertenece a la familia química de las morfolinas, cuyo modo de acción se encuentra entre los inhibidores de la biosíntesis del ergosterol que es un componente importante de la membrana de la célula en hongos, interfiriendo con el esterol reductasa. Actúa en dos etapas diferentes en la biosíntesis de los ergosteroles, por lo que la generación de cepas resistentes a este fungicida es menos probable. Posee la ventaja de que no se ha encontrado resistencia cruzada a los triazoles, lo que permite que pueda ser empleado en la rotación de fungicidas de modo de acción distintos (Marín y Romero, 1992).

Tabla 1. Fungicidas utilizados en el control de Sigatoka negra

Acción	Ingrediente activo	Nombre comercial	Periodo de reentrada
PROTECTANTE	Clorotalonil	Odeon 720 SC	Al secarse el producto
		Bravonil 720 SC	Al secarse el producto
	Mancozeb	Dhitane 60 OF	Al secarse el producto
		Dhitane FW-MB	Al secarse el producto
		Manzate 200 WG	Al secarse el producto
	Profizeb 80% WP	2 Horas	
SISTEMICO	Epoxiconazol	Opus 7.5	Al secarse el producto
	Propiconazol	Tilt 250 EC	Al secarse el producto
		Bumper 25 EC	Al secarse el producto
	Difeconazol	Sico 250 EC	Al secarse el producto
	Tebuconazol	Atlas 25 EW	0 Días
	Bitertanol	Baycor DC 300	2 Horas
	Azoxystrobim metil	Bankit25 SC	Al secarse el producto
	Pyraclostrobin	Regnum EC	Al secarse el producto
Trifloxystrobin	Tega EC 0.75	2 Horas	
SISTEMICOS LOCALES	Fenpropimorf	Volley 88 OL	Al secarse el producto
	Tridemof	Calixin 86 OL	Al secarse el producto
	Spiroxamina	Impulse EC	2 Horas
	Pirymethanil	Siganex 60 SC	2 Horas

3.3 RESISTENCIA A FUNGICIDAS

Los fungicidas han sido usados por alrededor de 210 años para proteger las plantas contra enfermedades causadas por hongos. El comienzo de la larga escala de aplicaciones de fungicidas para el combate de enfermedades fungosas está marcado por la mezcla de preparación artesanal de caldos bordéles elaborada por Millardet en 1883. Esta preparación contenía, una mezcla de sulfato de cobre y cal, que permaneció como el fungicida más utilizado por más de 50

años y que en algunos programas de Manejo Integrado de Cultivo se sigue utilizando. (Dekker, 1982).

La aparición repentina de la resistencia en una población de patógeno puede, cuando no se reconoce en una etapa temprana, tener como resultado el fracaso del control de la enfermedad y, consecuentemente, graves pérdidas de la cosecha. Dekker (1982) define la resistencia a fungicidas como el cambio hereditario de una célula fungosa o una población de un hongo a un fungicida, lo que resulta en una sensibilidad menor de lo normal hacia éste.

El uso comercial de fungicidas durante algunos años, puede generar poblaciones de patógeno blancos que no son lo suficientemente sensibles para ser controlados adecuadamente. Ellos aparecen generalmente, como una respuesta al uso repetitivo del fungicida o al uso de otros fungicidas químicamente relacionados o con un mecanismo bioquímico de acción fúngico similar.

Las poblaciones del patógeno que desarrollan la resistencia a un fungicida pueden llegar a ser simultáneamente y automáticamente resistentes a otros fungicidas que son afectados por la misma mutación del gen siguiendo el mismo mecanismo de la resistencia (Brent, 1995). Igualmente, que con la introducción de los fungicidas sistémicos, la incidencia de la resistencia creció y el tiempo de aparición de esta es a menudo relativamente corto, 2-3 años después de la primera aplicación, con el agravante de que esta resistencia es heredable

3.4 USO DE LA QUITINA PARA EL CONTROL DE ENFERMEDADES FOLIARES

La quitina es el compuesto orgánico que más abunda en el planeta después de la celulosa, y cumple misiones semejantes de protección y resistencia en animales inferiores y hongos. (Herrera, 1993)

Es un polisacárido versátil formado por el azúcar N-acetilglucosamina, unida mediante enlaces, que se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, aunque en el lugar que posiblemente más abundan es el océano, siendo producida por muchos organismos marinos incluyendo zooplancton y muchas especies de fitoplancton. Los quitosanos son polímeros naturales similares a la quitina en los cuales, tal vez solamente el 30% de las moléculas de glucosamina se encuentran acetiladas. Las cadenas de quitina de más de seis o siete monómeros son insolubles; las cadenas pueden comprimir muchos miles de monómeros. Las formas rígidas y extendidas de las moléculas son una consecuencia de los enlaces que generan una disposición en Zig-Zag entre los puentes de oxígeno vecinos. Las moléculas planas, similares a un listón, empaçadas en un orden paralelo, se mantienen juntas mediante puentes de hidrógeno.

La quitina constituye uno de los polisacáridos más insolubles que existen, lo que explica la dificultad que implica determinar el tamaño de sus cadenas poliméricas. Las bacterias carecen de ella, entre los protozoos, muchos ciliados utilizan la quitina para construir estructuras protectoras (lòrigas) a semejanza de los corales:

múltiples amebas, todas las parásitas de animales forman quistes de quitina, este polisacárido lo hallamos en las colonias (Herrera-Ruiz, 1993).

Está presente en algas, como en las diatomeas y los crisoflagelados. En los hongos con excepción de los oomicetos, ese polisacárido se erige en el principal compuesto del armazón de pared celular (Herrera-Ruiz, 1990).

Al ser la quitina un polímero tan insoluble, a lo largo de los tiempos se han desarrollado diferentes metodologías para lograr su obtención en materias más pequeñas y fáciles de utilizar por los microorganismos degradadores en el ambiente.

3.4.1 Microorganismos quitinolíticos

Siendo la quitina el segundo compuesto más abundante en la naturaleza se puede deducir que la tendencia evolutiva de la misma ha dotado a cientos de microorganismos con la capacidad y la maquinaria enzimática para aprovechar de alguna manera ésta fuente de energía. La capacidad de degradar quitina se encuentra ampliamente diseminada entre varios grupos taxonómicos de procariontes incluyendo bacterias como *Vibrio sp*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio furnissii*, *Photobactrium sp*, *enterobacterias*, *Streptomyces lividans*, *Streptomyces griseus*, *Streptomyces olivaceoviridis*, *Serratia marcescens*, *Serratia. Liquefaciens*, *clostridios* y *Arqueobacterias*. Las bacterias emplean una gran cantidad de proteínas, incluyendo proteínas ligadoras de quitina para degradar este compuesto, pero la hidrólisis mediante quitinasas es el paso clave para la solubilización y mineralización de la quitina (San-Lang et al 2001).

3.5 USO DE GLUCANO PARA EL MANEJO DE ENFERMEDADES FOLIARES

El glucano es un polisacárido de cadena larga, con enlaces glicosídicos beta (Clarke y Stone, 1962). Este es un componente estructural de las plantas de la Familia Poaceae (Nevins *et al*, 1987; McNeil *et al* 1984; Stinard y Nevins, 1980) y uno de los principales constituyentes de la pared celular de muchos hongos fitopatógenos (Mauch *et al*, 1984; Broglie *et al*, 1994)

Dentro de las propiedades nutricionales y promotoras de la buena salud que presenta el glucano, se destaca su efecto dañino en la dieta de animales monogástricos al decrecer su tasa de crecimiento y su eficiencia de conversión alimenticia. Sin embargo, los efectos del glucano en la dieta humana son beneficiosos al reducir los niveles de colesterol y los niveles de glucosa en la sangre (Klopfenstein, 1988; Davison *et al*, 1991)

3.5.1 El uso de glucano como sustrato y como activador de las barreras defensivas de la planta

El uso de sustratos como agentes de enmienda foliar para modificar las condiciones nutricionales de la filosfera y favorecer el crecimiento y las diferentes actividades de los microorganismos biocontroladores ha sido bastante investigado en los últimos años.

La aplicación de sustratos como azúcares (El Ghaouth *et al*, 1995), leche (Okumoto y Bustamante, 1993; Ruiz, 1995), melaza (Ruiz, 1995), almidón de yuca (Calvo y Vargas, 1989), quitina (Okumoto y Bustamante, 1993; González, 1996), quitosán (Benhamou *et al*, 1994) y algunos otros; se ha estudiado con el objetivo de promover el crecimiento selectivo de antagonistas específicos, mejorar la efectividad de estos o activar mecanismos de defensa de las plantas.

El glucano es un componente principal de la pared celular de una gran cantidad de hongos fitopatógenos, lo cual sugiere la posibilidad de implementar el uso de sustratos con base en glucano para incrementar las poblaciones de microorganismos antagonistas glucanoófitos, capaces de habitar y colonizar el nicho ecológico del patógeno y reducir su incidencia y daño.

El uso de los glucanos como agentes de enmienda foliar, sin embargo, ha sido muy poco estudiado. Una de las principales limitantes para llevar a cabo este tipo de investigación en nuestro medio es la falta de información relacionada con la disponibilidad de productos o subproductos que posean cantidades apreciables de glucano, así como sobre los métodos adecuados de extracción y cuantificación del mismo.

Varias técnicas de extracción y de cuantificación han sido desarrolladas para la determinación de glucanos a partir de cereales como la cebada y la avena (Zygmunt and Paisley, 1993; Wood and Weisz, 1984; Mc Cleary and Glennie-Holmes, 1985; Welch and Lloyd, 1989; Carr *et al*, 1990; Dawkins and Nnanna,

1993) y de algunas bebidas alcohólicas (Mc Cleary and Nurthen, 1986). Sin embargo, los dos primeros materiales no están disponibles en nuestro medio, mientras que la utilización de una bebida alcohólica como fuente de glucano implicaría un costo muy elevado.

Hasta el momento no se ha documentado el uso de glucano como sustratos para promover el crecimiento y desarrollo de las poblaciones de microorganismos glucanolíticos presentes en la filosfera, mejorar su actividad antagónica a patógenos o su habilidad para persistir en la superficie foliar. Sin embargo, si se ha documentado el papel de una serie de compuestos bióticos, entre ellos los glucanos, como inductores de fitoalexinas en la planta y además como inductores de resistencia a enfermedades.

Las enzimas glucanasas son consideradas como componente de un mecanismo general de defensas contra patógenos en varias especies de plantas, pudiendo actuar sinérgicamente con las quitinasas (Dumas-Gaudot *et al*, 1992).

Estas enzimas están presentes en las paredes celulares de las plantas y son las responsables de la liberación de los glucanos componentes estructurales del micelio de hongos fitopatógenos que tratan de penetrar dichas paredes.

El grado de degradación del micelio depende de la actividad de dichas enzimas y podría producir una serie de glucanos de diferente peso molecular, siendo más

fácil para la planta tomar aquellos de menor peso molecular a través de la cutícula; toda vez que los receptores adecuados se encuentren presentes. Los glucanos aplicados exógenamente como un protector de la planta pueden similarmente ser modificado por las glucanasas presentes en la pared celular de las plantas y estimular las mismas respuestas defensivas contra patógenos (Lyon, 1995).

Los glucanos, al igual que otros activadores de las barreras defensivas de la planta, son asociados con genes menores o resistencia horizontal, por lo que es poco probable que los patógenos desarrollen resistencia a dichos compuestos. Estos no tienen actividad antimicrobial directa o no tiene ningún efecto conocidos sobre otros organismos que no sean las plantas. Su efecto sobre otros organismos y sobre el medio ambiente es entonces, en general, benigno. En consecuencia, una de las grandes ventajas de su utilización es que podrían ser usados juntos como otro método de control biológico (Lyon, 1995).

El uso de sustratos activadores de mecanismos de defensa es hoy en día una alternativa al uso indiscriminado de productos químicos sintéticos, aun y cuando por el momento, aquellos son menos eficaces. Estos compuestos podrían ser utilizados en mezcla con los productos químicos, logrado así reducir la cantidad que de estos se aplica a los cultivos y al medio ambiente; o podrían ser aplicados juntos como compuestos antimicrobiales de ocurrencia natural para mejorar su efectividad en la reducción de las enfermedades (Lyon, 1995).

3.6 ASPECTOS DE LA FILOSFERA

3.6.1 El medio ambiente de la filosfera

Existen muchas evidencias que demuestran que el control biológico natural provee protección contra un gran número de enfermedades foliares en el campo. La superficie de las partes aéreas de las planta proveen un hábitat para el desarrollo de un gran número de microorganismos, muchos de los cuales son capaces de influenciar el crecimiento de microorganismos patógenos. Estos microorganismos epífitos juegan un papel muy importante en la reducción de la incidencia de enfermedades foliares de cultivos en el campo (Blakeman y Fokkema, 1982).

El efecto antagónico de microorganismos foliares sobre organismos patógenos, depende en gran medida de las condiciones climatológicas y químicas prevalecientes en el microhabitat en el cual se encuentran ambos organismos. Este microhabitat especializado, usualmente llamado filosfera, tiende a mantener un balance biológico natural entre los organismos saprófitos o epífitos y los patógenos (Blakeman y Fokkema, 1982).

Según Windels y Lindow (1985), el control biológico de patógenos de la filosfera se ve limitada debido a que las interacciones bióticas y las condiciones abióticas en dicho microhabitat son complejas y difíciles de regular.

La filosfera se caracteriza porque las condiciones ambientales en la superficie de las hojas fluctúan mucho más rápido en relación a lo que ocurre en la rizosfera. La variación de la temperatura dentro de una misma planta o en la superficie de una misma hoja y la variación entre las temperaturas diurnas y nocturnas son eventos normales y propios de la filosfera (Blakeman, 1985). Según Hirano y Upper (1983), la filosfera ha sido frecuentemente vista como un ambiente hostil ya que sus habitantes están expuestos a fluctuaciones extremas de temperatura, a la radiación visible y ultravioleta y a periodos de desecación.

La humedad relativa es el factor de mayor influencia en el crecimiento y sobrevivencia de los microorganismos en la filosfera. Diferencias de humedad dentro de la superficie de las hojas y el aire circundante son el resultado de su continua transpiración; un proceso determinado por el espesor de la capa límite y la apertura estomática (Blakeman, 1985). La provisión irregular de humedad en la superficie de las hojas resulta en un crecimiento intermitente de los microorganismos, particularmente bacterias hongos filamentosos, presentándose problemas de sobrevivencia durante periodos de sequía (Blakeman y Fokkema, 1982).

Por otro lado, la formación de rocío y la precipitación son elementos de mucha importancia en el crecimiento de los microorganismos foliares, ya que ambos contribuyen a mantener la superficie foliar mojada y a una alta humedad relativa. La presencia de sustancias químicas hidrofóbicas en la superficie de las hojas y las regosidades de este también influyen en la retención y distribución del agua en la superficie foliar (Blakeman, 1985).

La disponibilidad de nutriente en el área foliar tiene una marcada influencia en las poblaciones de microorganismos epífitos. En etapas tempranas del desarrollo vegetal, estos microorganismos obtienen sus nutrientes principalmente a partir del contenido celular que escapa de los tejidos foliares. Durante este periodo la disponibilidad de nutrientes es limitada, por lo que la población microbiana, compuesta principalmente por bacterias, es baja. En etapas más avanzadas, otros componentes foráneos como el polen y secreciones de áfidos se encuentran disponibles y es cuando las poblaciones microbianas se incrementan (Blakeman y Fokkema, 1982).

Otros materiales que llegan a la superficie foliar y que proveen nutrientes para la microflora epífita incluyen restos de suelos y partículas de polvo, sustancias liberadas a partir de esporas de hongos (incluyendo carbohidratos y aminoácidos) y metabolitos microbiales extracelulares. De igual manera, las ceras de la cutícula so utilizadas por algunas levaduras epífitas (Morris y Rouse, 1985).

De las numerosas sustancias orgánicas e inorgánicas presentes en la superficie de la hoja, incluyendo aminoácidos esenciales, monosacáridos, polisacáridos, ácidos orgánicos y numerosos macronutrientes y micronutrientes, una cantidad considerable es perdida debido al efecto de lavado producido por la lluvia, el rocío, la neblina y la bruma (Blakeman y Fokkema, 1982; Hirano y Upper, 1983).

3.7 CONTROL BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES CAUSADAS POR HONGOS FITOPATÓGENOS

La regulación biológica para patógenos foliares puede ser una alternativa complementaria del control integrado de enfermedades, la cual frecuentemente involucra la aplicación del microorganismo antagonista sobre la superficie de la hoja (Spurr 1981, Blakeman y Fokkema 1982). Sin embargo, el éxito de dicho antagonista depende de su capacidad para establecerse como miembro de la microbiota epifita -especialmente cuando se requiere disminuir el inóculo del patógeno- (Spurr 1981, Blakeman y Fokkema 1982). Por tal motivo, el uso de antagonistas microbianos aislados de la microbiota epifita debería preferirse al uso de antagonistas aislados de otros ambientes, pues los primeros se encuentran adaptados a las condiciones que determinan el hábitat en la superficie de la hoja (Blakeman y Fokkema 1982, Andrews 1992).

Dentro de la regulación biológica de fitopatógenos, una de las estrategias consiste en el uso de microorganismos antagonistas productores de sustancias antibióticas y/o enzimas líticas que actúen sobre sus esporas o tubos germinativos -en su fase epifita de crecimiento- (Andrews 1992, Elad *et al.* 2002). Por ejemplo, el de microorganismos productores de quitinasas y/o glucanasas en la regulación de hongos basidiomicetos y ascomicetos ha demostrado ser de utilidad, pues la pared celular de dichos hongos está constituida principalmente por microfibrillas de quitina y β -glucanos -hecho que los hace sensibles al ataque de estas enzimas, especialmente a nivel de la hifa (Sahai y Manocha 1993, Alexopoulos *et al.* 1996, Mahadevan y Crawford 1997, Cohen-Kupiec y Chet 1998). Esta bioregulación mediante el uso de bacterias líticas antagonistas, ha sido estudiada con diversos

fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, *Phytophthora capsici*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*, *Bipolaris sorokiniana* y *Pseudomonas syringae* pv. *Tomate*, entre otros (Chernin *et al.* 1995, Valois *et al.* 1996, Ordentlich, Elad y Chet 1998, Sing *et al.* 1999, Zhang y Yuen 2000, Parra y Ramírez 2002, Ji y Wilson 2003, Sid Ahmed *et al.* 2003).

Una cepa de *Serratia marcescens* aislada de suelo, resultó ser un agente bioregulador efectivo contra *Sclerotium rolfsii* y *Rhizoctonia solani*, bajo condiciones de invernadero. La actividad antagónica de la cepa, se relacionó con la producción y liberación de enzimas quitinolíticas (Ordentlich, Elad y Chet 1998).

Chernin *et al.* (1995), reportaron que tres cepas quitinolíticas de *Enterobacter agglomerans* -aisladas de suelo-, lograron disminuir la incidencia de *Rhizoctonia solani* en algodón, en un 64 a 86%, bajo condiciones de invernadero; mientras que dos mutantes Tn5 de una de las cepas, las cuales no evidenciaron actividad quitinolítica, fueron incapaces de proteger a las plantas contra la enfermedad.

Mahadevan y Crawford (1997), determinaron que la actividad quitinolítica de la cepa *Streptomyces lydicus* WYEC108, aislada de suelo, está relacionada con las propiedades antifúngicas de la bacteria.

Singh *et al* (1998), demostraron que la combinación de dos cepas bacterianas aisladas de suelo, *Paenibacillus* sp. 300 y *Streptomyces* sp. 385, suprimieron el daño producido por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* a una planta de pepino cohombro (*Cucumis sativus*). Tal actividad supresora, se cree involucró la acción de enzimas quitinolíticas y glucanolíticas.

Zhang y Yuen (2000), reportaron que *Stenotrophomonas maltophilia* cepa C3 inhibió la germinación de conidias de *Bipolaris sorokiniana*. Uno de los mecanismos implicados en dicha inhibición, se cree estuvo relacionado con la producción y liberación de quitinasas por parte de la bacteria.

Al igual que en el caso de las enzimas quitinolíticas, muchas especies bacterianas están en la capacidad de producir glucanasas. Fridlender *et al* (1993), determinaron que un aislado de *Pseudomonas cepacia* disminuyó la incidencia de *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfii* y *Pythium ultimum* en un 85, 48 y 71%, respectivamente, bajo condiciones de invernadero. La actividad biorreguladora de la bacteria, se debió a la producción de β -(1 \rightarrow 3) glucanasas, pero no de quitinasas.

Valois *et al* (1996), seleccionaron 30 actinomicetos -aislados de suelo- por su habilidad para producir diversos tipos de β -(1 \rightarrow 3) glucanasas. Dichas enzimas, hidrolizaron los glucanos presentes en la pared celular de *Phytophthora* spp. 11 de tales cepas, redujeron significativamente el índice de pudrición en la raíz, causado por *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, cuando fueron inoculadas en plantas de frambuesa.

Por otro lado, se ha demostrado que las poblaciones del microorganismo antagonista pueden ser incrementadas mediante la aplicación de sustratos foliares

que las favorezcan nutricionalmente, aumentando consecuentemente su actividad biorreguladora (Davis *et al.* 2002, Fokkema *et al.* 1979, Ploper *et al.* 1992, Stadler y Mueller 1996), en lugar de la aplicación directa y masiva de los agentes biológicos de control, evitando los riesgos potenciales asociados a este tipo de aplicación en campo. La quitina ha sido aplicada como sustrato junto con la bacteria *Bacillus cereus* cepa 304 para el control de la mancha foliar en maní causada por *Cercospora arachidicola*, incrementándose el tamaño poblacional de la bacteria sobre las hojas y resultando en un control significativo de la enfermedad (Kokalis-Burelle *et al.* 1992). Los aminoácidos también han sido utilizados como sustratos para incrementar el tamaño poblacional de cepas de bacterias antagonistas no patogénicas sobre frutas de manzana, logrando un control mejorado del moho azul que afecta esta fruta (Janisiewicz, Usall y Bors 1992). Se ha reportado también que la aplicación de metionina incrementó el tamaño poblacional del agente de control biológico *Pseudomonas putida* AP-1 en el suelo, donde la supresión de la marchitez por *Fusarium* en tomate fue mayor cuando la bacteria fue aplicada con el aminoácido en relación a su aplicación individual (Yamada y Ogiso 1997).

La habilidad para incrementar selectivamente el tamaño poblacional y la eficacia de un microorganismo biocontrolador, empleando enmiendas nutricionales, se basa en el hecho de que la concentración y diversidad de nutrientes constituye un factor limitante para el crecimiento de las poblaciones microbianas en la planta, especialmente las localizadas en el filoplano; pues dicho lugar constituye un hábitat donde la concentración de fuentes de carbono y nitrógeno es escasa (Andrews 1992, Janisiewicz y Bors 1995, Wilson y Lindow 1994, Wilson *et al.* 1995, Salazar 2005), observándose por ejemplo que la aplicación exógena de carbono

incrementa las poblaciones de *P.putida* y *P.syringae* en la filosfera de frijol y tomate respectivamente (Wilson y Lindow 1995, Ji y Wilson 2003).

Zhang y Yuen (2000), lograron disminuir la incidencia de *Bipolaris sorokiniana* en tallos frescos de “Kentucky-31” y *Lolium perenne*, utilizando la cepa *Stenotrophomonas maltophilia* C3, tanto en condiciones de invernadero como en condiciones de campo. Por otro lado, cuando una solución de quitina coloidal fue aplicada en compañía de células C3 preinducidas o no inducidas -creciendo en medios que contenían quitina, o en medios que no la contenían, respectivamente-, incrementaron significativamente la efectividad de la bacteria.

Sid Ahmed *et al.* (2003), aislaron una cepa de *Bacillus subtilis* -HS93- y una cepa de *Bacillus licheniformis* -LS674- de raíces de plantas de pimienta, las cuales demostraron -en ensayos *in vitro*- su efecto antagónico contra *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani*; explicado, en parte, por su actividad quitinolítica. El tratamiento de semillas y raíces con suspensiones de HS93 y quitina al 0.5%, resultó ser más efectiva contra la pudrición de las raíces por *Phytophthora* sp. Y *Rhizoctonia* sp. Con respecto a la adición de la bacteria sin quitina. El efecto de LS674 contra *R. solani*, fue incrementado significativamente cuando la bacteria fue usada en suspensiones con 0.5% de quitina, para el tratamiento de las raíces. El uso de quitina sola al 0.5%, para el tratamiento de las raíces, también redujo la pudrición causada por *Rhizoctonia* sp.

En el caso de la bioregulación para el hongo causal de la Sigatoka negra, *M. fijiensis*, se han realizado algunas investigaciones basadas en el uso de antagonistas nativos de la filosfera de musáceas alimenticias y en el uso de sustratos foliares.

González y col. (1996), aislaron 120 microorganismos quitinolíticos de la filosfera de plantas de banano var. Gran Enano, en Costa Rica. Pruebas de antagonismo *in vitro*, mostraron que las cepas R1 y A23-pertenecientes a la especie *S. marcescens*- inhibieron la longitud del tubo germinativo de *M. fijiensis* en un 74.2% y 71.4%, respectivamente. En pruebas con fungicidas sintéticos, se determinó que los dos aislados fueron compatibles en un 80% con mancozeb, 25.3% con propiconazol, 75% con tridemorf y 50% con benomil, cuando fueron usados a concentraciones de hasta 1000ppm. Posteriormente, en ensayos de casa de mallas y parcelas experimentales -y utilizando plantas de banano var. Gran Enano, evaluaron el efecto de diversos sustratos -R1 + A23, quitina, R1 + A23 + quitina, un fungicida sintético y agua- sobre la evolución de la Sigatoka Negra. En la casa de mallas, los tratamientos controlaron la enfermedad en un 84%, sin presentar diferencias significativas entre ellos. En el campo, todos los tratamientos fueron superiores al testigo, pero el tratamiento con fungicidas controló la enfermedad en un 60%, mientras que los otros tratamientos la controlaron en un 40% en promedio -sin presentar diferencias significativas entre ellos-.

Ruíz-Silvera y col (1997), evaluaron el efecto de diferentes sustratos -extracto de hojas de banano, leche, abono foliar, melaza y almidón de yuca, solos ó en combinación- sobre el crecimiento de bacterias antagonistas de *M. fijiensis* -tanto

in vitro como en casa de mallas-. En el ensayo *in vitro*, el extracto de hojas de banano fue el mejor sustrato para el crecimiento de *S. marcescens* R1. En las pruebas realizadas en casa de mallas, el sustrato compuesto por leche y melaza mostró los mejores resultados con respecto al establecimiento de *S. marcescens* R1. Posteriormente, estos autores evaluaron el efecto de diversos sustratos foliares sobre la evolución de la Sigatoka negra en plantas de banano var. Gran Enano, en condiciones de invernadero y condiciones de campo. En condiciones de invernadero, el sustrato compuesto de *S. marcescens* R1 y melaza presentó los mejores resultados para controlar la enfermedad. Sin embargo, en el ensayo de campo no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo absoluto.

Arango (2002), evaluó, bajo condiciones de invernadero y campo, el efecto de diferentes sustratos -melaza, glucano, leche, quitina y nitrato de calcio, solos ó en combinación- sobre la diversidad, densidad de población, estabilidad y actividad lítica de bacterias antagonistas de *M. fijiensis*; así como, sobre la evolución de la enfermedad. En condiciones de invernadero, los sustratos A -quitina + levadura + nitrato de calcio- y B -quitina + leche + melaza- fueron considerados los mejores sustratos para las variables evaluadas. En el ensayo de campo, los dos sustratos anteriores se aplicaron en rotación con fungicidas sintéticos usados para el control de la Sigatoka negra, mostrando un control estadísticamente igual al control convencional, lo cual significó una reducción del 40% el número de aplicación de fungicidas.

Osorio y coautores (2004), realizaron una selección de bacterias quitinolíticas -nativas del Urabá antioqueño- con potencial antagonista hacia *M. fijiensis*. 20 de las 116 bacterias aisladas inicialmente -provenientes de agua de pozo, lavados de la filosfera ó muestras de suelo de plantas de banano y plátano-, evidenciaron las mayores tasas de degradación de la quitina. Tres de tales aislados, fueron seleccionados -por su antagonismo *in vitro* contra *M. fijiensis* y su compatibilidad con fungicidas sintéticos usados en el control de la Sigatoka negra- para su inclusión en diversos sustratos -solos o en mezcla con una solución mineral mínima y un adherente comercial-, los cuales fueron aplicados foliarmente en condiciones de invernadero a plántulas de banano var. Gran Enano, sometida a un proceso de inoculación natural con el patógeno. Ninguna de las bacterias evaluadas, presentó diferencias significativas con el testigo absoluto. Sin embargo, al aplicarlas en rotación con fungicidas sintéticos se obtuvo un control estadísticamente igual al ofrecido por el sistema estándar de control químico, bajo condiciones de campo.

Una caracterización parcial de las bacterias quitinolíticas y glucanolíticas epifitas aisladas de la filosfera de plantaciones comerciales de banano y plátano en Costa Rica y en Urabá- Colombia, evidencian la presencia de bacterias con potencial bioregulador contra *M. fijiensis*. Estas bacterias, con morfología de bacilos gram negativos -principalmente-, cocos ó bacilos gram positivos, fueron capaces de producir quitinasas y glucanasas en medios de crecimiento selectivos con quitina ó β -(1,3) glucanos, respectivamente, como única fuente de carbono, en períodos inferiores a 48 h de incubación (Osorio *et al.*, 2004; Salazar, 2005). Esta capacidad puede permitir a las bacterias aisladas actuar sobre la quitina y/o β -(1,3) glucanos presentes en la pared celular de las ascosporas del hongo, antes de que éstas

penetren en el estoma; pues se ha observado que transcurren al menos 48 h entre la llegada de la ascospora a la hoja y el inicio del proceso de penetración en el estoma (Beveraggi, 1992; Stover, 1980; citados por Marín *et al.*, 2003).

Sin embargo, pese a comprobarse la presencia de bacterias líticas epifitas con potencial biocontrolador, existe poco conocimiento sobre el nivel de nutrimentos presentes en la filosfera y su variación bajo diversas condiciones climáticas; nutrimentos que determinan la diversidad y densidad poblacional de la microbiota epífita, especialmente en lo que respecta a la variedad y concentración de los carbohidratos presentes (Mercier y Lindow, 2000). Es por ello que, se condujo una caracterización química parcial de lavados de hojas de plantas de banano y plátano, ubicadas en áreas de cultivo comercial en el Urabá antioqueño colombiano. Dicha caracterización confirmó que la filosfera es un ambiente nutricionalmente pobre cuando se le compara con otros hábitats como la rizosfera (Salazar 2005). Adicionalmente, se evidenció que en la época lluviosa puede presentarse una menor disponibilidad de macronutrientes para la microbiota epífita, especialmente en lo que respecta al contenido proteico y nutrimentos como el sodio, el magnesio y el amonio (Salazar 2005).

La información obtenida de la caracterización química, fue empleada para formular un sustrato foliar que permitiera incrementar, de manera selectiva, las poblaciones de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas de la filosfera de las musáceas estudiadas, seleccionando dos sustratos a base de quitina coloidal, harina de cebada y urea, los cuales incrementaron en más de 10,000 veces la población de estas bacterias líticas (Salazar, 2005). En la experimentación en campo la

aplicación de dichos sustratos en rotación con fungicidas convencionales permitió una reducción del 43% en el número de ciclos de fungicidas convencionales (Patiño *et al.*2006); encontrando que es posible elaborar un sustrato foliar con un elemento de bajo costo y fácil obtención como la harina de cebada como sustrato apropiado para la selección de bacterias quitina y glucanolíticas en la filosfera de banano, perfilando así un reemplazo de la quitina coloidal de alto costo y laboriosa obtención por la harina de cebada.

A pesar de las experiencias anteriores es necesario y apremiante confirmarlas y confrontar estas experiencias en sistemas cercanos a la producción comercial de banano de exportación y estudiar más allá de la reducción en severidad, sus efectos en la fruta a ser exportada. Con base en el anterior marco teórico, se estudiará la acción biorreguladora de bacterias quitina y glucanolíticas, la cual se espera sea fomentada por un sustrato con fuentes de quitina, glucano y nitrógeno, aplicado a la filosfera de banano, en un sistema bajo condiciones similares a la producción comercial de banano de exportación, evaluando además del efecto sobre el desarrollo de la enfermedad, el efecto de estas medidas de control sobre parámetros de producción y calidad de la fruta que en última instancia son los que el productor utiliza como criterio de adopción de la tecnología propuesta.

3.8 SUSTRATOS FOLIARES PARA EL INCREMENTO DE BACTERIAS QUITINOLÍTICAS Y GLUCANOLÍTICAS EN LA FILOSFERA DE BANANO

La regulación biológica para patógenos foliares, puede ser una alternativa complementaria del control integrado de enfermedades, la cual frecuentemente involucra la aplicación del microorganismo antagonista sobre la superficie de la hoja (Spurr 1981, Blakeman y Fokkema 1982). Sin embargo, el éxito de dicho antagonista depende de su capacidad para establecerse como miembro de la microbiota epífita – especialmente cuando se requiere disminuir el inóculo del patógeno- (Spurr 1981, Blakeman y Fokkema 1982). Por tal motivo, el uso de antagonistas microbianos aislados de la microbiota epífita debería preferirse al uso de antagonistas aislados de otros ambientes, pues los primeros se encuentran adaptados a las condiciones que determinan el hábitat en la superficie de la hoja (Blakeman y Fokkema 1982, Andrews 1992).

Dentro de la regulación biológica de Fitopatógenos, una de las estrategias consiste en el uso de microorganismos antagonistas productores de sustancias antibióticas y/o enzimas líticas que actúen sobre sus esporas o tubos germinativos -en su fase epífita de crecimiento- (Andrews 1992, Elad et al. 2002). Por ejemplo, el empleo de microorganismos productores de quitinasas y/o glucanasas en la regulación de hongos basidiomicetos y ascomicetos ha demostrado ser de utilidad, pues la pared celular de dichos hongos está constituida principalmente por microfibrillas de quitina y glucanos, hecho que los hace sensibles al ataque de estas enzimas, especialmente a nivel de la hifa (Sahai y Manocha 1993, Alexopoulos, Mims, y Blackwell 1996, Mahadevan y Crawford 1997, Cohen- Kupiec y Chet 1998). Esta bioregulación mediante el uso de bacterias líticas antagonistas, ha sido estudiada con diversos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora fragariae* var.

rubi, *Phytophthora capsici*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*, *Bipolaris sorokiniana* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomate*, entre otros (Chernin et al. 1995, Valois et al. 1996, Ordentlich, Elad and Chet 1998, Sing et al. 1999, Zhang y Yuen 2000, Parra y Ramírez 2002, Ji y Wilson 2003, Sid Ahmed et al. 2003).

Osorio et al. (2004), realizaron pruebas de antagonismo sobre ascosporas de *M. Fijiensis*, con bacterias quitinolíticas aisladas del filoplano de banano en un ensayo in situ sobre discos de hojas también de esta planta, encontrando que algunos de los aislados inhibieron la germinación de las ascosporas o deformaron sus tubos germinativos, hasta en un 40 y 85 % respectivamente. Tal efecto, en parte, fue explicado por la actividad de las enzimas quitinolíticas sobre la pared del patógeno.

En una fase previa a esta investigación, se demostró que las bacterias líticas epifitas podían estar presentes en bajas poblaciones en la filosfera de plantas de banano cultivadas, y que además algunas de estas bacterias producían quitinasas y/o glucanasas en un periodo inferior a las 48 horas de incubación, cuando una fuente de quitina ó (1,3) glucanos estuvo presente en el medio de cultivo que soportaba su crecimiento (Salazar 2005). Esta capacidad, les puede permitir a los aislados actuar sobre la quitina y/o (1,3) glucanos presentes en la pared celular de los tubos germinativos de *M. fijiensis*, antes de que estos penetren en el estoma; pues se ha observado que transcurren al menos 48 horas entre la llegada de la ascospora a la hoja y el inicio del proceso de penetración en el estoma (Marín et al. 2003).

Por otro lado, se ha demostrado que las poblaciones del microorganismo antagonista pueden ser incrementadas mediante la aplicación de sustratos foliares que las favorezcan nutricionalmente, aumentando consecuentemente su actividad biorreguladora (Davis et al. 2002, Fokkema et al. 1979, Ploper, Backman y Rodriguez-Kabana 1992, Stadler y Mueller 1996), en lugar de la aplicación directa y masiva de los agentes biológicos de control, evitando los riesgos potenciales asociados a este tipo de aplicación en campo. La quitina ha sido aplicada como sustrato junto con la bacteria *Bacillus cereus* cepa 304 para el control de la mancha foliar en maní causada por *Cercospora arachidicola*, incrementándose el tamaño poblacional de la bacteria sobre las hojas y resultando en un control significativo de la enfermedad (Kokalis-Burelle et al. 1992). Los aminoácidos también han sido utilizados como sustratos para incrementar el tamaño poblacional de cepas de bacterias antagonistas no patogénicas sobre frutas de manzana, logrando un control mejorado del moho azul que afecta esta fruta (Janisiewicz, Usall y Bors 1992). Se ha reportado también que la aplicación de metionina incrementó el tamaño poblacional del agente de control biológico *Pseudomonas putida* AP-1 en el suelo, donde la supresión de la marchitez por *Fusarium* en tomate fue mayor cuando la bacteria fue aplicada con el aminoácido en relación a su aplicación individual (Yamada y Ogiso 1997).

La habilidad para incrementar selectivamente el tamaño poblacional y la eficacia de un microorganismo biocontrolador, empleando enmiendas nutricionales, se basa en el hecho de que la concentración y diversidad de nutrientes constituye un factor limitante para el crecimiento de las poblaciones microbianas en la planta, especialmente las localizadas en el filoplano; pues dicho lugar constituye un hábitat donde la concentración de fuentes de carbono y nitrógeno es escasa

(Andrews 1992, Janisiewicz y Bors 1995, Wilson y Lindow 1994, Wilson et al 1995, Salazar 2005), observándose por ejemplo que la aplicación exógena de carbono incrementa las poblaciones de *P. putida* y *P.syringae* en la filosfera de frijol y tomate respectivamente (Wilson y Lindow 1995, Ji y Wilson 2003).

En el caso de las estrategias de regulación biológica para *M. fijiensis*, se han realizado algunas investigaciones basadas en la aplicación de bacterias antagonistas productoras de quitinasas y/o glucanasas aisladas de la filosfera de banano y plátano, solas ó en combinación con sustratos foliares de diversas características nutricionales compuestas por quitina coloidal, leche y melaza, entre otros- (González et al. 1996, Ruíz-Silvera et al. 1997, Arango 2000); no obstante, es necesario dirigir la aplicación de estas sustratos con base en una caracterización previa de la filosfera de banano, al menos en sus componentes químico nutricional (minerales, carbohidratos y proteínas) y de poblaciones nativas de bacterias con potencial lítico sobre el hongo causante de la Sigatoka negra.

3.8.1 Efecto de sustratos foliares sobre la sigatoka negra

La Asociación de Bananeros de Colombia (AUGURA), a través de su Centro de Investigaciones del Banano (Cenibanano), consideró la realización de un estudio químico y microbiológico de la filosfera de plantas de banano y plátano, con el fin de formular un sustrato que aplicado al follaje de dichas musáceas, permitiera incrementar sus poblaciones naturales de bacterias quitinolíticas y gluconolíticas epifitas, facilitando su actuación como potenciales antagonistas y así reducir el inóculo de *M. Fijiensis*. Esto, con una consecuente disminución de las aplicaciones de fungicidas sintéticos y sin la necesidad de recurrir a aspersiones

masivas de estos microorganismos antagónicos en el campo. Los fungicidas tienen un elevado costo para el agricultor, y vienen perdiendo su eficacia debido al fenómeno de resistencia. Por otra parte, existe una demanda creciente de los consumidores por una fruta de banano o plátano más libre del uso de plaguicidas. La filosofía de los sustratos foliares para controlar enfermedades en los cultivos, es coherente con los principios de la agricultura sostenible, pues se basa en favorecer nutricionalmente, y de manera selectiva, a las poblaciones epifitas de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas con potencial biorregulador sobre el patógeno y presentes de manera natural en los ecosistemas de las plantas cultivadas.

Una determinación parcial de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas epifitas aisladas de la filosfera de plantaciones comerciales de banano y plátano en Costa Rica y en Urabá, Colombia, evidenciaron la presencia de bacterias con potencial biorregulador contra *M. fijiensis* en el área de la infección.

Los principales grupos de bacterias encontradas, fueron en un 73% bacilos Gram negativos, 13% bacilos Gram Positivos y 6% cocos Gram positivos, los cuales mostraron habilidad de producir quitinasas y glucanasas en medios de crecimiento selectivos con quitina o β -(1,3) glucanos, respectivamente, como única fuente de carbono, en períodos inferiores a 48 h de incubación (Osorio *et al.*, 2004; Salazar

Et al., 2006). Esta capacidad lítica puede permitir a las bacterias actuar sobre la quitina y/o β -(1,3) glucanos presentes en la pared celular de las ascosporas del hongo, antes de que penetren en el estoma, pues se ha observado que transcurren al menos 48 h entre la llegada de la ascospora a la hoja y el inicio del proceso de penetración en el estoma (Beveraggi, 1992; Stover, 1980; citados por

Marín *et al.*, 2003). Sin embargo, pese a comprobarse la presencia de bacterias líticas epifitas con potencial biocontrolador en la filosfera de estas musáceas, existe poco conocimiento sobre el nivel de nutrimentos presentes en ésta y su variación bajo diversas condiciones climáticas.

Se ha reportado que los nutrimentos determinan la diversidad y densidad poblacional de la microbiota epifita, especialmente en lo que respecta a la variedad y concentración de los carbohidratos disponibles (Mercier y Lindow, 2000). Es por ello que se realizó una caracterización química parcial de lavados de hojas de plantas de banano y plátano, ubicadas en áreas de cultivo comercial en el Urabá antioqueño colombiano. Dicha caracterización confirmó que la filosfera es un ambiente nutricionalmente pobre cuando se la compara con otros hábitats, como la rizosfera, especialmente en lo que respecta al contenido de carbohidratos y proteínas, los cuales son inferiores al 0,05% para ambos casos (Salazar, 2005). Adicionalmente, se evidenció que en la época lluviosa existe una menor disponibilidad de macronutrientes para la microbiota epifita, especialmente en lo que respecta al contenido proteico y nutrimentos como el sodio, el magnesio y el amonio (Salazar *et al.*, 2006).

La información obtenida de la caracterización química fue empleada para diseñar sustratos foliares, que permitieran incrementar, de manera selectiva, las poblaciones de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas de la filosfera de las musáceas estudiadas. Estrategia que es fundamento de este estudio y que ya ha sido probada en investigaciones anteriores, con resultados diversos. González *et al.* (1996a; 1996b) en ensayos de invernadero demostraron que sustratos foliares

a base de quitina coloidal y cuatro cepas de bacterias quitinolíticas, tres cepas del género *Serratia* y una del género *Bacillus*, disminuyeron la severidad de la enfermedad en un 84% cuando fueron comparados con el testigo absoluto, mientras que el testigo químico lo hizo en un 78%. En ensayo de campo, y bajo condiciones de inóculo abundante del hongo, tales sustratos lograron reducir la severidad de la enfermedad en un 40% con respecto al testigo absoluto, en tanto que el testigo químico lo hizo en un 60%. Ruíz-Silvera *et al.* (1997). En un área de cultivo de banano no protegida con fungicidas pero cercana a plantaciones comerciales, no encontraron diferencias estadísticamente significativas entre varios sustratos foliares, a base de leche, melaza y la cepa R1 de *Serratia marcescens* con el testigo absoluto, en relación a la severidad de la enfermedad; sin embargo, el inóculo capturado en el área fue siempre más bajo que el de la plantación aledaña. En condiciones de campo, Arango (2002) encontró que sustratos compuestos de leche, melaza y quitina, y de glucano, melaza y nitrato de calcio, alternados con fungicidas convencionales, permitieron reducir en un 40% el número de aplicaciones de éstos. Esta investigación constituyó uno de los primeros reportes sobre la eficacia y viabilidad económica de la aplicación de sustratos foliares alternados con fungicidas sintéticos para el manejo de la Sigatoka negra. Esta estrategia de control busca reducir el inóculo del patógeno, antes que las condiciones ambientales favorezcan su diseminación y establecimiento. Por lo tanto, es importante alcanzar su máxima eficacia en momentos de baja presión de la enfermedad como la época seca, y así lograr establecer poblaciones más abundantes y efectivas de la microbiota antagonista en las épocas lluviosas donde la presión de la enfermedad es más fuerte (Butterworth y McCartney, 1991; Salazar *et al.*, 2006).

Salazar *et al.* (2006) evaluaron 14 sustratos foliares en un ensayo de inoculación natural con el patógeno, formulados al comparar los niveles de nutrimentos de la filosfera de musáceas alimenticias con las necesidades nutricionales de las poblaciones bacterianas quitinolítica y glucanolítica epifitas.

En el presente experimento se seleccionaron los dos sustratos que lograron incrementar en mayor concentración dichas poblaciones, para ser evaluados en condiciones de campo por su capacidad de control de Sigatoka negra, tanto solos como en rotación con fungicidas sintéticos usados en el control convencional de la enfermedad.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 LOCALIZACIÓN

El experimento se llevó a cabo en la zona de Urabá, ubicada al norte del departamento de Antioquia, perteneciente a la zona de vida bosque húmedo tropical, presenta 87% de humedad relativa, temperatura promedio anual de 28 C, precipitación promedio anual de 2.870 mm, brillo solar promedio de 4,56 horas día-1, altitud de 25 m.s.n.m..La práctica investigativa se realizo bajo condiciones de campo y laboratorio en la sede de Apartadó del Politécnico Jaime Isaza Cadavid y en el laboratorio de CENIBANANO-AUGURA respectivamente.

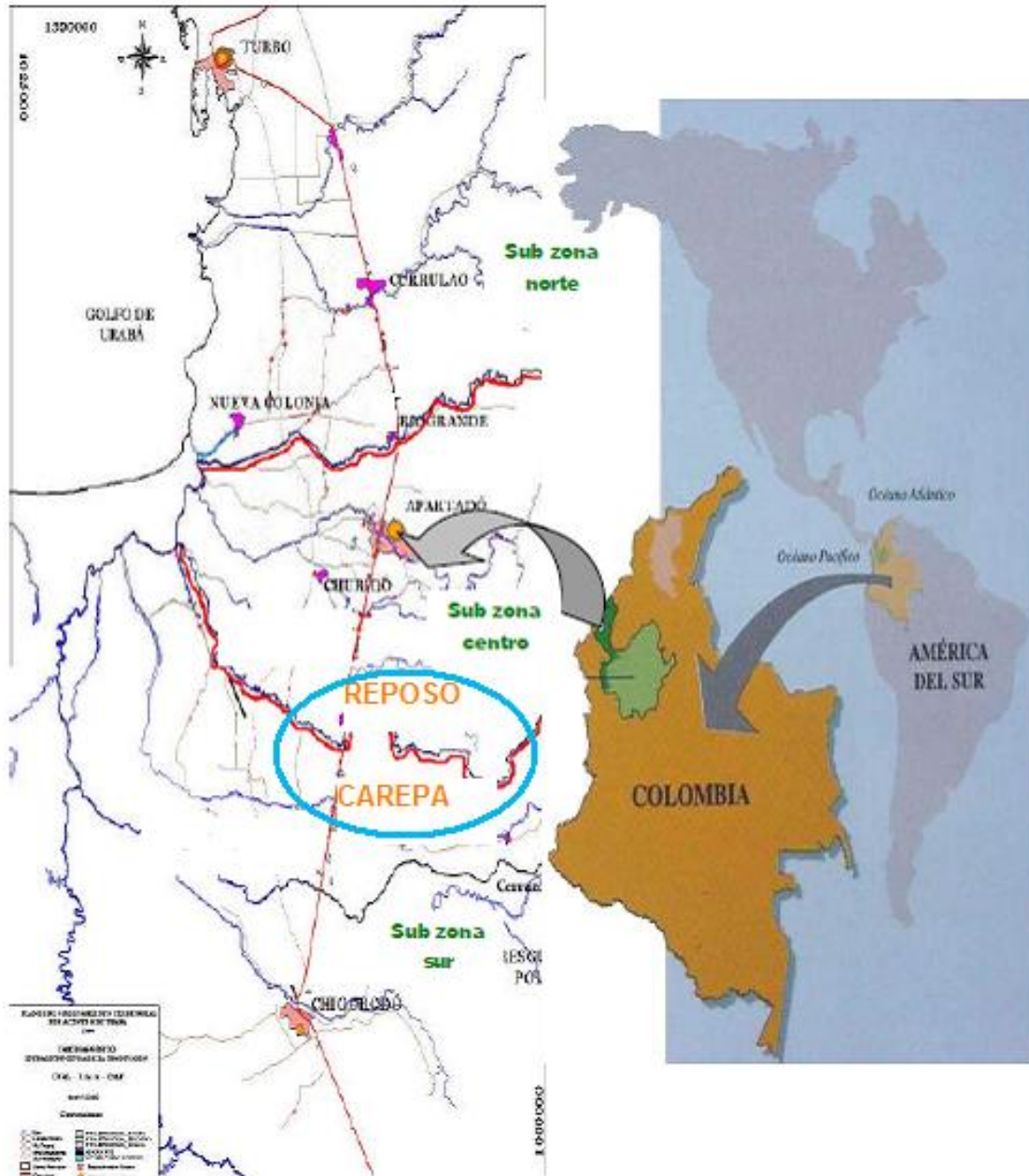


Figura 5. Localización geográfica de la investigación.

4.2. DISEÑO EXPERIMENTAL Y ANALISIS DE RESULTADOS

Se seleccionará los dos mejores sustratos foliares en términos de fomento de bacterias líticas nativas de la filosfera de banano y que muestra mejor compatibilidad con los componentes básicos de las mezcla de fungicidas convencionales en su mejor dosis y frecuencia de aplicación, en caso de ser estadísticamente iguales se escogerá aquel sustrato a base de harina de cebada y/o urea, por su menor costo y mayor disponibilidad, teniendo en cuenta que solo se evaluarán seis tratamientos (T1, T2, T5, T6, T8, T9) de los nueve tratamientos establecidos en las parcelas:

T1: Mejor sustrato foliar 1 (SF1)

T2: Mejor sustrato foliar 2 (SF2)

T3: SF1 + aceite mineral a dosis convencional

T4: SF2 + aceite mineral a dosis convencional

T5: SF 1 + mezcla fungicida convencional

T6: SF 2 + mezcla fungicida convencional

T7: Aceite mineral a dosis y frecuencia de aplicación convencional

T8: Mezcla fungicida a dosis y frecuencia de aplicación convencional

T9: Testigo sin control

Se utilizará un diseño de Bloques Completamente al Azar, con 9 tratamientos y 3 repeticiones (parcelas lineales) distribuidas en tres bloques diferentes. Cada parcela lineal, constará de 7 plantas del cultivar Gran enano, pero sólo las cinco centrales serán efectivas para la evaluación. Estas parcelas estarán separadas por una hilera de pasto King-grass (*Pennisetum purpureum* Kunth), para evitar el efecto de deriva al momento de las aplicaciones.



Foto 6. Parcela experimental.



Foto 7. Parcelas con las barreras.

Se evaluaron quincenalmente el grado de severidad de la enfermedad de acuerdo a la escala de Stover modificada por Gauhl (1989), la cual consiste en una estimación visual del porcentaje de área foliar afectada en todas las hojas de la planta excepto la hoja candela y las hojas dobladas, por medio de la siguiente escala:

Grado 0 = Hoja sin síntomas visibles

Grado 1 = Hoja con < 1% de rayas o hasta 10 manchas

Grado 2 = Hoja con 1 – 5% de área foliar atacada

Grado 3 = Hoja con 6 – 15% de área foliar atacada

Grado 4 = Hoja con 16 – 33% de área foliar atacada

Grado 5 = Hoja con 34 – 50% de área foliar atacada

Grado 6 = Hoja con > 50% de área foliar atacada

Para tener una mejor estimación del efecto de los tratamientos sobre la enfermedad, se medirá igualmente cada dos semanas el índice de severidad (Marín y Romero 1992), el cual considera además del grado de severidad de la hoja, la posición que ésta ocupa en la planta, asignando los siguientes factores de corrección de acuerdo al número de la hoja:

No. de hoja	Factor de corrección	No. de hoja	Factor de corrección
1 y 2	60	10	25
3	55	11	20
4	50	12	15
5	45	13	10
6	40	14	5
7 y 8	35	>14	1
9	30		

Para estimar el comportamiento de los tratamientos en el tiempo, se usará la variable área bajo la curva del desarrollo de la enfermedad (ABCDE). Los tratamientos que no incluyen la aplicación de mezcla de fungicida convencional, serán aplicados semanalmente, mientras que los que incluyen dicha mezcla, la rotación estará determinada por el tipo de fungicida utilizado, siendo cada 7-9 días si este es protectante o cada 12-14 días si es sistémico. Todos los tratamientos recibirán el control cultural de la enfermedad que se practica en una finca convencional. Los resultados serán analizados mediante el programa R.

4.3. METODOLOGIA EN CAMPO

4.3.1. Toma de muestras en parcelas experimentales.

Se realizaran toma de muestras cada siete días mediante el siguiente protocolo:

1. Se esterilizaron previamente hisopos de algodón, tubos de vidrio y buffer fosfato.
2. Se visita el sitio de muestreo con los materiales estériles y una nevera de icopor con gel refrigerante para transportar los tubos al laboratorio de procesamiento.
3. Para muestrear la hoja se utiliza la metodología del hisopo, la cual consiste en frotar una superficie determinada con un hisopo húmedo con buffer fosfato y se frota sobre la superficie a evaluar, en por lo menos dos direcciones distintas, rotándolo ligeramente. Después se descarga el hisopo en un medio de recogida.
4. Los tubos se mantendrán en hielo hasta su procesamiento (no más de 6 horas).



Foto 8. Toma de muestras en campo



foto 9. Hisopo en buffer fosfato.

4.4. METODOLOGIA EN LABORATORIO

Después de haber tomado las muestras en campo se procede a llevarlas al laboratorio para su respectiva siembra.

4.4.1. Siembra en laboratorio de muestras provenientes de plantas de las parcelas experimentales.

- 1 Una vez las muestras llegan al laboratorio, se realizan diluciones seriadas por muestra, hasta la dilución 10^{-9} en tubos eppendorf de 1.5 mL, por ejemplo: de la muestra de campo se toman 50 μL y se adicionan a un tubo eppendorf con 950 μL de agua destilada estéril, se agita vigorosamente, se extraen de allí 50 μL y se agregan a otro tubo eppendorf que contiene agua destilada estéril. Se continúa con este proceso hasta completar la dilución 10^{-9} .

2. De las diluciones se toman 20ul y son sembrados por duplicado mediante la técnica de siembra en superficie en los medios selectivos harina de cebada (10^{-5} , 10^{-7} y 10^{-9}) y quitina (10^{-1} y 10^{-3} y la solución pura sin diluir). Estos datos varían con el comportamiento en el crecimiento de los muestreos iniciales.



Foto 10. Materiales para la siembra
De muestras

Foto 11. Muestras sembradas

3 El proceso de incubación, se realiza a 28°C . Se hace lectura cuando se observe crecimiento (48h-72h). Los recuentos, se expresan en términos de unidades formadoras de colonia por mililitro -UFC/mL-, cuyo cálculo emplea la siguiente fórmula: Número de colonias obtenidas x 50 x el factor de dilución.

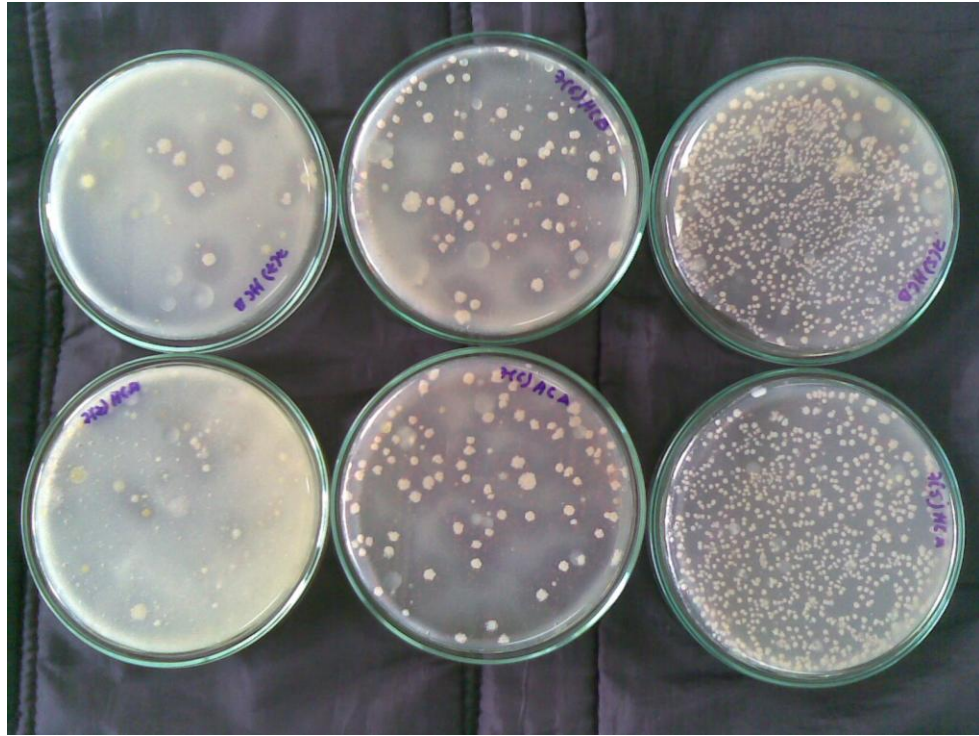


Foto 12. Colonias de bacterias líticas en medio de cultivo a base de harina de cebada en diluciones de 10^{-5} 10^{-6} 10^{-7} de derecha a izquierda.

4.5. PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO.

4.5.1. Agar bacteriológico (2%) + Harina de cebada (2.5%)

1. El volumen de agua a preparar se precalienta en horno microondas (500mL, 2.5 minutos). Se toma la cantidad de harina de cebada (125um) y se ciere al volumen de agua precalentado que debe estar en agitación para que la harina se incorpore y no forme grumos. Luego se agrega el agar y se deja en agitación 5 minutos. Después de lleva a horno microondas (por cada 100 mL, 1 minuto) y se detiene el calentamiento (500 ml cada 30 segundos), se agita y se reanuda el calentamiento.

2. Se esteriliza en autoclave a 15 PSI por 15 minutos.
3. Se sirve en cajas de petri esterilizadas, se deja enfriar y se voltea para evitar que las gotas de condensación causadas por el enfriamiento caigan al medio.
4. Se conservan en la nevera hasta su uso.



Foto 13. Medios de cultivo

4.5.2. Agar bacteriológico (2%) + Quitina coloidal (4%)

1. Sobre una medida de agua destilada en agitación se deposita el agar y la quitina coloidal, se agita por 5 minutos.
2. Se esteriliza en autoclave a 15 PSI por 15 minutos.
3. Se sirve en cajas de petri esterilizadas, se deja enfriar y se voltea para evitar que las gotas de condensación causadas por el enfriamiento caigan al medio.
4. Se conservan en la nevera.



Foto 14. Preparación de medios de cultivo

4.6. PREPARACION DE SUSTRATOS.

1. Se preparan las soluciones base que son la solución mineral base compuesta de 1 g de K_2HPO_4 , 0,5 g/L de $MgSO_4$, 1 g/L de NaCl y 1 g/L de $CaNO_3$ y el buffer fosfato compuesto por 5.8g/L de Na_2HPO_4 y 3.5g/L de KH_2PO_4 .
2. Se pesan las cantidades correspondientes de cada elemento componente de los sustratos: Quitina coloidal 4%, Urea 4%, Harina de cebada 2.5% (pasada por tamiz de 125 μm).
3. Se precalienta la solución base (solución mineral base o buffer fosfato) en horno microondas (500ml, 2.5 minutos) La harina de cebada se cierne, a la solución base precalentada, que debe estar en agitación para que no forme grumos. Luego se lleva la solución al horno microondas (1 minuto por cada 100 ml) y se detiene el calentamiento (100 ml, cada 10 segundos; 500 ml cada 30 segundos), se agita y se reanuda el calentamiento.
4. Se mezclan los componentes, dependiendo del sustrato, se completa el volumen y se agitan en placa por 5 minutos.
5. Los sustratos se esterilizan en autoclave a 121°C por 15 minutos. Se dejan enfriar y se conservan en la nevera.



Foto 15. Componentes para la preparación de sustratos foliares (harina de cebada + K_2HPO_4 + NaCl)

5. RESULTADOS Y CONCLUSIONES

5.1 Objetivo 1

En esta evaluación, en el tiempo se observa que las poblaciones de bacterias glucanolíticas tienden a estabilizarse con tendencia al aumento en los últimos muestreos, ello puede deberse a la adaptación de las poblaciones nativas a la aplicación periódica de los sustratos solos o en mezcla con fungicidas o a la incursión de condiciones ambientales que favorecieron el crecimiento, esto por el comportamiento del tratamiento testigo que tiene la misma tendencia que los

demás tratamientos. La comparación de las medias de las poblaciones, mostro que el tratamiento T4 obtuvo conteos significativamente más altos (1.88 veces encima del testigo) de bacterias gluconolíticas que el testigo absoluto (sin control), seguido del tratamiento T1 (54% por encima del testigo). Los demás tratamientos tienen valores similares o menores al testigo absoluto en la variable ufc/cm²

Efecto de los sustratos foliares solos y en mezcla con fungicidas sobre la dinamica poblacional de bacterias gluconolíticas.

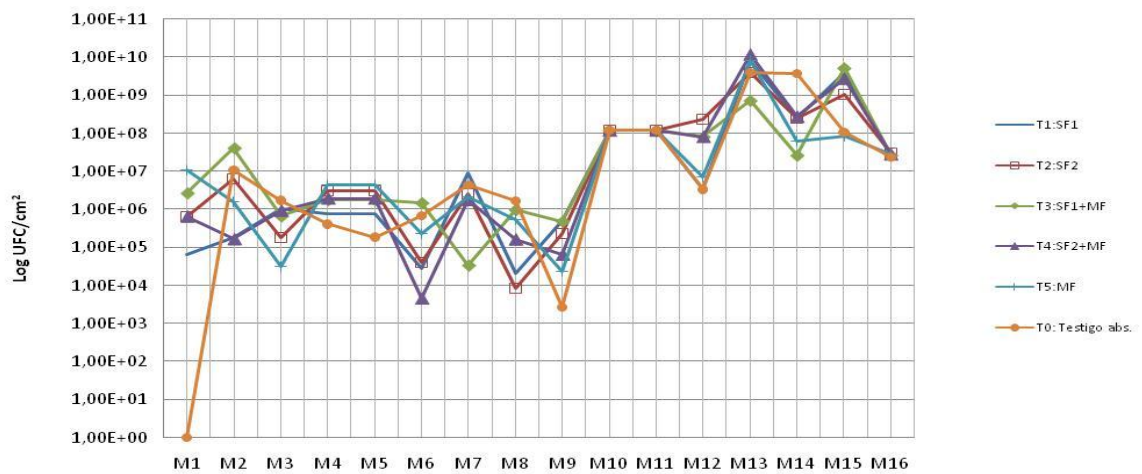


Figura 6. Efectos de los sustratos foliares solos y en mezcla con fungicidas sobre la dinámica poblacional de bacterias gluconolíticas

La tendencia en el tiempo de las bacterias quitinolíticas, refleja el aumento y la estabilidad de las ufc/cm² fomentadas por el T4 (2E+3 veces por encima del testigo). Los demás tratamientos, incluido el testigo absoluto muestran fluctuaciones en la variable respuesta siempre por debajo del tratamiento T4.

Efecto de los sustratos foliares solos y en mezcla con fungicidas sobre la dinamica poblacional de bacterias quitinolíticas.

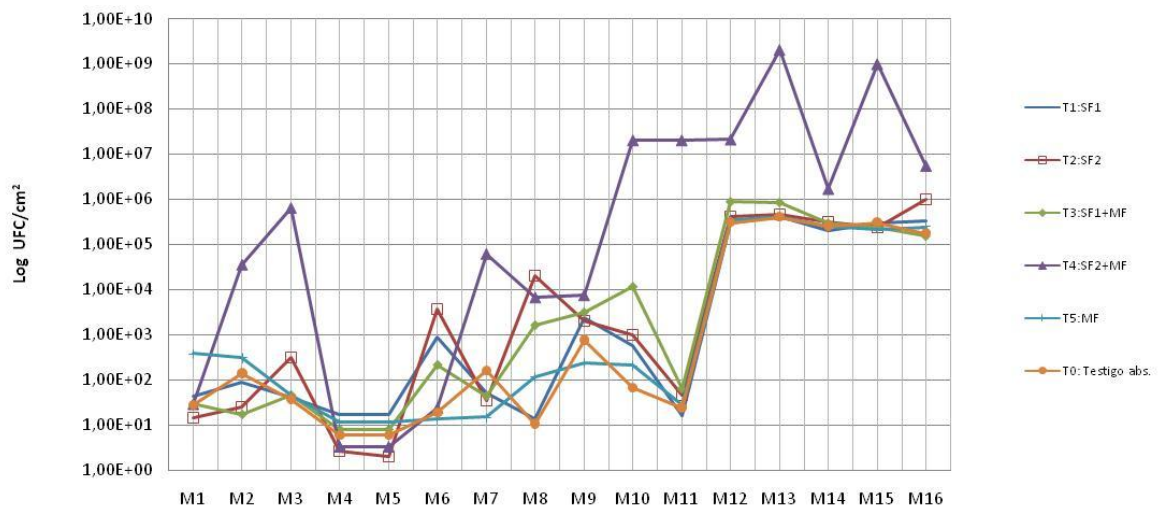


Figura 7. Efectos de los sustratos foliares solos y en mezcla con fungicidas sobre la dinámica poblacional de bacterias quitinolíticas.

5.2 Objetivo 2

En esta evaluación, en el tiempo se observa que las poblaciones de bacterias glucanólíticas tienden a estabilizarse con tendencia al aumento en los últimos muestreos, ello puede deberse a la adaptación de las poblaciones nativas a la aplicación periódica de los sustratos solos o en mezcla con fungicidas o a la incursión de condiciones ambientales que favorecieron el crecimiento, esto por el comportamiento del tratamiento testigo que tiene la misma tendencia que los demás tratamientos. La comparación de las medias de las poblaciones, mostro que el tratamiento T4 obtuvo conteos significativamente más altos (1.88 veces encima del testigo) de bacterias glucanólíticas que el testigo absoluto (sin control), seguido del tratamiento T1 (54% por encima del testigo). Los demás tratamientos tienen valores similares o menores al testigo absoluto en la variable ufc/cm².

En cuanto a la precipitación se puede decir que las poblaciones de bacterias se empiezan a adaptar a las aplicaciones de los sustratos, el aumento en la precipitación promueve su crecimiento de manera similar para todos los tratamientos principalmente en los últimos muestreos.

Efecto de la precipitación sobre la dinámica poblacional de bacterias glucanólíticas.

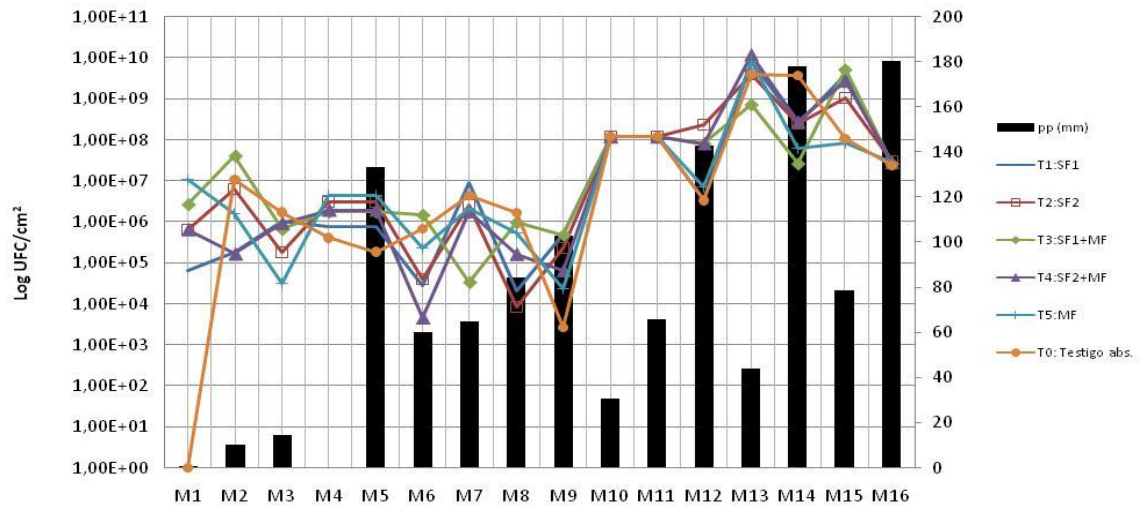


Figura 8. Efecto de la precipitación sobre la dinámica poblacional de bacterias quitinolíticas.

- La tendencia en el tiempo de las bacterias quitinolíticas, refleja el aumento y la estabilidad de las ufc/cm² fomentadas por el T4 (2E+3 veces por encima del testigo). Los demás tratamientos, incluido el testigo absoluto muestran fluctuaciones en la variable respuesta siempre por debajo del tratamiento T4.
- El comportamiento de la precipitación en relación con las bacterias quitinolíticas muestra un comportamiento similar a las glucanólíticas, donde se observa una adaptación inicial y luego un aumento del crecimiento en los últimos muestreos

fomentado por los sustratos (T4 en mayor medida) y probablemente por la lluvia acumulada.

Efecto de la precipitación sobre la dinámica poblacional de bacterias quitinolíticas.

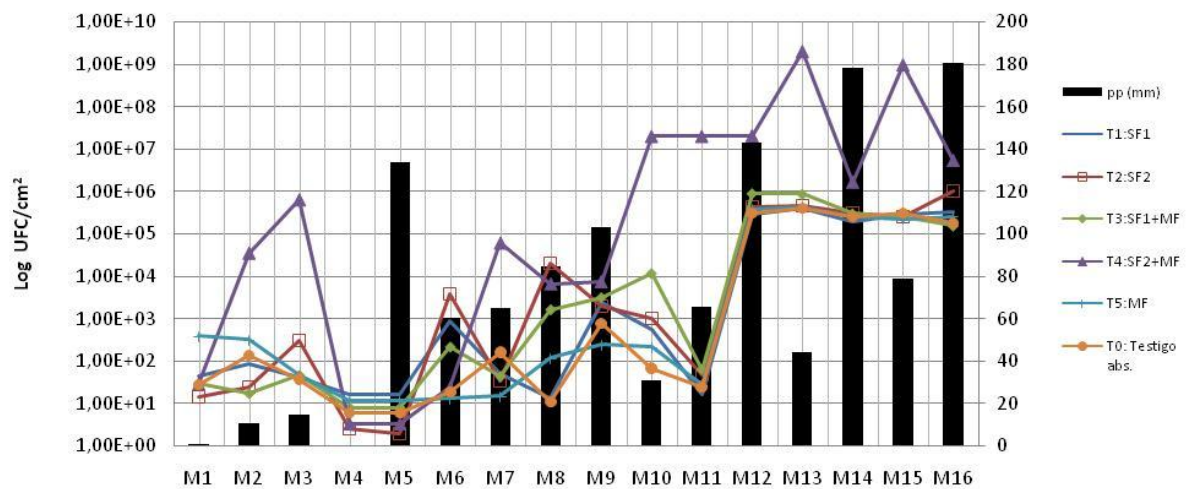


Figura 9. Efecto de la precipitación sobre la dinámica poblacional de bacterias glucanólítica

5.3 Objetivo 3

Se observa altas poblaciones de bacterias glucanólíticas homogéneas en todos los tratamientos del orden de 10^9 UFC, pero solo el tratamiento SF2 en mezcla con fungicida, presenta menor nivel de enfermedad con respecto al testigo sin control químico.

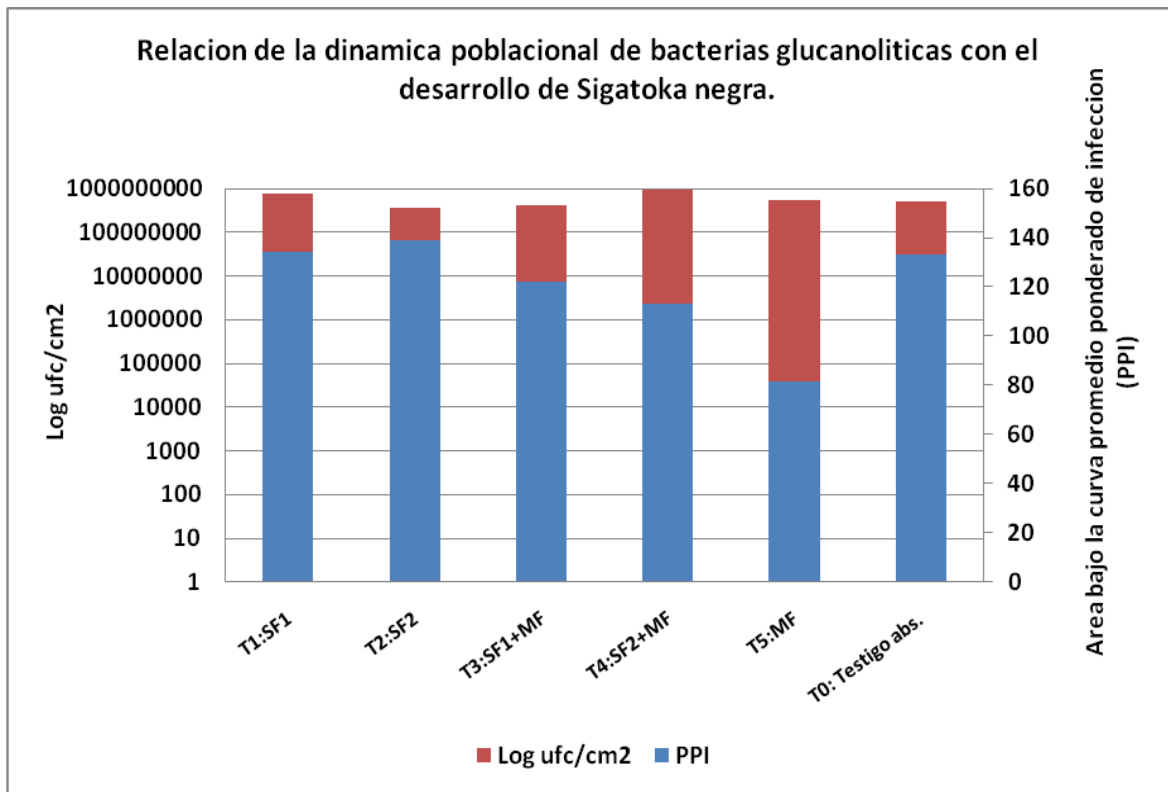


Figura 10. Relación de la dinámica poblacional de bacterias glucanólicas con el desarrollo de Sigatoka negra.

Los niveles poblacionales de las bacterias no se correlacionan con los niveles de enfermedad, encontrados por los sustratos solos.

La mezcla con fungicidas no afecta las poblaciones de bacterias líticas.

Con relación a la enfermedad, se observa una situación similar que la encontrada con las glucanólicas en donde el SF2 en mezcla con fungicida, presenta menor de enfermedad que el encontrado con el testigo sin control químico.

Se demostró compatibilidad de los dos sustratos foliares con aceite mineral y con la mezcla fungicida, dado que no se encontró en condiciones de campo problemas de fitotoxicidad.

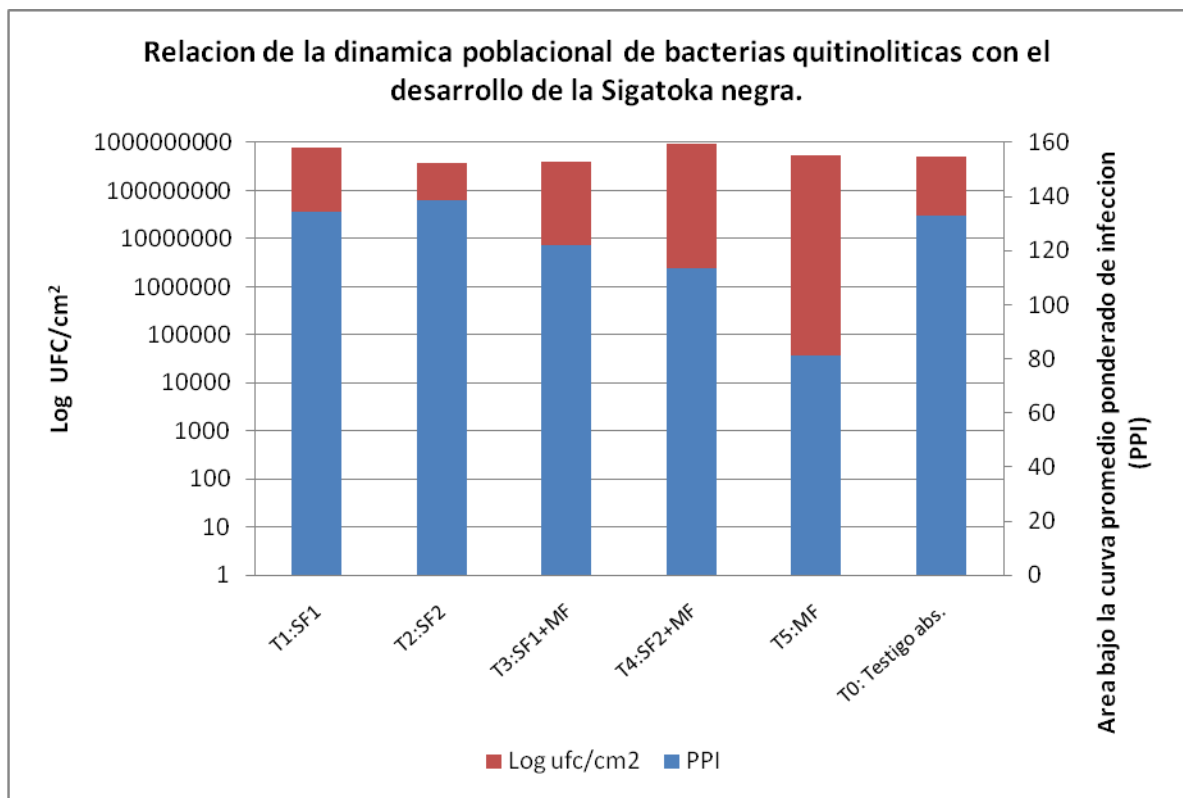


Figura 11. Relación de la dinámica poblacional de bacterias quitinolíticas con el desarrollo de Sigatoka negra.

Tabla 2. Análisis estadístico para la variable ufc/cm² en parcelas experimentales.

Coefficients:				
	Estimate	Std. Error	z value	Pr(> z)
(Intercept)	1,94E+04	4,51E-03	4295206	<2e-16 ***
factor(tto)1	4,31E+02	5,79E-03	74467	<2e-16 ***
factor(tto)2	-3,24E+02	6,96E-03	-46567	<2e-16 ***
factor(tto)3	-2,47E+02	6,81E-03	-36212	<2e-16 ***
factor(tto)4	6,51E+02	5,58E-03	116570	<2e-16 ***
factor(tto)5	2,97E+01	6,33E-03	4686	<2e-16 ***
factor(tto)6	-6,32E+03	7,37E-01	-8577	<2e-16 ***
Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1				

Tratamientos	Promedios
0	256312789
1	394475961
2	185374525
3	200325160
4	491263013
5	264027876
6	460004

6. LITERATURA CITADA

AGUIRRE, Marta; CASTAÑO-ZAPATA, Jairo y ZULUAGA, Luis. Método rápido de Diagnostico de *Mycosphaerella musicola* leach y *M. fijiensis* Morelet, agentes causante de la Sigatoka amarilla y negra. En: Revista Infomusa Vol. 8, N° 2: El autor, 1999. p. 619-623.

Arango, M.E. 2002. Alternativas de manejo para el control biológico de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en el cultivo del banano (*Musa AAA*). p. 130-134. En: XV Reunión Internacional ACORBAT (2002, Cartagena de Indias, Colombia). Memorias. Medellín: Augura.

Arias, L. La Sigatoka del banano, alternativas para su control. Periódico la Impronta. Medellín. Noviembre 2004.

ASOCIACIÓN DE BANANEROS DE COLOMBIA. Coyuntura bananera Colombiana 2009. En: Informe de gestión Anual del año 2008. Medellín: AUGURA, 2009. p. 10-15.

ASOCIACION DE BANANEROS DE COLOMBIA y CENTRO DE INVESTIGACIONES EN BANANO. Proyecto especial Sigatoka Negra. En: Boletín

Augura. 2006 b. Proyecto Especial Sigatoka. 15 p. En: Foro Proyecto Especial Sigatoka (2006, Medellín, Colombia). Memorias. Medellín: Augura.

Betancourt, G. La "Sigatoka Negra" del banano y el plátano. Disponible en:
http://www.infoagro.net/shared/docs/a3/4Sigatoka_negra.pdf

BORNACELLY, Helena y BOLAÑO James. Efecto de diferentes labores de Manejo sobre el desarrollo de la Sigatoka negra del banano en el distrito de Sevilla, zona bananera del Magdalena. Santa Marta. 2003. 311 p. Trabajo de grado (Ingeniero agrónomo). Universidad del Magdalena. Facultad de ingeniería. Área fitopatología.

Clarke, A; Stone, B. 1962. B-1, 3- Glucan hydrolases from the grape vine (*Vitis vinifera*) and other plants. *Phytochemistry* (England) 70 (1): 175-188.

CHICA Rubén *et al.* Impacto y manejo de la Sigatoka negra en el cultivo de banano de exportación en Colombia. En: Congreso de la asociación para la cooperación en investigaciones de bananos en el Caribe y América tropical. (2004: Oaxaca). Memorias del XVI congreso ACORBAT. Oaxaca, México: ACORBAT, 2004. p. 53 62

Chica, R. *et al.* 2004. Impacto y Manejo de la Sigatoka Negra en el cultivo banano de exportación en Colombia. Disponible en:
http://musalit.inibap.org/pdf/IN050659_es.pdf. Consultado 26/marzo/2010.

GAUHL, Friedhelm. Epidemiología y ecología de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet) en plátano (*Musa* sp.) en Costa Rica. Unión de Países Exportadores de Banano, UPEB. Panamá. 1992. 114 p.

González, R. et al. Selección de Microorganismos Quitinolíticos En El Control De Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) En Banano. Manejo Integrado De Plagas. Turrialba. Costa Rica.1996. P. 6-11.

González, Q. R; et al. 1996. Evaluación de microorganismos quitinolíticos antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis* en casas de malla y campo. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 40: 12-16.

González, Q. R; 1995. Efecto de microorganismos quitinolíticos en el desarrollo de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Tesis de MsC. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 94 pág.

Herrera-Ruiz J. 1990. La síntesis de quitina en los hongos, publicaciones de la Universidad de Sevilla.

Herrera- Ruiz J; 1993 La Quitina.Inv.Cien.Julio 1993.pag 42-49.

HERNÁNDEZ y ORDOSGOITTI. Enfermedades fúngicas “Sigatoka Negra”. Disponible en: < URL: [http://: www.Ceniab.gov.ve.](http://www.Ceniab.gov.ve)>.2010.

Hidalgo, M. et al. Efectos De La Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) sobre la fotosíntesis y transpiración foliar del banano (*Musa sp .AAA*, cv Valery) Disponible en: http://www.mag.go.cr/rev_agr/v30n01_035.pdf. Consultado 03/Abril/2010

HOYOS, Liliana; SALAZAR, Eduardo y MIRA, John. Ciclo de vida de *Mycosphaerella fijiensis* en Urabá, Colombia. En: Congreso de la asociación para la cooperación en investigaciones de bananos en el Caribe y América tropical. (2006: Joinville). Memorias del XVII congreso ACORBAT. Joinville, Brasil: ACORBAT, 2006. p. 654-655.

INIBAP, 2002. Networking Banana and Plantain: INIBAP Annual Report 2001. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France. 2002. p. 40 – 41.

Klopfenstein, C. 1998. The role of cereal beta-glucans in nutrition and health. Cereal food world, 33:865-869.

Kokalis-Burelle, N., P. A. Backman, R. Rodriguez-Kabana, and L. D. Ploper. 1992. Potential for biological control of early leafspot of peanut using *Bacillus cereus* and chitin as foliar amendments. En: Biological Control. Vol 2; p.321–328.

Mahadevan, B. and Crawford, D. L. 1997. Properties of the chitinases of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. En: Enzyme and Microbial Technology. Vol. 20; p.489-493.

Marin, D. et al. Black Sigatoka: An Increasing Threat to Banana Cultivation. Plant Disease. The American Phytopathological Society. Vol.87 N°3. 2003. P 208-222.

Martínez, A.; Rey, V. Proyecto Especial Sigatoka Negra. Augura. Medellín. 2007. 36 páginas.

Mauch, F; Hadwiger, J; Boller, T. 1984. Ethylene: Symptom, not signal for the induction of chitinases and B-1, 3-glucanase in pea pods by pathogens and elicitors. Plant physiology (USA): 76 pp. 607-611.

Osorio, I., L.F. Patiño, E. Bustamante, y P. Rodríguez. 2004. Selección y evaluación de bacterias quitinolíticas provenientes de la zona de Urabá, para el control de la Sigatoka Negra. Boletín Técnico de Cenibanano (Medellín) 6: 8-13. ISSN: 1692-6633

PATIÑO, Luis. La resistencia a fungicidas, una Continúa Amenaza al control de la Sigatoka Negra. En: Boletín Técnico CENIBANANO No 4. Medellín: CENIBANANO, 2003. p. 9-12.

PATIÑO, Luis y MEJÍA, M. Gonzalo. La dinámica climatológica y su relación con el Hongo *Mycosphaerella fijiensis*. AUGURA – CENIBANANO. En: Foro Sigatoka negra, situación actual y perspectivas para el año 2000, en la zona bananera del Magdalena. CALIMA. Santa Marta. Octubre. 1999. p. 7.

Patiño, L. F. , Salazar, L; Collazos JC.; Pidrahita R; Bustamante E. 2006. Bacterias líticas y sustratos en la filosfera de banano y plátano para el control de Sigatoka Negra p.133 – 140. Memorias XVII Reunión Internacional de la Asociación para la Cooperación en Investigaciones de Banano en el Caribe y en América Tropical ACORBAT, 2006, Joinville, Brasil. Octubre 15-20 de 2006 ACORBAT/ACAF, Joinville, Brasil

Ramos, C. Enciclopedia práctica de la agricultura y la ganadería. Cuarta parte. Arboricultura. Principales frutales de clima tropical y subtropical. Barcelona. España. Páginas 676-679.

Ruíz-Silvera, C., Bustamante, E., Jiménez, F., Saunders, J., Okumoto, S. y González, R. 1997. Sustratos y bacterias antagonistas para el manejo de *Mycosphaerella fijiensis* en banano. En: Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). No. 45; p. 9-17.

Sahai, A.S. and Manocha, M.S. 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. En: FEMS Microbiology Reviews. Vol 11; p.317-338.

Salazar, L.M. 2005. Estudio de la filosfera de musáceas alimenticias en el Urabá antioqueño. Medellín. 103h. Tesis Magíster en Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.

San-Lang Wang, K, Jau Ren Hwang. 2001. Microbial reclamation of shellfish wastes for the production of chitinases. Enzyme and microbial technology. Pagina. 376-382.

Soto, M.2010. Banano, Cultivo y Comercialización. Ecología del Banano. Segunda edición. Capitulo 3.Pagina 1-5.