

**EFFECTO DE RIZOBACTERIAS AERÓBICAS FORMADORAS DE ENDOSPORA  
SOBRE *Mycosphaerella fijiensis***

**NATALIA ESTRADA ARANGO  
DIANA MARCELA RIVERA RODRÍGUEZ**

**UNIVERSIDAD EAFIT  
ESCUELA DE INGENIERÍA  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS  
MEDELLÍN  
2009**

**EFFECTO DE RIZOBACTERIAS AERÓBICAS FORMADORAS DE ENDOSPORA  
SOBRE *Mycosphaerella fijiensis***

**NATALIA ESTRADA ARANGO  
DIANA MARCELA RIVERA RODRÍGUEZ**

**Trabajo de tesis para optar por el título de Ingeniero de Procesos**

**ASESOR**

**Luisa Fernanda Posada Uribe  
Ingeniera de Procesos  
Universidad EAFIT**

**COASESOR**

**Sandra Mosquera López  
Ingeniera de Procesos  
Universidad EAFIT**

**UNIVERSIDAD EAFIT  
ESCUELA DE INGENIERÍA  
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA DE PROCESOS  
MEDELLÍN**

**2009**

Nota de aceptación

---

---

---

---

---

Presidente del jurado

---

Jurado

---

Jurado

Medellín, 15 octubre de 2009

***"Una búsqueda comienza siempre con la suerte del principiante y termina con la prueba del conquistador."***

***Paulo Coelho***

***"A Dios, a nuestros padres y familiares por el apoyo recibido durante nuestra formación profesional..."***

## AGRADECIMIENTOS

*Este proyecto no hubiera podido ser posible sin la generosa colaboración de personas y organizaciones a quienes expresamos nuestro más sincero agradecimiento:*

A nuestra asesora de tesis **Luisa Fernanda Posada Uribe** por su labor desempeñada como guía fundamental en el desarrollo del proyecto, por sus críticas, conocimientos y percepciones compartidas para hacer de este un logro superado satisfactoriamente. Muchas gracias por su confianza, esfuerzo y su inmenso apoyo.

A nuestra Co-asesora **Sandra Mosquera López** por sus consejos y conocimientos brindados de manera incondicional. Gracias por su paciencia y su carisma que siempre permitieron un mejor ambiente de trabajo, por su tranquilidad, apoyo y aliento que facilitaron la superación de este ideal compartido.

A **Valeska Villegas Escobar**, gracias por sus exigencias y su orientación en el área de la biotecnología. Por sus sabias críticas y consejos y por sus deseos de explorar siempre más allá de las cosas que están a simple vista, por inculcarnos la importancia de la constancia y la dedicación para lograr grandes resultados en nuestros proyectos de vida.

A **Isabel Ceballos, Mónica Angulo y María Ramírez** por su generosidad y colaboración durante el desarrollo del proyecto. Por su paciencia, ayuda, enseñanzas y aportes transmitidos incondicionalmente que contribuyeron a la realización de este trabajo. Muchas gracias.

Una gratitud infinita con cariño y admiración al personal de los laboratorios de la Universidad EAFIT, por su presencia durante todo el proyecto, su tolerancia y cooperación. Especialmente a **Sigifredo Cárdenas Bedoya**, porque eres de esa clase de personas que todo lo comprenden y que dan lo mejor de sí mismos sin

esperar nada a cambio, porque sabes escuchar y brindar ayuda cuando es necesario, porque te has ganado el cariño, admiración y respeto de todos los que te conocen. Mil gracias.

Un especial reconocimiento al personal de **Cenibanano**, AUGURA, especialmente a **John Jairo Mira, Luz Edith Argel, Ramón Piedrahita** y por sus buenas intenciones siempre, su preocupación, su orientación, conocimientos brindados y por involucrarse en el proyecto de una forma muy propia.

A la **Universidad EAFIT** y a la Asociación de Bananeros de Colombia - **AUGURA**, un profundo agradecimiento por permitir la realización del proyecto a través de su financiación y conocimientos brindados.

## TABLA DE CONTENIDO

LISTA DE TABLAS .....	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
LISTA DE GRÁFICAS .....	7
LISTA DE ANEXOS.....	8
RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN .....	11
<b>1. OBJETIVOS.....</b>	<b>13</b>
1.1. OBJETIVO GENERAL .....	13
1.2. ESPECÍFICOS.....	13
<b>2. MARCO TEÓRICO .....</b>	<b>14</b>
2.1. EL CULTIVO DE BANANO ( <i>Musa AAA</i> ) .....	14
2.2. <i>Mycosphaerella fijiensis</i> Y LA ENFERMEDAD DE LA SIGATOKA NEGRA.....	15
2.2.1. <i>Escala de medición de Stover para la evaluación de severidad de la Sigatoka negra</i> .....	19
2.3. LAS RIZOBACTERIAS.....	20
2.4. BACTERIAS AERÓBICAS FORMADORAS DE ENDOSPORA (BAFES).....	22
2.5. RESISTENCIA INDUCIDA (ISR Y SAR) .....	24
2.6. ANTECEDENTES DEL USO DE PGPRS Y ANTAGONISMO CONTRA <i>Mycosphaerella fijiensis</i> .....	26
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>30</b>
3.1. LOCALIZACIÓN .....	30
3.2. MATERIAL VIVO .....	30
3.3. DETERMINACIÓN DEL MEJOR MÉTODO DE INFECCIÓN ARTIFICIAL CON <i>M. fijiensis</i> EN PLANTAS DE BANANO .....	31
3.3.1. <i>Infección de plantas de banano con ascosporas de M. fijiensis</i> .....	32
3.3.2. <i>Infección de plantas de banano con fragmentos de micelio de M. fijiensis</i> .....	33
3.4. CURVAS DE CALIBRACIÓN UFC/mL .....	33
3.5. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS BACTERIANOS LIBRES DE CÉLULAS.....	34
3.6. PRUEBAS DE ANTAGONISMO .....	35
3.6.1. <i>Técnica de inhibición de micelio expandido</i> .....	35
3.6.2. <i>Técnica de microplatos:</i> .....	37
3.6.3. <i>Técnica de inhibición de tubo germinativo por descarga de ascosporas en hojas de banano</i> .....	38
3.7. EFECTO DE LAS RIZOBACTERIAS SOBRE <i>M. fijiensis</i> A NIVEL <i>IN VIVO</i> .....	39

3.7.1.	<i>Infección artificial de plantas de banano a nivel in vivo</i> .....	40
3.7.2.	<i>Acondicionamiento del material vegetal y el suelo</i> .....	41
3.7.3.	<i>Inoculación de las plantas de banano con las suspensiones bacterianas</i> .....	41
3.7.4.	<i>Aplicación del inductor de resistencia y el fungicida químico</i> .....	42
3.7.5.	<i>Evaluación de la enfermedad</i> .....	42
3.8.	RECUPERACIÓN DE BAFES Y BACTERIAS TOTALES EN PLANTAS DE BANANO....	44
3.9.	RECUPERACIÓN DE NEMÁTODOS.....	44
3.10.	PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL.....	45
3.11.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	46
<b>4.</b>	<b>ANÁLISIS Y DISCUSIÓN</b> .....	<b>47</b>
4.1.	MÉTODO DE INFECCIÓN ARTIFICIAL DE PLANTAS DE BANANO CON <i>M. fijiensis</i> ....	47
4.2.	PRUEBAS DE ANTAGONISMO CONTRA <i>M. fijiensis</i> A NIVEL <i>in vitro</i> .....	48
4.3.	EFECTO DE RIZOBACTERIAS BAFES SOBRE LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD A NIVEL <i>IN-VIVO</i> .....	55
4.3.1.	<i>Factores ambientales</i> .....	55
4.3.2.	<i>Índice de infección (I), tasa de desarrollo y HMJM</i> .....	56
4.4.	EFECTO DE LAS RIZOBACTERIAS BAFES SOBRE LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO EN PLANTAS DE BANANO A NIVEL <i>IN VIVO</i> .....	60
4.5.	RECUPERACIÓN DE BACTERIAS TOTALES Y BAFES A NIVEL RADICAL DE PLANTAS DE BANANO.....	65
<b>5.</b>	<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>67</b>
<b>6.</b>	<b>RECOMENDACIONES</b> .....	<b>69</b>
	<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>70</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>81</b>

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Grados establecidos para cuantificar el porcentaje de infección de la planta.....	20
<b>Tabla 2.</b> Antecedentes del uso de PGPR y antagonismo contra <i>M. fijiensis</i> .....	26
<b>Tabla 3.</b> Tratamientos para la prueba de antagonismo contra <i>M. fijiensis</i> mediante la técnica de micelio expandido.....	36
<b>Tabla 4.</b> Tratamientos para la prueba de antagonismo contra <i>M. fijiensis</i> por la técnica de cultivo sumergido (microplatos). ....	37
<b>Tabla 5.</b> Tratamientos para la prueba de antagonismo contra <i>M. fijiensis</i> mediante la técnica de inhibición del tubo germinativo de las ascosporas.....	39
<b>Tabla 6.</b> Tratamientos para las pruebas a nivel <i>in vivo</i> en platas de banano cv. Gran enano. ....	40
<b>Tabla 7.</b> Variables de respuesta evaluadas en promoción de crecimiento. ....	46
<b>Tabla 8.</b> Recuperación de bacterias totales y BAFEs del suelo rizosférico de plantas de banano cv. Gran enano. ....	66

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Desarrollo de los síntomas de la Sigatoka negra.....	17
<b>Figura 2.</b> Ciclo de vida del hongo <i>M. fijiensis</i> causante la Sigatoka negra. ....	18
<b>Figura 3.</b> Escala de evaluación de severidad de la enfermedad de Stover modificada por Gauhl (1989). ....	19
<b>Figura 4.</b> Orden creciente de resistencia a desinfección de diferentes microorganismos. ....	22
<b>Figura 5.</b> Sección transversal de una espora de <i>B. subtilis</i> .....	23
<b>Figura 6.</b> Resistencia sistémica inducida en plantas por microorganismos no patogénicos.....	25
<b>Figura 7.</b> Síntomas de la enfermedad de la Sigatoka negra observados 50 DDI en el envés de plantas de banano cv. Gran enano. ....	47
<b>Figura 8.</b> Efecto de los diferentes extractos bacterianos libres de células sobre el tamaño de diámetro de colonia de <i>M. fijiensis</i> en medio sólido.....	50

## LISTA DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1.</b> Curvas de calibración UFC/mL de los aislados evaluadas a nivel <i>in vivo</i> . .....	34
<b>Gráfica 2.</b> Inhibición del crecimiento micelial de <i>M. fijiensis</i> en cultivo sumergido tratado con diferentes extractos bacterianos libres de células.....	52
<b>Gráfica 3.</b> Inhibición del tubo germinativo de las ascosporas de <i>M. fijiensis</i> tratadas con diferentes extractos bacterianos libres de células. ....	53
<b>Gráfica 4.</b> Datos climáticos de las instalaciones de AUGURA. ....	56
<b>Gráfica 5.</b> Índice de infección en el tiempo de la enfermedad de la Sigatoka negra en plantas de banano cv. Gran enano tratadas con diferentes rizobacterias aeróbicas formadoras de endospora bajo condiciones <i>in vivo</i> .....	57
<b>Gráfica 6.</b> Área bajo la curva de la incidencia de la enfermedad de la Sigatoka negra en plantas de banano cv. Gran enano tratadas con diferentes rizobacterias aeróbicas formadoras de endospora bajo condiciones <i>in vivo</i> .....	58
<b>Gráfica 7.</b> Tasa de desarrollo de la enfermedad de la Sigatoka negra en plantas de banano cv. Gran enano tratadas con rizobacterias aeróbicas formadoras de endospora bajo condiciones <i>in vivo</i> .....	59
<b>Gráfica 8.</b> Efecto de rizobacterias aeróbicas formadoras de endospora sobre la promoción de crecimiento del peso fresco total (WFT) en banano cv. Gran enano. ....	61
<b>Gráfica 9.</b> Efecto de rizobacterias aeróbicas formadoras de endospora sobre la promoción de crecimiento localizado de banano cv. Gran enano.....	63

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXO I.</b> Datos y análisis estadístico para la prueba de crecimiento de micelio expandido.....	81
<b>ANEXO II.</b> Datos y análisis estadístico para la prueba de crecimiento en cultivo sumergido .....	83
<b>ANEXO III.</b> Datos y análisis estadístico para la prueba de tubo germinativo de las ascosporas ...	85
<b>ANEXO IV.</b> Análisis estadístico para la variable área bajo la curva (ABC) .....	86
<b>ANEXO V.</b> Análisis estadístico para la variable tasa de desarrollo de la enfermedad (r) .....	88
<b>ANEXO VI.</b> Análisis estadístico para la variable hoja más joven manchada (HMJM).....	89
<b>ANEXO VII.</b> Análisis estadístico para la variable peso fresco total (WFT) .....	90
<b>ANEXO VIII.</b> Análisis estadístico para la variable longitud aérea (LA) .....	90
<b>ANEXO IX.</b> Análisis estadístico para la variable diámetro aéreo (DA) .....	93
<b>ANEXO X.</b> Análisis estadístico para la variable peso fresco aéreo (WFA).....	95
<b>ANEXO XI.</b> Análisis estadístico para la variable longitud radical (LR) .....	96
<b>ANEXO XII.</b> Análisis estadístico para la variable peso fresco radical (WFR) .....	98
<b>ANEXO XIII.</b> Análisis estadístico para la variable diámetro de corno (DC) .....	99
<b>ANEXO XIV.</b> Análisis estadístico para la variable peso fresco de corno (WFC).....	101
<b>ANEXO XV.</b> Análisis estadístico para la variable peso fresco de las hojas (WFH) .....	102
<b>ANEXO XVI.</b> Análisis estadístico para la recuperación de bacterias totales .....	104
<b>ANEXO XVII.</b> Análisis estadístico para la recuperación de BAFEs.....	105
<b>ANEXO XVIII.</b> Formatos utilizados en las pruebas <i>in vivo</i> .....	107

## RESUMEN

La Sigatoka negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, es actualmente considerada una de las enfermedades foliares más destructivas en plantaciones de banano a nivel mundial, provocando grandes pérdidas en los rendimientos de los cultivos y aumentando la necesidad de implementar estrategias de control químico perjudiciales para la salud humana y el medio ambiente. Con el fin de contribuir con un futuro sostenible, esta investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de Bacterias Aeróbicas formadoras de Endospora (BAFEs) sobre el crecimiento y desarrollo del hongo *M. fijiensis* causante de la Sigatoka negra en banano (*Musa AAA*), como una alternativa de control biológico. La primera etapa consistió en la realización de pruebas de antagonismo *in vitro* evaluando el crecimiento de micelio expandido en medio sólido, la inhibición del crecimiento micelial en cultivo sumergido y la inhibición del tubo germinativo utilizando nueve (9) BAFEs aisladas de la rizosfera del Urabá antioqueño; de las cuales los aislados EA129, EA85 y la cepa de *B.subtilis* EA123 presentaron los mejores resultados con porcentajes de inhibición de 36.7%, 93% y 50% (EA129); 44.3%, 87% y 67% (EA85) y 38.8%, 89% y 54% (EA123) respectivamente para cada prueba. Luego de analizar la capacidad productora de sideróforos y Ácido Indol Acético (AIA) como procedimiento adicional, se eligieron los aislados EA129 y EA85 para la realización de la segunda etapa de la investigación que consistió en evaluar la capacidad para reducir la incidencia de la enfermedad y la promoción de crecimiento vegetal a nivel *in vivo* en plantas de banano cv. Gran enano. En cuanto a promoción de crecimiento vegetal, el aislado EA85 mostró tener la mayor capacidad promotora de crecimiento, aumentando el peso fresco de las plantas en un 52,5% con respecto al control absoluto. Los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos evaluados para las pruebas de antagonismo a nivel *in vivo*, mostraron que la aplicación de Boost® 500 presentó el menor índice de infección

así como la menor tasa de desarrollo de la enfermedad, sin embargo no se presentaron diferencias significativas entre los tratamientos. En general aunque los aislados evaluados no mostraron diferencias significativas en cuanto a la incidencia de la enfermedad, el aislado EA85 si mostró un retraso en la propagación de la misma lo que sugiere que posiblemente se pudo haber producido un mecanismo de resistencia sistémica inducida; lo cual no fue demostrado. Adicionalmente, el aislado EA85 promovió el crecimiento vegetal posiblemente estimulado por la producción de AIA o algún otro mecanismo que incentivó el desarrollo de las plantas. Por lo tanto, este aislado puede ser de gran utilidad para futuras investigaciones.

## INTRODUCCIÓN

Durante los últimos años la Sigatoka negra se ha caracterizado por ser la enfermedad más destructiva y agresiva en plantaciones de banano a nivel mundial, ocasionando grandes pérdidas en las regiones productoras y modificando los programas para el control y tratamiento de los cultivos (Orozco *et al.*, 2002).

Para combatir esta enfermedad se depende básicamente del uso de productos químicos, representando un valor del 40% al 60% del costo total de la producción de banano y ocasionando resistencia del hongo a los fungicidas utilizados. El uso excesivo de productos agroquímicos para controlar enfermedades fúngicas ha provocado a través de los años la resistencia de estas, la aparición de organismos secundarios, acumulación de residuos en el medio ambiente, destrucción de la flora y fauna silvestre benéfica e intoxicaciones y enfermedades en el hombre (Arzate *et al.*, 2006).

Esta situación ha promovido la búsqueda de medidas biológicas con el fin de disminuir el uso de productos químicos para el control de enfermedades y plagas en el sector agrícola, desarrollando productos antagonistas que actúen en contra de los patógenos causantes de las enfermedades y buscando además la seguridad alimenticia al adquirir productos libres de compuestos tóxicos (Arzate *et al.*, 2006).

La tecnología utilizada en los cultivos de banano está en constante evolución y transformación en cuanto a aspectos climáticos, siembra, control de maleza y cosecha de cultivos. Actualmente se realizan investigaciones para la implementación de técnicas biotecnológicas en banano, buscando así el mejoramiento genético y el control de enfermedades y plagas. Una alternativa ha sido el uso de productos de origen vegetal, animal o microbial que ejercen un

control biológico sobre los patógenos por medio de sus metabolitos secundarios, y por otro lado, a través del concepto de resistencia sistémica inducida o adquirida. Normalmente las plantas están expuestas a todo tipo de factores ambientales y a una gran variedad de microorganismos patógenos que las atacan. En contraposición, estas plantas tienen la capacidad de responder a estos factores por medio de diferentes estrategias de defensa que dependen tanto de su constitución genética como de la del microorganismo patógeno (Armendariz, 2002; Riveros *et al.*, 2001). En este sentido, el uso de BAFEs como agentes de control biológico, representa una alternativa viable a ser evaluada dadas sus características de eficiencia contra fitopatógenos foliares y sus propiedades de resistencia ante condiciones adversas del medio ambiente que les permiten vivir más tiempo en comparación con otros microorganismos presentes en el entorno (Horneck *et al.*, 2001; Ponce *et al.*, 2008; Shoda, 2000).

Esta investigación busca evaluar el efecto que ejercen las BAFEs sobre el hongo *M. fijiensis* en plantas de banano en condiciones *in vitro* e *in vivo* y observar el efecto promotor de crecimiento ejercido en las plantas a nivel *in vivo*. Para lograr este objetivo, se evaluaron los aislados seleccionados y se recolectó la información *in vitro* e *in vivo* a través de evaluaciones periódicas para cada uno de los ensayos con el fin de conocer los efectos antagonistas de los aislados y la incidencia y severidad de la enfermedad y determinar el control biológico sobre la Sigatoka negra en banano.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de rizobacterias aeróbicas formadoras de endospora contra *M. fijiensis* mediante pruebas *in vitro* y en plantas de banano a nivel *in vivo*.

### 1.2. ESPECÍFICOS

- Valorar el efecto de las rizobacterias aeróbicas formadoras de endospora sobre el hongo *M. fijiensis* para determinar su posible inhibición mediante la realización de pruebas *in vitro*.
- Evaluar el efecto de las rizobacterias aeróbicas formadoras de endospora sobre el hongo *M. fijiensis* para determinar su posible inhibición mediante la realización de pruebas en plantas de banano a nivel *in vivo*.
- Evaluar la capacidad para promover crecimiento vegetal por rizobacterias aeróbicas formadoras de endospora en plantas de banano a nivel *in vivo*.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. EL CULTIVO DE BANANO (*Musa AAA*)

Posiblemente el banano sea la planta cultivada más antigua del mundo. Hace más de tres mil años, se mencionaba en escritos chinos como uno de los primeros alimentos del hombre primitivo. Los antiguos lo llamaban “fruta de los hombres sabios” (*Musa sapiens*), por sus cualidades nutricionales superiores. (A.E.B.E, 2005). Esta planta monocotiledónea se originó en el sudeste de Asia, Indonesia, Filipinas y Papúa Nueva Guinea. Las especies con semillas, que existían, *Musa acuminata* y *Musa balbisigna*, migraron a la península de la India, África Oriental y las islas del Pacífico. Con la ayuda de los exploradores, colonizadores y misioneros, se propagó por todo el mundo y se diversificó gradualmente, perdiendo sus semillas y llenándose de pulpa. A finales del siglo IX, comenzó la demanda por el banano dulce o ‘Gross Michel’. Esta variedad comenzó a desaparecer a causa del mal de ‘Panamá’, que invadió las plantaciones en 1940 y en 1960, hoy en día estos cultivos se han reemplazado por aquellos del grupo Cavendish resistentes a *Fusarium oxysporum*, hongo patógeno causante de esta enfermedad. (Uniban, 2005)

La producción del banano dulce es la segunda más alta de todas las frutas del mundo, después de la de la naranja y seguida por la de la uva y ocupan el cuarto lugar de importancia, a nivel mundial, en frutos comestibles, después del arroz, el cereal y el maíz. Los principales mercados para exportación de banano y plátano son Norte América, la Comunidad Europea, Japón y países de Europa Oriental y la antigua USSR (Uniban, 2005)

En Colombia se produce y comercializa dos tipos de banano: banano de exportación y banano criollo o de consumo interno. En relación al banano de

exportación tipo Cavendish y Valery, la agroindustria bananera se ha desarrollado como una cadena agroexportadora tradicional, generando importantes divisas para el país, manteniendo su posición como exportadora neta, después del café y las flores, con valores de exportación que han oscilado entre US\$ 400 y US\$ 444 millones desde 1995, situándose como el tercer país Latinoamericano en exportación de banano (Espinal *et al.*, 2005). En 2007 se reportaron 42,287 hectáreas sembradas con banano tipo exportación en las zonas productoras del país concentradas en los departamentos de Antioquia (región de Urabá) y Magdalena, cerca de la ciudad de Santa Marta, aspecto de gran importancia en la cadena productiva de alimentos de exportación en el país (Augura, 2007).

Debido a la gran diversidad genética para las especies de banano y plátano los cultivos se han visto afectados durante mucho tiempo por diferentes plagas y enfermedades como: Los ataques producidos por insectos como el picudo del banano, el coquito (*Colaspis hipochlora*), el ácaro del banano, (*Tetranychus lambi*), entre otros; los nemátodos que atacan los rizomas causando su podredumbre; enfermedades causadas por bacterias como el hereque o *Moko* bacteriano producido por *Ralstonia solanacearum*; afecciones causadas por virus como el BBTV (*banana bunchy top virus*) que retrasa el crecimiento de las hojas dándoles una forma corta, rígida y erecta con los márgenes endurecidos y quebradizos; y finalmente enfermedades causadas por hongos como la enfermedad del mal de Panamá, la Sigatoka amarilla y la Sigatoka negra producidas por *Fusarium oxysporum*, *Mycosphaerella musícola* y *Mycosphaerella fijiensis* Morelet respectivamente (Pérez, 1996).

## **2.2. *Mycosphaerella fijiensis* Y LA ENFERMEDAD DE LA SIGATOKA NEGRA**

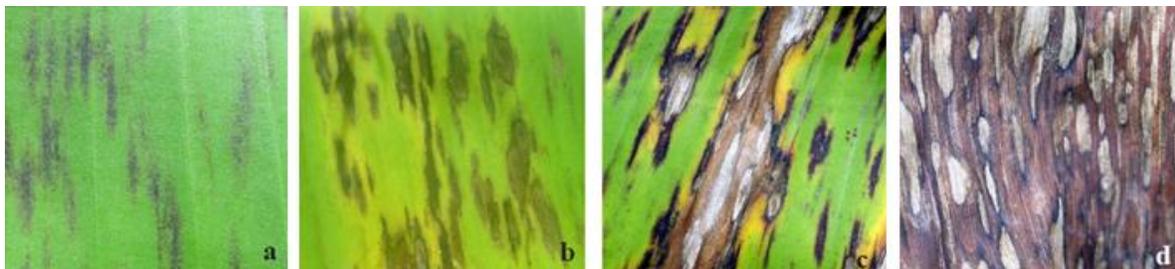
Los cultivos de banano se encuentran catalogados entre los productos del comercio agrícola más importantes en el mundo. La productividad en las cosechas se ha visto reducida debido a la presencia de la Sigatoka Negra, producida por el hongo ascomicete *M. fijiensis* (Mourichon *et al.*, 1997; Vásquez *et al.*, 1988). Esta

enfermedad es actualmente uno de los principales problemas fitopatológicos en banano que afectan al sector en relación al banano de exportación, ya que en ausencia de un control exhaustivo, los frutos obtenidos de plantas infectadas no cumplen las características requeridas, generando así millonarias pérdidas en fruta repicada (30%-50%) (Hoyos, 2007; Stansbury *et al.*, 2000). En vista de esto, el sector bananero establece programas de mantenimiento y control que requieren del uso excesivo de fungicidas, los cuales son responsables de alteraciones ambientales y de la salud humana; ya que en el caso contrario, cuando no se le combate, la Sigatoka negra afecta el crecimiento y productividad de las plantas convirtiéndose en la mayor causa de pérdidas del sector (Reigart *et al.*, 1999; Stansbury *et al.*, 2000).

Las primeras apariciones de Sigatoka negra (sinónimo de “raya negra”) se dieron en América en el año 1972 en el Valle de “Ulúa” en Honduras extendiéndose más tarde hasta las regiones bananeras de América Latina entrando por Colombia en 1981 (Marín *et al.*, 2003). Esta enfermedad ataca específicamente los tejidos de las hojas de las plantas de banano y plátano causando necrosis, afectando su capacidad fotosintética y provocando una maduración prematura de sus frutos (Espinal *et al.*, 2005; Stansbury *et al.*, 2000). Adicionalmente, la Sigatoka negra es característica de los cultivos ubicados en zonas húmedas y lluviosas y se manifiesta con manchas pálidas en las hojas que son visibles después de 15 o 20 días de la infección inicial, que luego se oscurecen y se propagan a lo largo de toda su área (Figura 1) (Craenen *et al.*, 1998; Stansbury *et al.*, 2000).

**Figura 1. Desarrollo de los síntomas de la Sigatoka negra.**

a. Etapa raya leve, b. Etapa de mancha temprana, c. Etapa de manchas con centro muerto de color gris  
d. Etapa de hoja muerta cubierta con manchas. Fuente: ASCC, 2004.

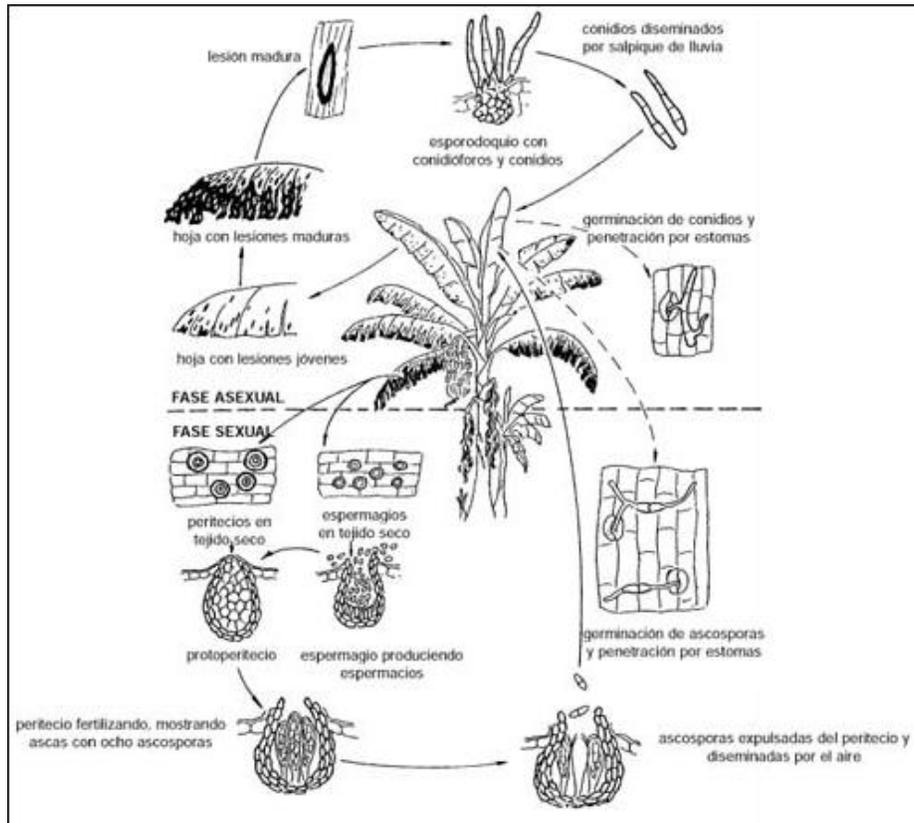


Generalmente, estos síntomas se han observado en especies de *Musa* (Banano), *Musa paradisiaca* (Plátano) y *Musa acuminata* (Banano salvaje), las cuales difieren en la reacción frente al patógeno y en la manera como este se manifiesta. Es posible que existan otras especies o subespecies de *Musa* que hayan sido infectadas por Sigatoka negra, pero no son muy conocidas debido a que presentan sintomatologías poco significativas con respecto a las más comunes mencionadas anteriormente (Stansbury *et al.*, 2000).

El agente causal de la Sigatoka negra es el hongo *M. fijiensis*, el cual se reproduce generalmente bajo altas condiciones de humedad y tiene dos maneras para hacerlo durante su ciclo de vida, ambas igualmente eficientes para producir la enfermedad: La forma sexual (cuya estructura se denomina “ascospora”) y la forma asexual (cuya estructura se denomina “conidios”) (Figura 2). La producción de conidios es relativamente baja, por lo tanto las ascosporas son consideradas en mayor proporción como causantes de la enfermedad y su propagación, además, conllevan un mayor número de ciclos sexuales por año y una tasa elevada de colonización de tejidos que hacen que la Sigatoka negra predomine rápidamente sobre otras enfermedades foliares del banano menos agresivas (Hoyos, 2007; Marín *et al.*, 2003).

**Figura 2. Ciclo de vida del hongo *Mycosphaerella fijiensis* causante la Sigatoka negra.**

Fuente: CATIE, 2006



Las ascosporas de *M. fijiensis* germinan especialmente sobre el envés de las hojas, penetran con sus hifas por los estomas e inician un proceso rápido de colonización (48-72 horas) (Hidalgo *et al.*, 2006; Marín *et al.*, 2003). La mayor descarga de ascosporas de *M. fijiensis* está relacionada con la época de lluvias y la formación de rocío sobre las hojas ya que su principal medio de propagación es el viento y las corrientes de agua, mientras que en épocas de sequía su liberación se reduce notablemente debido a las condiciones climáticas desfavorables para su desarrollo. No obstante, los conidios también son capaces de generar los mismos síntomas de la enfermedad en grandes proporciones, inclusive durante los periodos de sequía (Orozco *et al.*, 2002; Marín *et al.*, 2003).

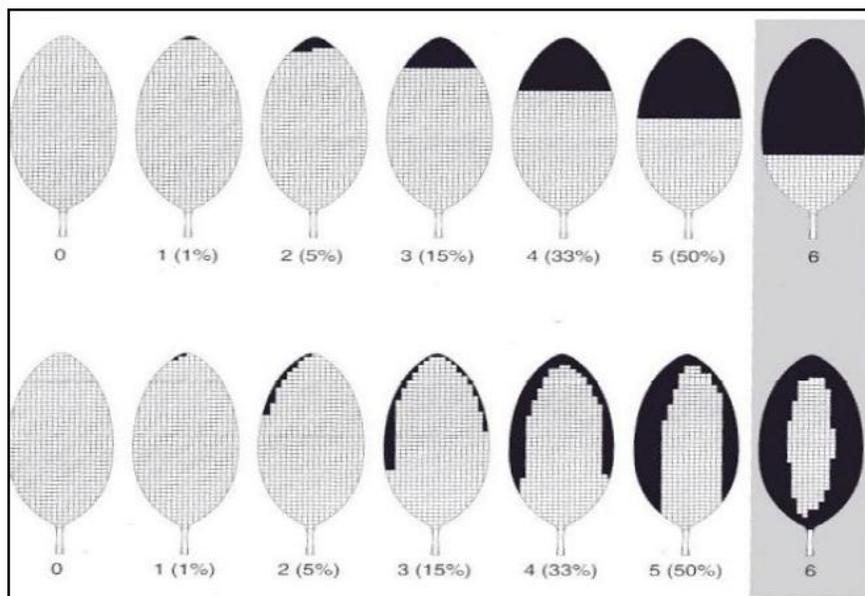
### 2.2.1. Escala de medición de Stover para la evaluación de severidad de la Sigatoka negra

La evaluación de incidencia y severidad de la Sigatoka negra por medio de la escala de medición de Stover (modificada por Gauhl en 1989), permite obtener información detallada acerca de la situación sanitaria de la planta y la evolución de la enfermedad en el tiempo. La severidad de la enfermedad se refiere a la extensión del área de la hoja infectada por el patógeno de la Sigatoka negra, la cual puede expresarse en grados que corresponden al porcentaje de hoja enferma. (Carlier *et al.*, 2002; Orjeda, 1998).

La figura 3 muestra los siete grados que incluye la escala de Stover (modificada por Gauhl en 1989) y en la tabla 1 se describe e identifica de forma detallada las proporciones porcentuales correspondientes al daño de la hoja para cada uno de los grados de la escala.

**Figura 3. Escala de evaluación de severidad de la enfermedad de Stover modificada por Gauhl (1989).**

Fuente: Carlier *et al.*, 2002



**Tabla 1. Grados establecidos para cuantificar el porcentaje de infección de la planta.**

Fuente: Carlier *et al.*, 2002.

Grado	Descripción del daño en la hoja
0	Hoja completamente sana.
1	Hasta 1% del área foliar enferma.
2	Menos del 5% del área foliar enferma.
3	De 6 a 15% del área foliar enferma.
4	De 16 a 33% del área foliar enferma.
5	De 34 a 50% del área foliar enferma.
6	Más del 50% del área foliar enferma.

La evaluación de la severidad de la enfermedad generalmente consiste en la estimación visual del área foliar afectada en todas las hojas de las plantas, y se realiza con el fin de determinar el índice de infección de cada planta en cada repetición y en cada una de las etapas de su crecimiento. Este índice es calculado en función del número total de hojas evaluadas y sus respectivas mediciones de severidad en un tiempo estimado (Orjeda, 1998).

### **2.3. LAS RIZOBACTERIAS**

La rizosfera es la zona de mayor actividad microbiológica alrededor de las raíces de las plantas donde ocurren interacciones entre los exudados radicales y los microorganismos que se encuentran en ella. Estos exudados son nutrientes para las poblaciones bacterianas presentes permitiendo una colonización alrededor de las raíces (Choudhary *et al.*, 2007; Pieterse *et al.*, 1999 y 2000).

Algunas rizobacterias son bacterias colonizadoras de las superficies de las raíces y producen promoción de crecimiento vegetal (Pieterse *et al.*, 1999; Kloepper *et al.*, 1999). Además, se ha demostrado que reducen y suprimen los microorganismos patógenos del suelo a través de mecanismos de competencia por nutrientes, convirtiéndose en una técnica de control biológico muy efectiva a nivel de campo (Pieterse *et al.*, 2000).

En los años 1970's se inició el estudio de bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs de las siglas en inglés Plant Grow Promoting rhizobacteria) con las investigaciones sistemáticas y rigurosas conducidas en la Universidad de California en Berkeley (USA) (Schroth y Becker, 1990); siendo este término definido en primera instancia por Kloepper *et al.*, (1980) para describir las bacterias que colonizan agresivamente las raíces y que actúan como agentes estimulantes del crecimiento contribuyendo a mantener un equilibrio saludable entre el suelo y la planta colonizando la superficie de la raíz y adhiriéndose estrechamente a la interfaz del suelo. (Schroth y Hancock, 1981 y 1982). En años recientes se ha creado controversia respecto al tema de cuándo considerar a una rizobacteria como PGPR y se han establecido algunas características que definen a este grupo: en primer lugar, deben tener una elevada densidad poblacional en la rizosfera después de su inoculación en las plantas, ya que una población que declina rápidamente tiene una baja capacidad competitiva con la microflora nativa del suelo; segundo, deben poseer una capacidad de colonización efectiva en la superficie de la raíz y, como consecuencia, puedan influir positivamente en el crecimiento de la planta. Además, que puedan controlar de manera natural y eficiente a otros microorganismos del suelo capaces de enfermar a las plantas; y por último, que no produzcan daño en el hombre. (Hernández y Escalona, 2003).

La promoción de crecimiento producida por las PGPRs puede ser llevada a cabo a través de mecanismos directos como son: la toma de nutrientes, la fijación de Nitrógeno (reducción de  $N_2$  a  $NH_3$ ), la producción de hormonas de crecimiento como auxinas, citoquininas y giberelinas, la solubilización de minerales como fosfatos y la oxidación de azufre, entre otros. Las PGPR pueden suprimir enfermedades a través del antagonismo entre las bacterias y los agentes patógenos del suelo por medio de mecanismos indirectos, como: la producción de sideróforos, antibióticos, secreción de enzimas líticas como glucanasas y quitinasas, la liberación de compuestos volátiles como HCN y la inducción de resistencia sistémica (Holgún *et al.*, 2003; Vessey, 2003; Choudhary *et al.*, 2007).

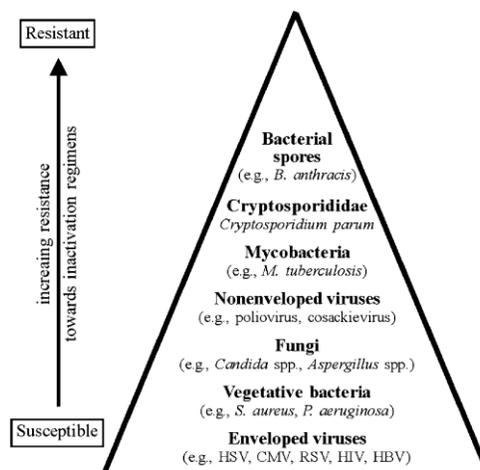
Es por esto que durante años se han venido estudiando este grupo de bacterias debido a su capacidad de generar incrementos en el desarrollo y productividad de los cultivos, así como la disminución significativa de problemas patológicos a nivel de campo (Burr *et al.*, 1978; Kloepper *et al.*, 1980; Bowen y Rovira, 1999; Raupach y Kloepper, 2000; Zahir *et al.*, 2004).

## 2.4. BACTERIAS AERÓBICAS FORMADORAS DE ENDOSPORA (BAFES)

Las bacterias formadoras de endospora hacen parte de las bacterias más dominantes, activas y reproductivas de la rizosfera de cultivos agrícolas. Estas se caracterizan principalmente por su capacidad de supervivencia ante condiciones climáticas adversas como temperatura extrema, radiación UV, agentes oxidantes y corrosivos, sequías, fuertes lluvias, y procesos de esterilización, en comparación con otros microorganismos del entorno (Figura 4). Generalmente son utilizadas en áreas investigativas como agentes biocontroladores de microorganismos patógenos, debido a su capacidad de producir metabolitos y componentes antifúngicos que suprimen y restringen el crecimiento de los mismos inclusive causando su muerte (Shoda, 2000; Horneck *et al.*, 2001).

**Figura 4. Orden creciente de resistencia a desinfección de diferentes microorganismos.**

Fuente: Ponce *et al.*, 2008.

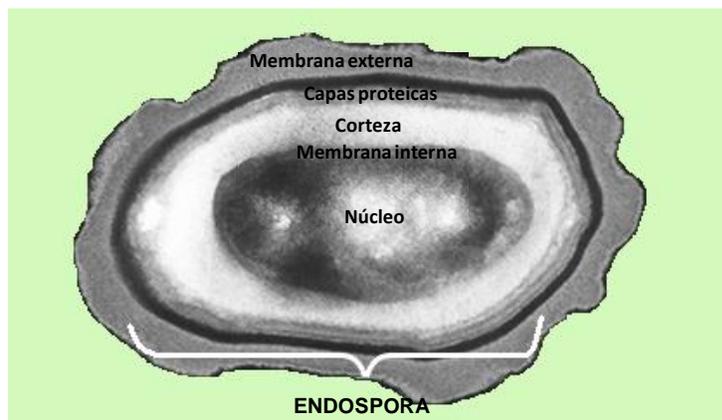


A través de los años, las esporas de las BAFEs han sido reconocidas como la forma de vida más resistente en la tierra. Su desarrollo y formación generalmente se presenta cuando existe una alta densidad poblacional de células vegetativas que se encuentran en un estado de estrés provocado por el agotamiento de los nutrientes de su entorno; aunque en presencia de nutrientes apropiados, incluida el agua, la endospora es capaz de responder rápidamente por germinación y reanudar el crecimiento vegetativo de dicha célula. Por lo tanto, la formación de esporas representa una estrategia cuando una bacteria escapa temporalmente de las condiciones nutritivas desfavorables, es decir, se traslada a través del viento o corrientes de agua hacia zonas remotas (Horneck *et al.*, 2001; Ponce *et al.*, 2008).

La alta resistencia de las endosporas es debida principalmente a dos factores: (i) el núcleo se encuentra encerrado por una gruesa corteza protectora, (ii) la síntesis de ADN-proteico encargado de reparar los procesos celulares, el cual se activa durante la germinación. El ADN de las endosporas (Figura 5) se encuentra contenido en el núcleo cubierto por una corteza protectora (capa gruesa de color blanco). La cual a su vez se encuentra cubierta por capas protéicas que la protegen de la lisis. (Horneck *et al.*, 2001; Ponce *et al.*, 2008).

**Figura 5. Sección transversal de una espora de *B. subtilis*.**

Fuente: Horneck *et al.*, 2001.



Las bacterias del género *Bacillus* son las más utilizadas como agentes antagonistas por sus características de omnipresencia en suelos, tolerancia a altas temperaturas y formación de esporas resistentes. Además, juegan un papel importante en el control biológico de enfermedades agrícolas ya que son cepas productoras de sideróforos, antibióticos y otras sustancias orgánicas que ejercen una supresión significativa sobre los patógenos de las plantas (Shoda, 2000).

## **2.5. RESISTENCIA INDUCIDA (ISR Y SAR)**

La resistencia inducida es un "estado fisiológico" de incremento de la capacidad defensiva de la planta producida como respuesta a estímulos medioambientales específicos, por medio de los cuales las defensas innatas de ésta son potencializadas en contra de diversos patógenos. Las dos formas más claramente definidas de resistencia inducida son resistencia sistémica adquirida (SAR de las siglas en inglés "Systemic Acquired Resistance") y resistencia sistémica inducida (ISR de las siglas en inglés Induced Systemic Resistance), las cuales, aunque son sistemas fenotípicamente similares pueden ser diferenciadas con base en la naturaleza del microorganismo, del elicitador y las vías reguladoras involucradas (Choudhary *et al.*, 2007).

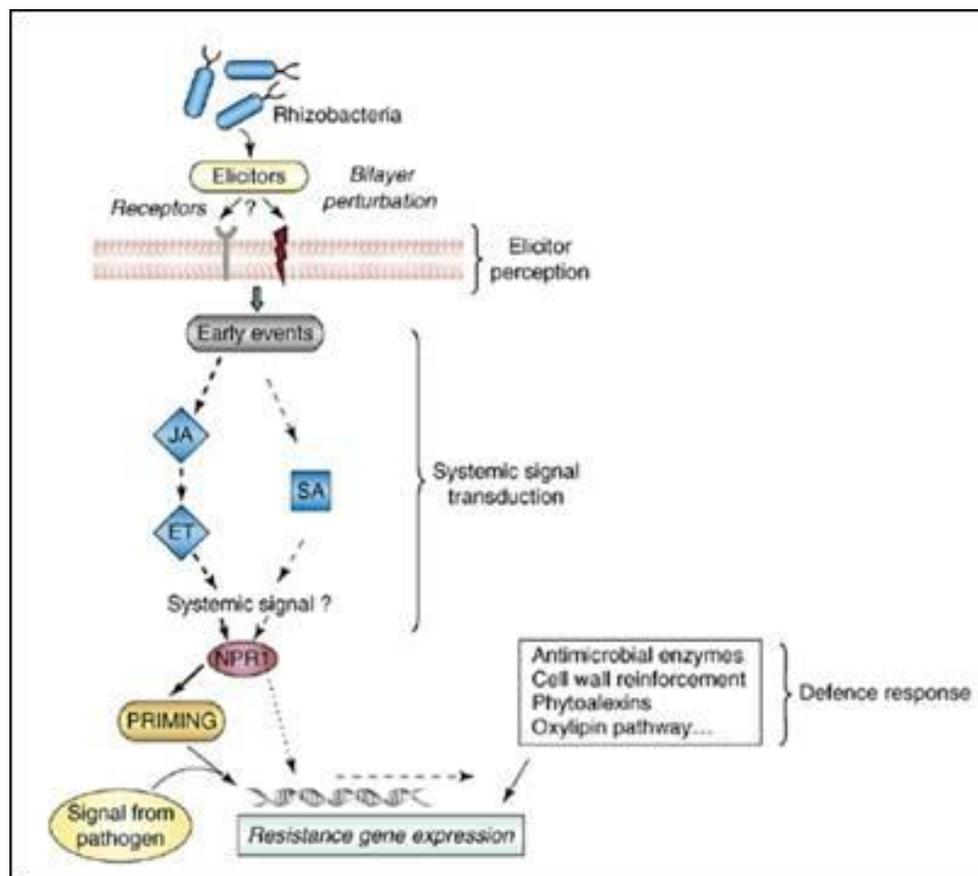
El SAR es un fenómeno de resistencia adquirida por la planta una vez ha sido infectada por un patógeno y ha logrado sobrevivir a este, volviéndose más resistente a nuevas inoculaciones de patógenos e inclusive de insectos (Van Loon *et al.*, 1998). Este mecanismo de defensa puede ser producido por patógenos o químicos (BTH, IMA), y posee una ruta de transducción de señal dependiente del ácido salicílico, y la expresión de sus genes convergen en la producción de proteínas PR, y en algunas ocasiones en respuestas hipersensitivas (localizadas).

Por otro lado el ISR, es una resistencia inducida por rizobacterias positivas o PGPRs, que genera mayor resistencia en la planta a posteriores inoculaciones de patógenos en tejidos distantes y locales (Kloepper, 1993). Se realiza por medio de

elicitores (Lipopolisacáridos (LPS), flagelos, sideróforos, ácido salicílico, compuestos volátiles entre otros), siendo sus rutas de transducción de señal dependientes del ácido jasmónico y el etileno (Figura 6) generando respuestas de defensa que podrían involucrar engrosamiento de la pared celular, producción de fitoalexinas y compuestos fenólicos en las células vegetales. Para que se pueda lograr el ISR es necesario que la colonización por PGPRs del sistema radicular sea lo suficientemente alta lo cual se logra recubriendo las semillas con un alto número de bacterias o por la adición de suspensiones bacteriales al suelo antes de trasplantar las mismas.

**Figura 6. Resistencia sistémica inducida en plantas por microorganismos no patogénicos.**

Fuente: Ongena y Jacques, 2008.



Finalmente ambas rutas confluyen en la proteína NPR1 la cual es esencial para el SAR y ISR, y posteriormente su proceso “downstream” diverge en dos respuestas diferentes: acumulación de proteínas PR y “priming” de genes de defensa respectivamente (Vallad y Goodman, 2004; Van Loon y Bakker, 2006).

En conclusión La expresión de ISR y el SAR se puede percibir en la disminución de la severidad de la enfermedad disminuyendo así el número de plantas enfermas. Esta reducción es asociada con la inhibición del crecimiento del agente patógeno y la colonización reducida de tejidos finos que se ve reflejada en el incremento de la habilidad de la planta para resistir los ataques de dicho patógeno (Choudhary *et al.*, 2007).

## 2.6. ANTECEDENTES DEL USO DE PGPRS Y ANTAGONISMO CONTRA *Mycosphaerella fijiensis*

En la tabla 2, se presentan una serie de investigaciones que han sido realizadas previamente al presente trabajo y aportaron una valiosa información para el desarrollo del mismo.

**Tabla 2. Antecedentes del uso de PGPR y antagonismo contra *M. fijiensis*.**

AUTOR (ES)	PROYECTO EVALUADO	OBJETIVO DE ESTUDIO	RESULTADOS OBTENIDOS
Arzate <i>et al.</i> , 2006.	Antagonismo de <i>Trichoderma</i> spp. Sobre <i>M. fijiensis</i> Morelet, agente causal de la Sigatoka negra del <b>plátano</b> ( <i>Musa</i> sp.) <i>in-vitro</i> e invernadero	Evaluar el efecto antagónico de 8 cepas nativas de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>M. fijiensis</i> a nivel <i>in-vitro</i> e invernadero.	De las 8 cepas evaluadas, a nivel <i>in-vitro</i> , 6 se ubicaron en la clase 1 del antagonismo, donde <i>Trichoderma</i> spp creció sobre el patógeno, cubriendo el 100% del medio de cultivo, mientras que las 2 cepas restantes presentaron antagonismo clase 3, donde ninguno de los hongos fue dominante. A nivel de invernadero, 2 de las 6 mejores cepas presentaron los menores porcentajes ponderados de infección con 0,70% y 0,80%, sobre el desarrollo de <i>M. fijiensis</i> ,

Barrios, 2006.	Estudio de hongos endofíticos como inductores de resistencia para el control de Sigatoka Negra ( <i>M. Fijiensis</i> Morelet) en <b>plátano</b> .	Evaluar la colonización, promoción de crecimiento y control de Sigatoka negra en plantas de plátano inoculadas con hongos endofíticos (HE), a nivel de invernadero.	<i>Colonización:</i> mayor porcentaje de HE en la raíz, seguido por el cormo, pseudotallo y hoja. <i>Promoción de crecimiento:</i> efecto positivo con la mezcla de cepas de HE (acción sinérgica). <i>Biocontrol:</i> <i>Fusarium oxysporum</i> fue el único que mostró un retraso de cinco días en el desarrollo de síntomas y evolución de la enfermedad comparado con el testigo.
Camacho, 1997	Evaluación de PGPB inductores de resistencia a Sigatoka negra ( <i>M. fijiensis</i> ) en <b>banano</b> ( <i>Musa</i> sp.) y algunas observaciones sobre la gutación.	Evaluar el efecto de los microorganismos aislados en la promoción de crecimiento a nivel <i>in-vitro</i> y en la inducción de resistencia a Sigatoka negra en banano en campo.	<i>La P. cepacia</i> exhibió los mayores incrementos en el área foliar a nivel de invernadero, mientras que los microorganismos promotores de crecimiento e inductores de resistencia evaluados, presentaron los mejores resultados a nivel de campo y la <i>P. fluorescens</i> fue tratamiento con el mejor de desempeño para reducir la severidad de la Sigatoka.
Miranda, 1996.	Evaluación de bacterias antagonistas al hongo <i>M. fijiensis</i> Morelet, colocados en el interior y exterior de la planta de <b>banano</b> .	Evaluar el efecto de microorganismos en el exterior de la planta a nivel de laboratorio, invernadero y campo, así como determinar la eficiencia de un método de ubicación endofítica	Las cepas del género <i>Bacillus</i> fueron más eficientes para la colonización del tejido interno de las plantas y las del género <i>Serratia</i> para el control de la enfermedad mediante aplicación foliar en combinación con aceite agrícola.
Ramírez et al., 2006	Diseño de un sistema de protección radicular y foliar, a partir de microorganismos presentes en la rizosfera de <b>banano</b> y <b>plátano</b> de los géneros: <i>Bacillus</i> y <i>Pseudomonas fluorescens</i> .	Realizar el aislamiento selectivo de PGPRs asociadas a raíces de banano y plátano y evaluar a nivel <i>in-vivo</i> la capacidad PGPR, el efecto sobre el ataque del nematodo barrenador y sobre el desarrollo de la Sigatoka negra con las 5 cepas que presentaron los mejores resultados a nivel <i>in-vitro</i> (patosistema frijol-antracnosis).	Colección de 105 bacterias aisladas en suelos del Urabá Antioqueño: 66 (género <i>Bacillus</i> ), 38 ( <i>Pseudomonas fluorescens</i> ) y 1 coco Gram variable (capacidad productora de quitinasas), 9 con potencial para inducir resistencia sistémica en el patosistema frijol-antracnosis, evidenciado en la sobrevivencia al ataque producido por una inoculación severa con el patógeno. Para los ensayos <i>in-vivo</i> en banano se evaluaron, las 5 mejores cepas correspondientes a 3 <i>Pseudomonas</i> y 2 <i>Bacillus</i> para las cuales se observó un aumento en la masa radical, un efecto en el desarrollo general de las plantas y un mecanismo de protección contra la Sigatoka negra.

<p>Zhinong <i>et al.</i>, 2002</p>	<p>Inducción de resistencia por medio de rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR) en contra de la enfermedad del Tizón tardío en plantas de <b>Tomate</b>.</p>	<p>Evaluación de resistencia sistémica en plantas de tomate por medio de las cepas <i>Bacillus pumilus</i> SE34 y <i>Pseudomonas fluorescens</i> 89B61 y un inductor de resistencia químico Acido <math>\beta</math>-aminobutírico (BABA), en contra de la enfermedad del Tizón tardío causada por <i>Phytophthora infestans</i> a nivel de invernadero.</p>	<p>Se obtuvo una reducción significativa en la germinación de esporas de <i>P. infestans</i> en la superficie de las hojas de tomate que fueron evaluadas con las cepas y el inductor químico BABA, con respecto al control no inducido. La falta de colonización en las hojas de tomate por la cepa 89B61 sugirió que la resistencia sistémica fue debida a sus metabolitos producidos más no a una interacción directa entre el patógeno y la cepa. En cambio, la cepa SE34 si se detecto en las hojas de las plantas, por lo tanto la resistencia ejercida pudo ser debida al contacto directo con el patógeno.</p>
<p>Liu, <i>et al.</i>, 1995</p>	<p>Inducción de resistencia sistémica en plantas de <b>pepino</b> a través de Rizobacterias promotoras de crecimiento vegetal (PGPR) y evaluación de la duración de la protección ejercida y el efecto de la resistencia en la colonización y protección de la raíz.</p>	<p>Evaluación de la duración del efecto de inducción de resistencia sistémica (ISR) en plantas de pepino a través de las cepas <i>Pseudomonas putida</i> 89B-27 y <i>Serratia marcescens</i> 90-166 en contra de la Antracnosis causada por <i>Colletotrichum orbiculare</i>.</p>	<p>La actividad de ISR ejercida por la cepa 89B-27 ocurrió en la primera etapa de la enfermedad aumentando hasta la quinta etapa donde permaneció constante. Mientras que para la cepa 90-166, la actividad fue menos estable y ocurrió en la segunda, cuarta y quinta etapa. Luego se evaluaron en tres cultivares de pepino susceptibles y uno resistente bajo condiciones de invernadero, para los cuales la cepa 89B-27 mostro ISR en todos los cultivares susceptibles, mientras que la cepa 90-166 únicamente en dos de ellos. Ambas cepas fallaron como inductoras de resistencia en el cultivar resistente evaluado. Por otro lado se determino que la colonización de raíz para ambas cepas decayó durante el ensayo, pero la cepa 90-166 lo hizo con mayor rapidez. Esto quiere decir que no hay una relación directa entre la actividad de ISR y la colonización de raíces para las dos cepas evaluadas, ya que la actividad de ISR aumentó todo el tiempo mientras que la colonización de bacterias disminuyo.</p>

Posada, 2009 (Datos no publicados)	Realización de pruebas bioquímicas para bacterias formadoras de endospora (BAFEs).	Determinar las concentraciones de producción de sideróforos y Acido Indol Acético (AIA), mediante las técnicas de Schwyn y Neilands (1987) y Patten y Glick (2002) respectivamente en 13 cepas de estudio.	Para las cepas evaluadas se presentaron los resultados que se muestran a continuación:																																																												
			<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">AIA</th> <th colspan="2">Sideróforos</th> </tr> <tr> <th> AISLADO</th> <th> CONC. (µg/mL)</th> <th> AISLADO</th> <th> CONC. (mM)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>EA 113</td> <td>39,05</td> <td>EA 98</td> <td>14,55</td> </tr> <tr> <td><b>EA 85</b></td> <td><b>23,67</b></td> <td><b>EA 85</b></td> <td><b>12,55</b></td> </tr> <tr> <td><b>EA 123</b></td> <td><b>19,58</b></td> <td>EA 113</td> <td>12,53</td> </tr> <tr> <td>EA 87</td> <td>18,92</td> <td>EA 229</td> <td>11,34</td> </tr> <tr> <td>EA 104</td> <td>18,08</td> <td><b>EA 129</b></td> <td><b>10,93</b></td> </tr> <tr> <td>EA 141</td> <td>17,96</td> <td>EA 250</td> <td>10,64</td> </tr> <tr> <td>EA 321</td> <td>16,81</td> <td>EA 141</td> <td>10,1</td> </tr> <tr> <td>EA 229</td> <td>14,67</td> <td>EA 321</td> <td>9,75</td> </tr> <tr> <td><b>EA 129</b></td> <td><b>14,6</b></td> <td>EA 94</td> <td>8,78</td> </tr> <tr> <td>EA 130</td> <td>14,25</td> <td>EA 130</td> <td>8,77</td> </tr> <tr> <td>EA 250</td> <td>11,84</td> <td>EA 104</td> <td>8,52</td> </tr> <tr> <td>EA 98</td> <td>5,82</td> <td>EA 87</td> <td>6,95</td> </tr> <tr> <td>EA 94</td> <td>0,64</td> <td><b>EA 123</b></td> <td><b>2,08</b></td> </tr> </tbody> </table>		AIA		Sideróforos		AISLADO	CONC. (µg/mL)	AISLADO	CONC. (mM)	EA 113	39,05	EA 98	14,55	<b>EA 85</b>	<b>23,67</b>	<b>EA 85</b>	<b>12,55</b>	<b>EA 123</b>	<b>19,58</b>	EA 113	12,53	EA 87	18,92	EA 229	11,34	EA 104	18,08	<b>EA 129</b>	<b>10,93</b>	EA 141	17,96	EA 250	10,64	EA 321	16,81	EA 141	10,1	EA 229	14,67	EA 321	9,75	<b>EA 129</b>	<b>14,6</b>	EA 94	8,78	EA 130	14,25	EA 130	8,77	EA 250	11,84	EA 104	8,52	EA 98	5,82	EA 87	6,95	EA 94	0,64	<b>EA 123</b>
AIA		Sideróforos																																																													
AISLADO	CONC. (µg/mL)	AISLADO	CONC. (mM)																																																												
EA 113	39,05	EA 98	14,55																																																												
<b>EA 85</b>	<b>23,67</b>	<b>EA 85</b>	<b>12,55</b>																																																												
<b>EA 123</b>	<b>19,58</b>	EA 113	12,53																																																												
EA 87	18,92	EA 229	11,34																																																												
EA 104	18,08	<b>EA 129</b>	<b>10,93</b>																																																												
EA 141	17,96	EA 250	10,64																																																												
EA 321	16,81	EA 141	10,1																																																												
EA 229	14,67	EA 321	9,75																																																												
<b>EA 129</b>	<b>14,6</b>	EA 94	8,78																																																												
EA 130	14,25	EA 130	8,77																																																												
EA 250	11,84	EA 104	8,52																																																												
EA 98	5,82	EA 87	6,95																																																												
EA 94	0,64	<b>EA 123</b>	<b>2,08</b>																																																												

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. LOCALIZACIÓN

Las pruebas *in vitro* se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología y en el invernadero de Sigatoka Negra de la Universidad EAFIT, Medellín. Las pruebas *in vivo* se llevaron a cabo en las instalaciones del Centro de investigaciones del banano (Cenibanano), AUGURA en el municipio de Carepa, Antioquia, localizado a 28 metros sobre el nivel del mar con temperatura y humedad relativa promedio de 28°C y 80% respectivamente.

#### 3.2. MATERIAL VIVO

Las plantas de banano de variedad Gran enano fueron compradas a la Universidad Católica de Oriente.

Para este trabajo se emplearon diez bacterias aeróbicas formadoras de endospora aisladas de la rizosfera del Urabá Antioqueño por Ramírez, 2009 (Datos no publicados) correspondientes a la cepa de *B. subtilis* EA123 y los aislados EA85, EA104, EA130, EA87, EA229, EA129, EA98, EA250. La cepa de *B. subtilis* UA321, fue aislada de la rizosfera de Crisantemo por Ramírez, 2008. Dichas cepas se seleccionaron con base a los resultados arrojados por pruebas bioquímicas previamente realizadas en el laboratorio de la Universidad EAFIT. Los aislados fueron conservados previamente en crioviales con TSB (Tryptic Soy Broth - Merck) y 20% de glicerol y almacenados en un freezer (New Brunswick Scientific U101 Innova) a -80°C.

Como microorganismo patógeno se trabajó con el hongo *M. fijiensis* (aislados DN1, DN2 y DN3) obtenido de tejido necrosado de hojas de plantas de banano

recolectadas por CENIBANANO en diferentes zonas del Urabá Antioqueño. Las muestras necrosadas se sometieron a una cámara de humedad según la metodología de Hidalgo (2006) y Riveros (2003). Luego de 48 h, los discos de papel kraft se situaron en la tapa superior de cajas petri apuntando hacia el agar simple al 2% durante 30 minutos con el fin de lograr la descarga de las ascosporas. Luego los discos de papel fueron retirados y las cajas se conservaron a una temperatura de  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas para facilitar la germinación de las ascosporas (Mourichon, 1997; Hidalgo, 2006; Riveros *et al.*, 2003).

Con ayuda de un estereomicroscopio (Nikon-SMZ645) y un asa de punta, las ascosporas germinadas fueron trasladadas a cajas petri con PDA (Potato Dextrose Agar-Merck) y cloranfenicol (250 ppm-Colmed International) con lo que se obtuvieron cultivos monospóricos que se incubaron a temperatura ambiente durante 8 a 10 días en condiciones de oscuridad. Transcurrido este tiempo, cada espora formó una colonia las cuales fueron trasladadas individualmente a nuevas cajas petri con las mismas condiciones mencionadas anteriormente. (Hidalgo, 2006).

### **3.3. DETERMINACIÓN DEL MEJOR MÉTODO DE INFECCIÓN ARTIFICIAL CON *M. fijiensis* EN PLANTAS DE BANANO**

Para la realización de este ensayo se realizaron dos protocolos con los cuales se buscó infectar plantas de banano (*Musa AAA*) con el hongo *M. fijiensis* de manera artificial. Los resultados arrojados por las dos técnicas fueron utilizados para determinar la metodología adecuada de infección que fue utilizada en el ensayo a nivel *in-vivo*.

### **3.3.1. Infección de plantas de banano con ascosporas de *M. fijiensis***

El primer método de infección (tratamiento 1) de las plantas de banano se basó en la metodología de Vásquez *et al.*, 1988 la cual se realizó infectando las hojas con una solución de ascosporas del hongo *M. fijiensis*. Para la obtención de estas, se cortaron segmentos de 2 cm<sup>2</sup> de una hoja de banano enferma en grado 6 de severidad (escala de severidad de Stover modificada por Gauhl en 1989). Los segmentos fueron adheridos a discos de papel kraft de 9 cm de diámetro y sometidos a una cámara de humedad la cual consistió en ubicar los discos sobre papel húmedo y luego empacarlos en una bolsa por 48 horas para favorecer la abertura de los peritecios (Hidalgo, 2006; Riveros, 2003). Posteriormente el papel kraft fue colocado en la tapa superior de una caja petri que contenía en su parte inferior 10 mL de agua destilada. Luego de realizar este montaje, las cajas petri se dejaron cerradas durante un período de 1 hora para que se ejecutara la descarga de ascosporas en el agua. Transcurrido este tiempo, el papel kraft fue retirado de la tapa superior y la solución de ascosporas fue mezclada con una solución IB (0,05% de Tween 20), 0,05% de Carbo-Metil Celulosa (CMC) y 2% de Medio Líquido Dothistromin (LDM) (25 g/L de extracto de malta (Oxoid) y 20 g/L de caldo nutritivo (Merck) (Vásquez *et al.*, 1988; Donzelli *et al.*, 2007). Finalmente la solución fue asperjada con atomizador como una capa fina sobre el envés de las hojas hasta cubrirlas en su totalidad. Las plantas fueron ubicadas de manera aleatoria en una cámara de humedad plástica realizada en el invernadero con una frecuencia de riego de 2 veces por día sin condiciones de temperatura ni humedad controladas. En las paredes superiores de la cámara se ubicaron pedazos de hojas necrosadas con el envés hacia abajo como una fuente adicional de inóculo para aumentar la carga del mismo (Vásquez *et al.*, 1988).

### **3.3.2. Infección de plantas de banano con fragmentos de micelio de *M. fijiensis***

El segundo método de infección (tratamiento 2) de las plantas de banano se basó en la metodología de Hoss *et al.*, 2000, la cual se realiza infectando las hojas con una solución de micelio obtenido por cultivo sumergido. Para la obtención del inóculo del hongo se empleó una cepa de *M. fijiensis* aislada de tejido foliar necrosado de banano suministrado por CENIBANANO. Los cultivos monospóricos con 15 días fueron el recurso para la obtención del inóculo del hongo para la infección. El inóculo se obtuvo a partir de la maceración de 12 colonias del hongo en tubos Falcon de 15 mL con 20 bolas de vidrio de 8 mm de diámetro suspendidas en 6 mL de agua estéril bajo la agitación de un vortex a 2200 rpm (Daigger G-560) durante 2 minutos (Donzelli *et al.*, 2007; Hoss *et al.*, 2000 y Peláez *et al.*, 2006). La suspensión de micelio fragmentado fue mezclada y homogenizada con solución BI y asperjada sobre el envés de las hojas hasta cubrir las en su totalidad y las plantas fueron ubicadas de manera aleatoria en un cámara de humedad bajo condiciones de temperatura ( $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ) y humedad relativa ( $85 \pm 2\%$ ) aproximadamente.

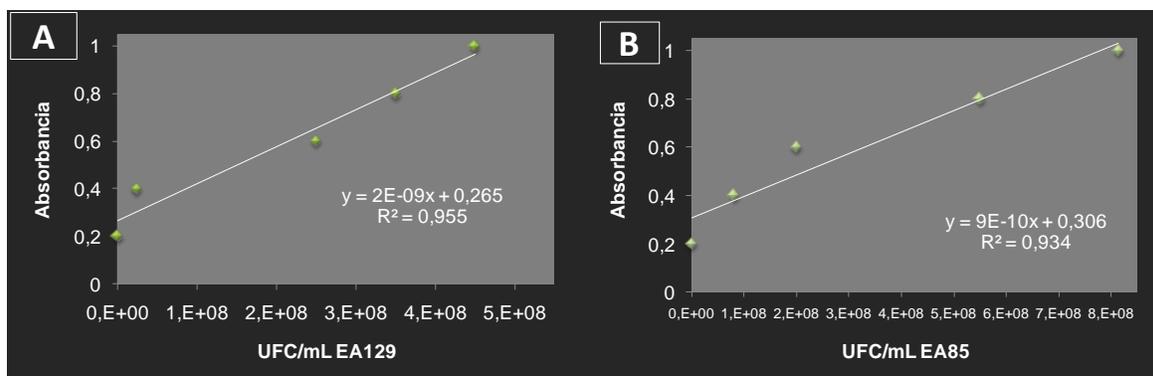
### **3.4. CURVAS DE CALIBRACIÓN UFC/mL**

Con el fin de determinar la concentración de inóculo de las cepas evaluadas a nivel *in vivo* (EA129 y EA85) se realizó la curva de calibración de absorbancia vs UFC (UFC/mL). Para esto, las cepas fueron sembradas por el método Francés en medio sólido TSA al 10% (Agar Tripticasa de Soya - Merck) e incubadas en una cámara de crecimiento (Incubadora Binder WTB) a  $30^{\circ}\text{C}$ . Pasadas 24 h, se transfirieron a erlenmeyers de 100 mL con 20 mL de caldo TSB previamente esterilizado en un autoclave horizontal (Trident Medical Corporation 620) a  $121^{\circ}\text{C}$  y 1.5 psig durante 15 minutos y se sometieron a agitación en un shaker rotatorio a 150 rpm. Transcurridas 48 h, los cultivos se centrifugaron (centrifuga Hettich

320R) a 4500 rpm durante 20 minutos, el sobrenadante fue descartado y el pellet fue resuspendido en 20 mL de una solución de sulfato de magnesio 0,01 M y ajustada su  $DO_{540}$  a 1,0. De cada solución madre resultante se realizaron soluciones con  $DO_{540}$  de 0.8; 0.6; 0.4 y 0.2 y a cada una de estas soluciones se les realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-8}$  (1, 0.8, 0.6) y hasta  $10^{-7}$  (0.4 y 0.2) sembrando las tres últimas en cajas petri con medio de cultivo sólido TSA al 10% por triplicado usando el método de plateo por superficie con una espátula de Drigalsky. Finalmente las cajas petri fueron incubadas a 30°C para efectuar el conteo de UFC/mL a las 48 horas (Pérez, 2007). La concentraciones (UFC/mL) obtenidas para las cepas EA85 y EA129 fueron  $8.2 \times 10^8$  UFC/mL y  $4.5 \times 10^8$  UFC/mL para una  $DO_{540}=1$  respectivamente de acuerdo a la curva de calibración respectiva (gráfica 1).

**Gráfica 1. Curvas de calibración UFC/mL de las cepas evaluadas a nivel *in vivo*.**

**A.** Curva de calibración UFC/mL correspondiente a el aislado EA129 y **B.** Curva de calibración UFC/mL correspondiente al aislado EA85.



**3.5. OBTENCIÓN DE EXTRACTOS LIBRES DE CÉLULAS**

Las cepas de trabajo se sembraron por agotamiento en TSA al 10%, directamente de los crioviales y se incubaron por 24 horas a 30 °C. Una colonia fue transferida a erlenmeyers de 100 mL con 20 mL de medio MOLP de las siglas en ingles “Medium Optimized for Lipopeptide Production” (Jacques *et al.*, 1999), compuesto

por 1,9 g/L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 20 g/L de sacarosa, 30 g/L de peptona, 7 g/L de extracto de levadura, 1 mL/L de trace elements (1 mg/L de  $\text{CuSO}_4$ , 5 mg/L de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 4 mg/L de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 2 mg/L de KI, 0,14 g/L de  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 10 mg/L de  $\text{H}_3\text{BO}_4$  y 10 g/L de  $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$ ) y 9 mL/L de solución Mn, Mg (0,4 g/L de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 50 g/L de  $\text{MgSO}_4$ ) y se llevaron a agitación (150 rpm) durante 5 días a 25 °C aproximadamente. Transcurrido el tiempo requerido, los inóculos se centrifugaron a 4500 rpm por 50 minutos (Riveros *et al.*, 2003). Los sobrenadantes se filtraron en tambores (Sartorius stedim biotech 25 mm) con filtros de membrana de acetato celulosa (Sartorius Biolab 0.2  $\mu\text{m}$ ) para obtener un extracto libre de células (metabolitos secundarios y residuos de medio MOLP). Los extractos se conservaron en tubos estériles bajo condiciones de refrigeración (4 °C), por no más de 5 días, hasta el momento de su uso en el montaje de las pruebas de antagonismo *in vitro* (Riveros *et al.*, 2003).

### **3.6. PRUEBAS DE ANTAGONISMO**

Para determinar la capacidad de inhibición de las BAFEs sobre el hongo *M. fijiensis* se realizaron tres técnicas a nivel *in vitro*:

#### **3.6.1. Técnica de inhibición de micelio expandido**

La capacidad antagonista de las BAFEs sobre el micelio del hongo en cultivo sólido fue determinada según la metodología de la inhibición de micelio expandido o platos duales propuesta por Otálvaro *et al.*, 2007.

Con la ayuda de un asa de vidrio (Drigalsky) se platearon 100  $\mu\text{L}$  de extracto bacteriano, agua o medio MOLP respectivamente (tabla 3) en PDA con cloranfenicol (250 ppm), hasta quedar completamente seco. Luego se platearon 100  $\mu\text{L}$  de inóculo de *M. fijiensis* (aislado DN1). La obtención del inóculo del hongo se realizó de acuerdo a la metodología descrita en el numeral 3.3.2; en este caso la suspensión miceliar se pasó por un filtro de membrana (Schleicher & Schuell

110 µm) para obtener una suspensión con un tamaño uniforme de los fragmentos de micelio. Las cajas petri fueron incubadas en condiciones de oscuridad a temperatura ambiente durante 15 días. Para el desarrollo de esta prueba se emplearon los tratamientos que se muestran a continuación:

**Tabla 3. Tratamientos para la prueba de antagonismo contra *M. fijiensis* mediante la técnica de micelio expandido.**

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
<b>C.ABS</b>	Solución de micelio fraccionado de <i>M. fijiensis</i> + Agua
<b>MOLP</b>	Solución de micelio fraccionado de <i>M. fijiensis</i> + Medio MOLP.
<b>UA321</b>	Solución de micelio fraccionado de <i>M. fijiensis</i> + extracto bacteriano libre de células de <i>B. subtilis</i> UA321.
<b>EA123</b>	Solución de micelio fraccionado de <i>M. fijiensis</i> + extracto bacteriano libre de células de la cepa de <i>B.subtilis</i> EA123.
<b>EA87</b>	Solución de micelio fraccionado de <i>M. fijiensis</i> + extracto bacteriano libre de células de el aislado EA 87.
<b>EA85</b>	Solución de micelio fraccionado de <i>M. fijiensis</i> + extracto bacteriano libre de células de el aislado EA85.
<b>EA129</b>	Solución de micelio fraccionado de <i>M. fijiensis</i> + extracto bacteriano libre de células de el aislado EA129.
<b>EA98</b>	Solución de micelio fraccionado de <i>M. fijiensis</i> + extracto bacteriano libre de células de el aislado EA 98.
<b>EA104</b>	Solución de micelio fraccionado de <i>M. fijiensis</i> + extracto bacteriano libre de células de el aislado EA 104.
<b>EA130</b>	Solución de micelio fraccionado de <i>M. fijiensis</i> + extracto bacteriano libre de células de el aislado EA 130.
<b>EA229</b>	Solución de micelio fraccionado de <i>M. fijiensis</i> + extracto bacteriano libre de células de el aislado EA 229.
<b>EA250</b>	Solución de micelio fraccionado de <i>M. fijiensis</i> + extracto bacteriano libre de células de el aislado EA 250.

Cada uno de los tratamientos se evaluó por triplicado y pasados 15 días de incubación se midió el diámetro de 30 colonias seleccionadas aleatoriamente por caja petri en el estereomicroscopio (Riveros, 2003). Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición con respecto al control absoluto mediante la ecuación 1:

$$\% I = \frac{\phi_{\text{aislado}} \times \phi_{\text{prom}} - \phi_{\text{control absoluto}}}{\phi_{\text{control absoluto}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde; I es el porcentaje de inhibición y  $\Phi$  representa el diámetro de colonia.

### 3.6.2. Técnica de microplatos en cultivo sumergido:

La capacidad antagonista de las BAFEs sobre el micelio del hongo en cultivo sumergido fue determinada según la metodología propuesta por Peláez *et al.*, 2006. En esta, se emplearon microplatos estériles, de fondo plano y 96 pozos con índice de baja evaporación (Falcon Microtest™ 96). Cada pozo se llenó con un volumen total de 150  $\mu$ L distribuidos como se puede observar en la tabla 4. Los microplatos fueron incubados a 25°C bajo condiciones de oscuridad. Transcurridos 15 días, el crecimiento miceliar fue medido por un espectrofotómetro ELISA (Microplate Reader Bio Rad iMark) a una longitud de onda de 595 nm con ayuda del software Microplate manager 6 (MPM6).

**Tabla 4. Tratamientos para la prueba de antagonismo contra *M. fijiensis* por la técnica de microplatos.**

TRATAMIENTO	Suspensión de micelio fraccionado de <i>M. fijiensis</i> (aislado DN2)	Caldo sabouraud	Extracto libre de células
EA85	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L	50 $\mu$ L EA85
EA104			50 $\mu$ L EA104
EA229			50 $\mu$ L EA229
EA123			50 $\mu$ L EA123
EA130			50 $\mu$ L EA130
EA87			50 $\mu$ L EA87
EA129			50 $\mu$ L EA129
EA98			50 $\mu$ L EA98
EA250			50 $\mu$ L EA250
UA321			50 $\mu$ L UA321
C.ABS			50 $\mu$ L
Blanco	No aplica	50 $\mu$ L	100 $\mu$ L de agua destilada estéril

Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición con respecto al control absoluto mediante la ecuación 2:

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{DO_{595} \text{ cepa } x_{\text{prom}} - DO_{595} \text{ control absoluto}_{\text{prom}}}{DO_{595} \text{ control absoluto}_{\text{prom}}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde; I es el porcentaje de inhibición y DO representa la densidad óptica.

### **3.6.3. Técnica de inhibición de tubo germinativo por descarga de ascosporas en hojas de banano**

Para determinar la capacidad antagonista de las BAFEs sobre la longitud del tubo germinativo de las ascosporas del hongo se utilizó la metodología propuesta por Talavera *et al.*, 1998. Para este ensayo fueron seleccionadas las hojas 3 y 4 de plantas de banano cultivar Gran enano (sanas) en las cuales no se hubiera realizado aplicación de fungicidas. De estas se recortaron discos de 9 cm de diámetro, los cuales se desinfectaron por inmersión en etanol al 70% y posteriormente fueron lavados de forma sucesiva (3 veces) con agua destilada durante 1 minuto cada vez. Cada disco se sumergió durante 1 minuto en cada uno de los extractos bacterianos libres de células correspondientes a las cepas seleccionadas.

Los discos de hoja sana se situaron, con el envés hacia arriba, en una caja petri que contenía una servilleta húmeda y estéril, luego fueron sometidas a la descarga de las ascosporas del hongo (aislado DN3) según la metodología descrita en el numeral 3.2.

Pasado el período de incubación, las hojas sanas se cubrieron con una capa de barniz que una vez seca se retiró y tiñó con safranina con el fin de resaltar las ascosporas. La longitud del tubo germinativo se midió con la ayuda de un microscopio compuesto (Boeco) y el software Motic Images Plus 2.0. Para cada tratamiento se midieron 50 ascosporas con cuatro repeticiones. Los tratamientos evaluados se muestran en la tabla 5.

**Tabla 5. Tratamientos para la prueba de antagonismo contra *M. fijiensis* mediante la técnica de inhibición de tubo germinativo de ascosporas**

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
<b>C.ABS</b>	Descarga de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> + Agua
<b>UA321</b>	Descarga de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> + extracto bacteriano libre de células de <i>B. subtilis</i> UA321.
<b>EA123</b>	Descarga de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> + extracto bacteriano libre de células de la cepa de <i>B.subtilis</i> EA123.
<b>EA129</b>	Descarga de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> + extracto bacteriano libre de células de el aislado EA129.
<b>EA85</b>	Descarga de ascosporas de <i>M. fijiensis</i> + extracto bacteriano libre de células de el aislado EA85.

Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición con respecto al control absoluto mediante la ecuación 3:

$$\% I = \frac{L_{tg \text{ aislado}} \times x_{prom} - L_{tg \text{ control absoluto}}}{L_{tg \text{ control absoluto}}} \times 100 \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde; I es el porcentaje de inhibición y  $L_{tg}$  corresponde a la longitud del tubo germinativo de la ascospora.

### **3.7. EFECTO DE LAS RIZOBACTERIAS SOBRE *M. fijiensis* A NIVEL *IN VIVO***

La resistencia sistémica inducida es ocasionada por PGPRs y su efecto genera resistencia en la planta a posteriores inoculaciones de patógenos en tejidos distantes y locales (Kloepper, 1993). Se realiza por medio de elicitores (LPS, flagelos, sideróforos, ácido salicílico, compuestos volátiles, antibióticos entre otros) que en contacto con las membranas de las plantas generan una cascada de señales que desembocan en respuestas de defensa como engrosamiento de la pared celular, producción de fitoalexinas y compuestos fenólicos (Choudhary *et al.*, 2007). Por lo anterior los aislados EA85 y EA129 fueron seleccionadas por poseer una mayor cantidad de elicitores que podrían inducir resistencia tales como: producción de antibióticos determinada por las pruebas de antagonismo y producción de sideróforos determinada por la metodología de Schwyn y Neilands

(1987). Para cada tratamiento se emplearon 8 plantas y sus características se muestran en la tabla 6.

**Tabla 6. Tratamientos para las pruebas a nivel *in vivo* en platas de banano cv. Gran enano.**

TRATAMIENTO	DESCRIPCIÓN
<b>C1: control absoluto.</b>	Plantas sin inoculación bacteriana (inmersión de raíces en agua estéril) y sin infección artificial con <i>M. fijiensis</i> .
<b>C2: control negativo.</b>	Plantas sin inoculación bacteriana (inmersión de raíces en agua estéril) e infectadas 8 días después con <i>M. fijiensis</i> de manera artificial.
<b>C3: control positivo 1.</b>	Plantas sin inoculación bacteriana (inmersión de raíces en agua estéril) a las que se les aplicó un inductor de resistencia químico y fueron infectadas 8 días después con <i>M. fijiensis</i> de manera artificial.
<b>C4: control positivo 2.</b>	Plantas sin inoculación bacteriana (inmersión de raíces en agua estéril) a las que se les aplicó fungicida químico y fueron infectadas 8 días después con <i>M. fijiensis</i> de manera artificial.
<b>T1</b>	Plantas inoculadas con suspensión bacterial cepa EA129 (inmersión de raíces) e infectadas 8 días después con <i>M. fijiensis</i> de manera artificial.
<b>T2</b>	Plantas inoculadas con suspensión bacterial cepa EA85 (inmersión de raíces) e infectadas 8 días después con <i>M. fijiensis</i> de manera artificial.
<b>T3</b>	Plantas inoculadas con el consorcio bacteriano cepas EA129 + EA85 (inmersión de raíces) e infectadas 8 días después con <i>M. fijiensis</i> de manera artificial.

### **3.7.1. Infección artificial de plantas de banano a nivel *in vivo***

Para la infección artificial de las pruebas *in vivo* se empleó la metodología de los fragmentos de micelio, por ser la metodología que aseguró una mayor infección. La suspensión de micelio obtenida según el numeral 3.3.2 fue asperjada con una bomba (GARDEN ROYAL CONDOR) en cada uno de los tratamientos (tabla 6) hasta obtener una cobertura total del envés de las hojas (4,5 mL/planta). Una vez realizada la infección artificial, las plantas se llevaron a zona abierta y fueron ubicadas aleatoriamente en sitios con alta presencia del patógeno para asegurar la infección de las plantas.

### **3.7.2. Acondicionamiento del material vegetal y el suelo**

Para el ensayo *in vivo* se utilizaron plantas de banano cultivar Gran enano de 4 semanas, ya enraizadas. El suelo previamente preparado (2 partes de tierra, 1 parte de arena y ½ parte orgánica) y mezclado con ½ parte de cisco de arroz fue esterilizado por solarización (72 °C) (FAO, 1995). Posteriormente se repartió en 56 bolsas de plástico de 3 Kg, hasta la mitad de su capacidad.

### **3.7.3. Inoculación de las plantas de banano con las suspensiones bacterianas**

Las cepas de trabajo se sembraron en TSA al 10% y se incubaron por 24 horas a 30°C. Para los preinóculos, se llevó una colonia de cada cepa a un erlemeyer de 100 mL con 30 mL de medio TSB y se agitó a 150 rpm por 24 h. Transcurrido este tiempo los preinóculos se trasladaron a 300 mL de TSB y se agitaron a las mismas condiciones del preinóculo. Finalmente, los inóculos se centrifugaron a 4500 rpm por 20 minutos y se descartó el sobrenadante para resuspender el pellet resultante en sulfato de magnesio 0,01M. Las suspensiones bacterianas resultantes se llevaron a frascos de 1000 mL ajustando la OD<sub>540</sub> para una concentración final de 10<sup>8</sup> UFC/mL para su posterior dilución hasta 10<sup>7</sup> UFC/mL.

Las raíces de banano cv. Gran enano se lavaron y sumergieron en recipientes con los diferentes tratamientos presentados en la Tabla 6. Así las plantas de los tratamientos T1, T2 y T3 se sumergieron en las suspensiones bacteriales anteriormente mencionadas y los tratamientos C1, C2, C3 y C4 en agua destilada estéril durante 2 h. Posteriormente, las plantas se trasplantaron y se adicionaron 50 mL de las diferentes suspensiones bacterianas o agua, según el caso, en el sustrato alrededor del pseudotallo. Las diferentes plantas fueron ubicadas en el invernadero de Cenibanano (Urabá) durante una semana. Los tratamientos fueron reinoculados en el sustrato alrededor del pseudotallo cada 15 días con la

suspensión correspondiente (80 mL / planta / tratamiento), realizándose 4 reinoculaciones en el total del tiempo del ensayo (Orjeda, 1998).

#### **3.7.4. Aplicación del inductor de resistencia y el fungicida químico**

La aplicación del inductor de resistencia químico, acibenzolar – smetil (Boost® 500 SC, Syngenta S.A), correspondiente al tratamiento C3, se utilizó por ser un activador de defensas en plantas pertenecientes a la clase de los benzotriazolones (Patiño, 2001). La aplicación se realizó una sola vez al comienzo del ensayo que duró 42 días en total. La dosis utilizada fue de 0,525 mL de ingrediente activo/L de agua.

Para el tratamiento C4, correspondiente a la aplicación del fungicida químico, se utilizó Manzate® 200 WP (DU PONT). La aplicación se realizó cada 15 días lo que representó 2 aplicaciones en total hasta el final de las mediciones. La dosis utilizada fue de 105,26 g de ingrediente activo/L de agua (Diccionario de especialidades agroquímicas, 2009).

Finalmente las soluciones preparadas se aplicaron con una bomba de aspersión (GARDEN ROYAL CÓNDROR) en cada una de las plantas (tabla 6) hasta obtener una cobertura total de las hojas.

#### **3.7.5. Evaluación de la enfermedad**

La evolución de la enfermedad de la Sigatoka negra en los diferentes tratamientos se realizó por medio de tres métodos de evaluación: índice de infección (II) y su área bajo la curva (ABC), tasa de desarrollo de la enfermedad (r) y la hoja más joven manchada (HMJM). Se realizaron lecturas semanales de severidad para cada planta (utilizando la escala de Stover) y de la HMJM, que corresponde a la primera hoja totalmente abierta que presentó 10 o más lesiones discretas

necrosadas con 10 centros de color claro (Orjeda, 1998). Con los datos recolectados se calculó el II mediante la ecuación 4:

$$II = \frac{\sum nb}{N-1T} \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde: n= número de hojas en cada grado, b= es el grado en la escala de Stover, N= grados empleados por la escala (7) y T= número total de hojas evaluadas (Orjeda, 1998).

Adicionalmente se realizó la curva de II en el tiempo y se calculó el área bajo dicha curva con el fin de determinar la incidencia total de la enfermedad para cada una de las plantas mediante la ecuación 5:

$$ABC = \frac{\sum_{i=1}^{n+1} (y_i + y_{i+1})}{2} \times (t_{i+1} - t_i) \quad \text{Ecuación 5}$$

Donde n= número de lecturas de incidencia de la enfermedad, Y= incidencia de la enfermedad (II), t= tiempo, i e i+1= observaciones de 1 hasta n (Osorio, 2006).

La tasa de desarrollo mide la velocidad de propagación de la enfermedad. Para el cálculo de esta variable se tomaron los valores del índice de severidad semanal; también se usaron los valores correspondientes a las semanas de evaluación y la diferencia de días transcurridos desde la primera evaluación y la última (Torrado y Castaño, 2008). Para tal fin, se empleó la ecuación 6:

$$r = \frac{1}{t_1 - t_0} \left( \ln \frac{X_1}{1 - X_1} - \ln \frac{X_0}{1 - X_0} \right) \quad \text{Ecuación 6}$$

Donde: t<sub>1</sub>= tiempo final de evaluación, t<sub>0</sub>= tiempo inicial de evaluación, X<sub>1</sub>= severidad final y X<sub>0</sub> = severidad inicial.

### **3.8. RECUPERACIÓN DE BAFES Y BACTERIAS TOTALES EN PLANTAS DE BANANO**

La recuperación de bacterias totales y BAFEs se realizó al final del proceso experimental según la metodología propuesta por Ramírez (2005). Este procedimiento consistió inicialmente en la toma de muestras de raíz conservando el suelo rizosférico. Se eligieron dos plantas al azar por tratamiento para el muestreo. Las raíces fueron almacenadas en bolsas plásticas y trasladadas bajo refrigeración a Medellín para la realización de la recuperación de bacterias totales y BAFEs después de 24 horas de cosechadas.

Se tomaron muestras de 10 g de raíces funcionales para cada tratamiento, y se diluyeron en 90 mL de solución buffer fosfato de potasio estéril (pH 7.0) en erlenmeyers de 250 mL. Las soluciones fueron agitadas en un shaker a 150 rpm por 1 hora. Transcurrido el tiempo de agitación se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-7}$  para cada tratamiento y se sembraron 100  $\mu$ L de las diluciones  $10^{-5}$ ,  $10^{-6}$  y  $10^{-7}$  directamente en TSA al 10% para conteo de bacterias totales. Luego las diluciones  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  se llevaron al baño serológico (Memmert 14L WB14) a 80 °C por 20 minutos y se sembraron 100  $\mu$ L en TSA al 10% para el conteo de BAFEs. Las siembras se realizaron por duplicado y luego de 48 de incubación a 30°C se realizó el conteo de UFC/mL.

### **3.9. RECUPERACIÓN DE NEMÁTODOS**

La recuperación de nemátodos de las raíces de banano se realizó según la metodología de Araya, 2002. Las raíces fueron lavadas con agua para eliminar todos los residuos del suelo y se separaron en raíces funcionales (RF) (color blanco o crema) y no funcionales (RNF) (tejido necrosado corchoso y esponjoso). Las RF se partieron en trozos de 2–3 cm de longitud y se pesaron 25 g en una balanza extrayendo 5 g por vez en diferentes partes de la muestra para la extracción de los nemátodos por el método de licuado y tamizado.

Los 25 g de raíces fueron colocados en beakers de 250 mL con 150 mL de agua y se licuó con 150 mL más de agua a velocidad 1 por 10 segundos y después a velocidad 3 por 5 segundos en una licuadora de tres velocidades Osterizer. La mezcla resultante fue tamizada en un juego de cribas (tamiz estándar ASTM E-11) sobrepuestas de arriba hacia abajo (malla 50, 100 y 200) lavando el tamiz por 1 minuto y recolectando su contenido en un beaker de 250 mL aforando hasta los 200 mL. A la suspensión resultante se le adicionaron dos gotas de una solución de azul de metileno (5 g/L de agua destilada) para teñir los restos radicales y se homogenizó por agitación durante 30 segundos. Se tomó una alícuota de 4 mL para realizar el conteo en una cámara de lectura con 2 mL efectivos. Los nemátodos fueron identificados en un microscopio (Boeco) a 4X de magnificación. Los datos se transformaron a número de nemátodos por cada 100 g de raíces.

### **3.10. PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO VEGETAL**

La promoción de crecimiento vegetal ocasionada en las plantas de banano por las rizobacterias EA85 y EA129 se evaluó a nivel *in vivo* determinando diferentes variables de crecimiento al cabo de 90 días. A cada tratamiento (tabla 6) se le midió las variables de respuesta que permitieron determinar si se dio lugar a una promoción de crecimiento por las inoculaciones realizadas. Transcurridos los 4 meses del ensayo se midieron longitudes y pesos aéreos y radicales como se muestra en la tabla 7.

**Tabla 7. Variables de respuesta evaluadas en promoción de crecimiento.**

<b>VARIABLE DE RESPUESTA</b>	<b>NOMENCLATURA ASIGNADA</b>	<b>OBSERVACIONES</b>
<b>Longitud aérea</b>	LA	Longitud entre el cormo y la intersección de la segunda y tercera hoja
<b>Diámetro aéreo</b>	DA	Diámetro medido a ½ la altura total del pseudotallo.
<b>Diámetro de cormo</b>	DC	Diámetro medido en toda la curvatura del cormo.
<b>Peso fresco aéreo, cormo, raíz y hojas</b>	WFA, WFC, WFR y WFH	Medido en una balanza previamente calibrada y con muestras frescas, evitando deshidratación.
<b>Peso seco aéreo, cormo, raíz y hojas</b>	WSA, WSC, WSR y WFH	Peso de pseudotallo, cormo, raíz y hojas luego de secado a 60 °C hasta peso constante.

### **3.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico de las muestras para las diferentes pruebas de antagonismo a nivel *in vitro* se realizó con base en un diseño de experimentos completamente aleatorio. Los resultados se analizaron estadísticamente con ayuda del software Statgraphics 5.1 por medio de un análisis de varianza (ANOVA) con un nivel de confianza del 95 % para aquellos datos que cumplieron los supuestos requeridos para esta prueba: normalidad por histograma de frecuencias, test de Shapiro Wilks y gráfico de probabilidad normal; igualdad de varianzas por test de Cochran y Barlett e independencia por gráfico de residuales en orden de toma de datos. Además se realizaron gráficos de medias por LSD y test de rangos múltiples por el mismo método. Para el caso de los datos que no cumplieron los supuestos se realizó el test de Kruskal-Wallis, con un nivel de confianza del 95% y la gráfica de Box and Whisker del tipo de muesca central.

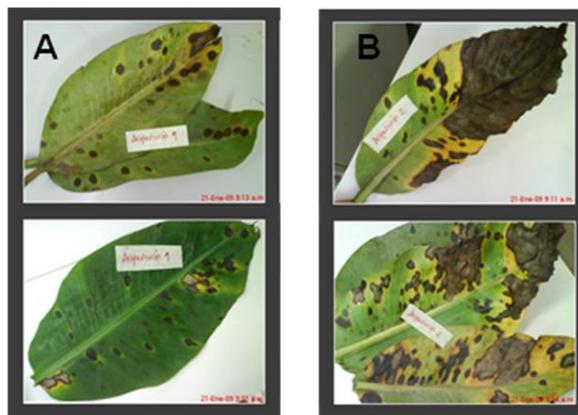
## 4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

### 4.1. MÉTODO DE INFECCIÓN ARTIFICIAL DE PLANTAS DE BANANO CON *M. fijiensis*

Los primeros síntomas visibles de infección foliar con *M. fijiensis* en plantas de banano para ambos métodos (ascosporas y fragmentos de micelio) se observaron 25 días después de la inoculación (DDI), sin embargo, el tratamiento de micelio fragmentado (Tratamiento 2) mostró una incidencia mayor de la enfermedad, lo cual puede atribuirse a la densidad de inóculo ya que con la descarga (tratamiento 1) fue más difícil obtener cantidades de ascosporas representativas con respecto al método de micelio fragmentado. Se observó además, que los síntomas causados por el tratamiento 2, progresaron más rápidamente que los del tratamiento de ascosporas, dando como resultado una necrosis que cubría aproximadamente entre un 50% y un 60% del área foliar alcanzando un grado de severidad también mayor, como se muestra en la figura 7.

**Figura 7. Síntomas de la enfermedad de la Sigatoka negra observados 50 DDI en el envés de plantas de banano cv. Gran enano.**

**A.** Síntomas observados usando suspensión de ascosporas de *M. fijiensis* como inóculo (tratamiento 1). **B.** Síntomas observados usando fragmentos de micelio de *M. fijiensis* como inóculo (tratamiento 2).



Vásquez *et al.*, (1988) lograron obtener buenos resultados para la infección artificial por medio de la descarga de ascosporas realizando reinoculaciones sucesivas y bajo condiciones de invernadero automatizadas. De igual forma en este estudio se lograron observar los síntomas característicos ocasionados por *M. fijiensis* en banano al utilizar ascosporas; sin embargo, se obtuvieron mejores resultados en la inoculación con fragmentos de micelio como lo reportaron Hoss *et al.*, (2000) y Donzelli *et al.*, (2007). Correa (2009) evaluó la infección artificial bajo condiciones controladas a nivel de laboratorio con una suspensión micelial de *M. fijiensis* en plantas de banano cv. Williams (susceptible) y cv. Calcutta4 (resistente), obteniendo una mayor incidencia de la enfermedad de la Sigatoka negra en el cv. susceptible que se manifestó con manchas oscuras que fueron aumentando su tamaño a lo largo del envés de la hoja, mientras que con respecto al cv. resistente, se observaron manchas más leves delimitadas al punto de infección, lo cual indicó una resistencia contra el patógeno debido a la interacción incompatible planta-patógeno.

Con base en lo anterior, se seleccionó la metodología de micelio fragmentado para realizar la infección artificial y se reforzó, como se mencionó anteriormente, con infección natural obteniendo como resultado la infección de la totalidad de las plantas.

#### **4.2. PRUEBAS DE ANTAGONISMO CONTRA *M. fijiensis* A NIVEL *in vitro*.**

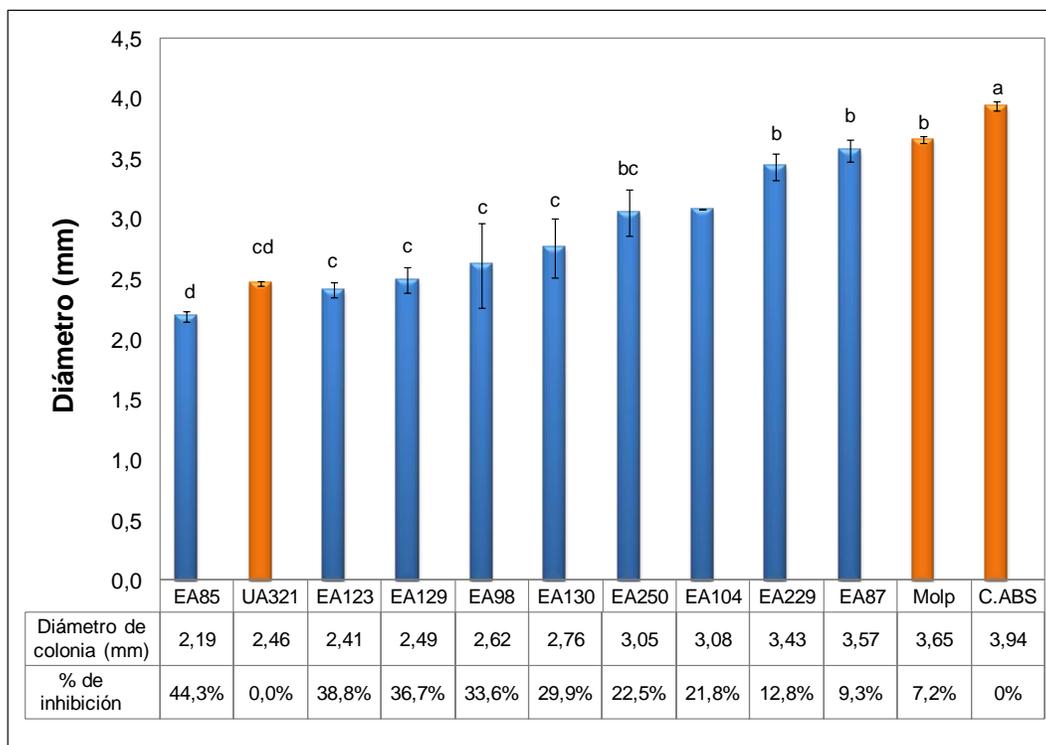
Las pruebas de antagonismo contra *M. fijiensis* a nivel *in vitro* con las diferentes BAFEs se realizaron por tres metodologías: crecimiento de micelio expandido en medio sólido, inhibición del crecimiento micelial en cultivo sumergido por microplatos e inhibición de la germinación del tubo germinativo de las ascosporas.

Para la prueba de **crecimiento de micelio expandido**, el crecimiento de las colonias presentó un morfotipo con características similares para todos los

tratamientos (color verde oscuro con centro negro, forma esférica abultada y dura). En comparación con el control absoluto todas las cepas presentaron una disminución en el diámetro de la colonia (gráfica 1, figura 8). Se observó que el aislado EA85 presentó el mayor porcentaje de inhibición (44.3%), por encima del control positivo (cepa de *B.subtilis* UA321) que mostró una inhibición de 40.1%. De igual forma, la cepa de *B.subtilis* EA123 y el aislado EA129, mostraron valores de inhibición de 38.8% y 36.7% respectivamente comparados con el control absoluto como se muestra en la gráfica 1.

**Gráfica 1. Inhibición del diámetro de la colonia de *M. fijiensis* generado por diferentes extractos libres de células al utilizar la prueba de antagonismo de micelio expandido.**

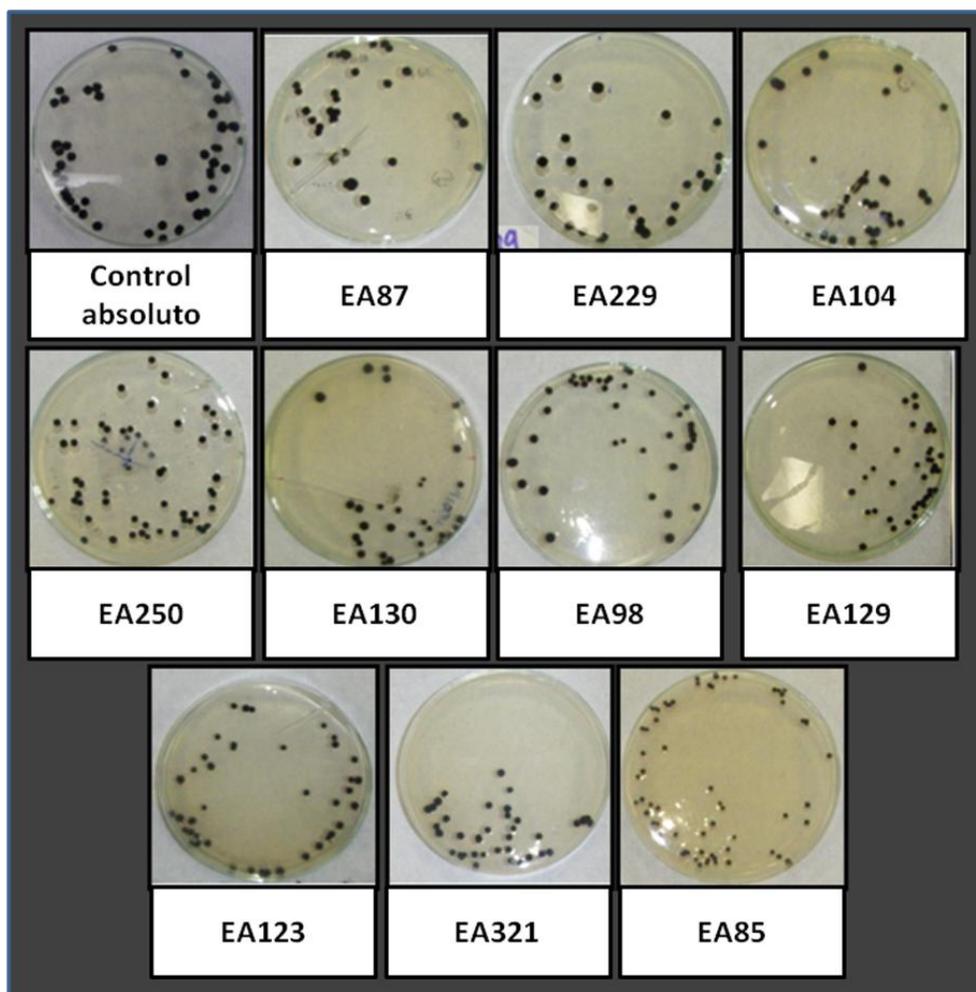
La cepa UA321 es el control positivo, el medio MOLP es el control negativo y los demás tratamientos (EA85, EA123, EA129, EA98, EA130, EA250, EA104, EA229, EA87) son las BAFEs evaluadas. Barras verticales denotan el error estándar y letras diferentes denotan diferencias significativas por LSD (P=0,0038, Anexo I)



El control negativo (medio MOLP) por su parte, no evidenció antagonismo alguno con respecto a los otros tratamientos, demostrando que el medio de cultivo

utilizado para la obtención de los extractos libres de células no tuvo ningún efecto significativo sobre el desarrollo del hongo ni interfirió en la actividad antagonista de los compuestos excretados por los microorganismos. Adicionalmente como lo demostraron Sierra y Moncada (2009), no existen diferencias significativas entre un control negativo constituido por agua y un control negativo constituido por medio MOLP fresco estéril. Lo que indica que la inhibición causada en el diámetro de las colonias de *M. fijiensis* fue ocasionada por los metabolitos producidos por las BAFEs y no por los nutrientes del medio de cultivo agotado.

**Figura 8. Efecto de los diferentes extractos libres de células sobre el tamaño de diámetro de colonia de *M. fijiensis* en medio sólido.**

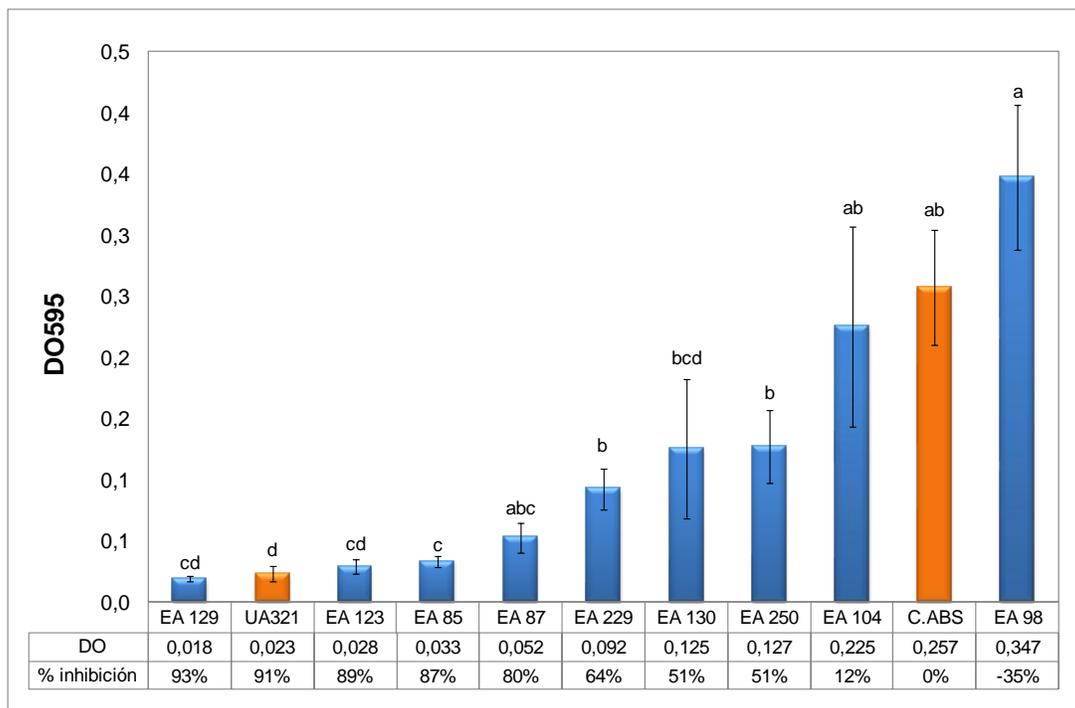


Con el fin de determinar y corroborar la capacidad de inhibición de los extractos libres de células, se realizó la **técnica de los microplatos en cultivo sumergido**. En esta prueba se obtuvieron porcentajes de inhibición de 93%, 89% y 87% para el aislado EA129, la cepa de *B.subtilis* EA123 y el aislado EA85 respectivamente, presentándose diferencias poco significativas entre el aislado EA129 y la cepa de *B.subtilis* EA123 con respecto al control positivo (cepa de *B.subtilis* UA321), que presentó un porcentaje de inhibición de 91% (gráfica 2). En el caso del aislado EA85, no solo presentaron diferencias significativas con la cepa la cepa de *B.subtilis* UA321 sino que también se obtuvo un menor porcentaje de inhibición comparado con el de la prueba de micelio expandido. Comparando los porcentajes de inhibición obtenidos en esta prueba para los tres aislados, mencionados anteriormente, se puede observar (gráfica 1 y 2) que los rangos de inhibición del hongo fueron mayores; lo cual puede atribuirse a que probablemente, en la prueba de microplatos en cultivo sumergido, el hongo tuvo una mayor área de contacto con los metabolitos secundarios contenidos en los extractos libres de células facilitando la interacción con las membranas del hongo y a su vez la actividad antifúngica, mientras que en la prueba de micelio expandido el área de transferencia fue mucho menor ya que se trataba de un medio de cultivo sólido en el que la superficie de las colonias no tuvo contacto con los compuestos de los extractos.

Diversas investigaciones han comprobado la importancia de utilizar medios de cultivo líquidos. Recientemente, Heerklotz y Seelig (2007) y Deleu *et al.*, 2005 determinaron que la mayor permeabilización de las membranas lipídicas es atribuida a las altas concentraciones de lipopéptidos en medios de cultivo líquidos, permitiendo mayores interacciones para la disolución y alteración de las membranas biológicas. De igual forma, Shirokov *et al.*, 2002 demostraron la inhibición ejercida por péptidos en el crecimiento micelial de un hongo fitopatógeno en cultivo sumergido, bajo la influencia de enzimas quitinolíticas que permitieron la permeabilización de la pared celular fúngica.

**Gráfica 2. Inhibición del crecimiento micelial de *M. fijiensis* al técnica de microplatos en cultivo sumergido tratado con diferentes extractos libres de células.**

La cepa UA321 es el control positivo y los demás tratamientos (EA85, EA123, EA129, EA98, EA130, EA250, EA104, EA229, EA87) son las BAFEs evaluadas. Barras verticales denotan el error estándar y letras diferentes denotan diferencias significativas por LSD ( $P=4.35 \times 10^{-7}$ , Anexo II).

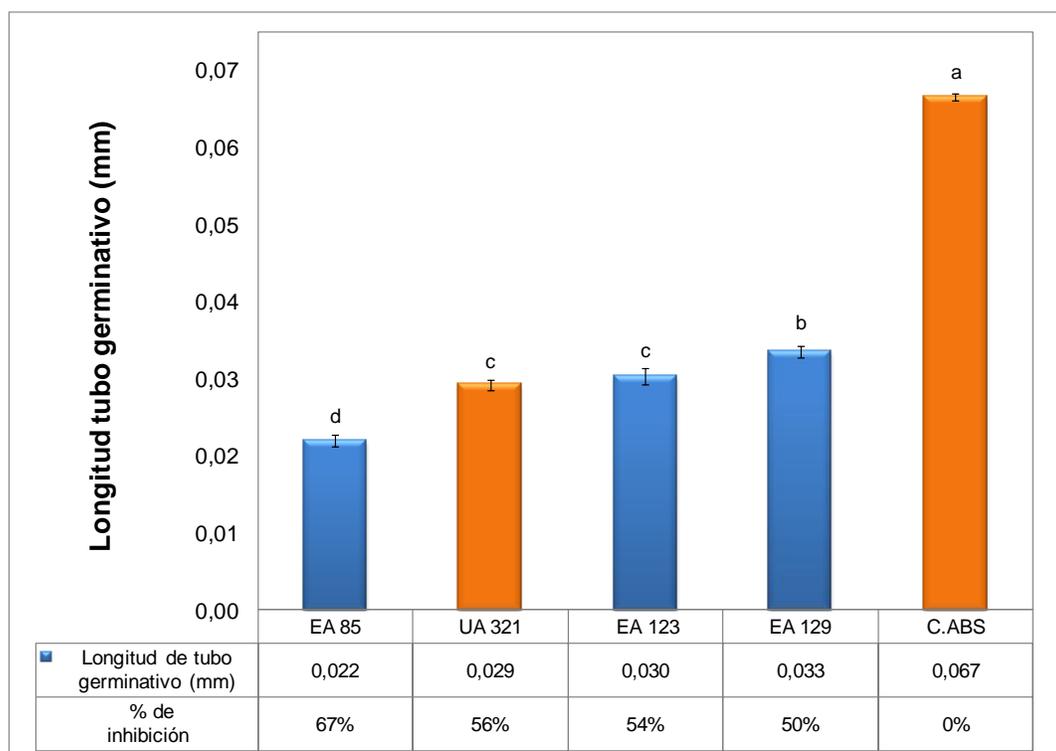


Con base en los resultados obtenidos en las pruebas de micelio expandido y microplatos se seleccionaron los aislados EA85, EA129 y la cepa de *B.subtilis* EA123 para realizar la **prueba de inhibición del tubo germinativo de las ascosporas**, la cual es de gran importancia ya que estas células sexuales son las encargadas, junto con las células asexuales (conidios), de propagar la enfermedad en campo. En esta prueba al igual que en la de crecimiento de micelio expandido se observó que el aislado EA85 presentó el mayor porcentaje de antagonismo (67%) por encima del control positivo (cepa de de *B.subtilis* UA321) que mostró un porcentaje de inhibición del 56%, seguida por la cepa de *B.subtilis* EA123 (54%) y el aislado EA129 (50%) como se puede observar en la gráfica 3, lo que confirma

que las tres cepas tienen una capacidad antagonista contra *M. fijiensis* a nivel *in vitro*.

**Gráfica 3. Inhibición del tubo germinativo de las ascosporas de *M. fijiensis* tratadas con diferentes extractos libres de células.**

La cepa UA321 es el control positivo y los demás tratamientos (EA85, EA123, EA129) son las BAFEs evaluadas. Barras verticales denotan el error estándar y letras diferentes denotan diferencias significativas por LSD (P=0,025, Anexo III).



En términos generales, se observó que para las tres pruebas *in vitro*, la inhibición ejercida por los aislados evaluados contra el hongo *M. fijiensis* posiblemente se debe a que en sus metabolitos existen compuestos antifúngicos de carácter proteico (Shirokov *et al.*, 2002), además de la producción de lipopéptidos tipo iturinas, surfactinas y fengicinas, inducida por el medio de cultivo utilizado (MOLP), que alteran la estructura y permeabilidad de la membrana celular del hongo, desestabilizándola y haciéndola menos selectiva permitiendo el ingreso de sustancias nocivas (Bonmatin *et al.*, 2003 y Aranda *et al.*, 2005 referenciados en Ongena y Jacques, 2008; Deleu *et al.*, 2005 y Jacques *et al.*, 1999).

Se sugiere que las diferencias entre los porcentajes de inhibición obtenidos para las tres pruebas evaluadas posiblemente fueron ocasionadas por la variabilidad (proveniencia de las hojas necrosadas y densidad del inóculo) entre los aislados de *M. fijiensis* utilizados, ya que en algunos casos posiblemente se trabajó con aislados más susceptibles o resistentes hacia el agente inhibidor y adicionalmente, en las pruebas de antagonismo, se combatieron diferentes estadios del hongo (micelio y ascosporas).

Con base en los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro*, se realizaron pruebas bioquímicas de producción de sideróforos y Acido Indol Acético (Posada, 2009; datos no publicados) como procedimientos adicionales para determinar las dos mejores cepas a evaluar posteriormente en las pruebas *in vivo*.

Algunas investigaciones han demostrado que los sideróforos juegan un papel importante como determinantes de la inducción de resistencia sistémica inducida implicada en la nutrición de las plantas, que se caracteriza por ser uno de los principales mecanismos de control biológico de enfermedades (Choudhary *et al.*, 2007). Los sideróforos son componentes extracelulares de bajo peso molecular que tienen una alta afinidad con los iones férricos del suelo, por lo tanto son primordiales para el biocontrol ya que suprimen la actividad y mecanismos de acción de los fitopatógenos. Adicionalmente, las bacterias productoras de sideróforos son conocidas por las funciones complementarias que ejercen en el crecimiento de las plantas ya que estos son componentes que sirven como suplementos férricos que pueden desembocar un efecto PGPR (Shoda, 2000).

Otros autores han demostrado que el Acido Indol Acético (AIA) es una hormona de crecimiento que promueve el desarrollo de las plantas interviniendo en su actividad fotosintética (Barbieri and Galli (1993) citado en Van loon, 2007). El AIA es la auxina natural más importante que se encuentra presente en la mayoría de las plantas y se caracteriza porque regula diversos procesos del desarrollo vegetal

e influye en la división celular y la formación de raíces. Actualmente tiene un interés creciente en la agricultura ya que sustituye la utilización masiva de plaguicidas, fertilizantes y reguladores de crecimiento sintéticos (Castillo *et al.*, 2005).

Posada (2009, datos no publicados) reportó que las propiedades de producción de sideróforos y AIA de los aislados EA85 y EA129 son significativamente representativas sobre la cepa de *B.subtilis* EA123, por lo tanto, se sugiere que dichos aislados poseen elicitors que podrían inducir resistencia sistémica y hormonas de crecimiento que podrían promover el crecimiento vegetal. Por este motivo, los aislados EA85 y EA129 fueron seleccionados para la realización de las pruebas *in vivo*.

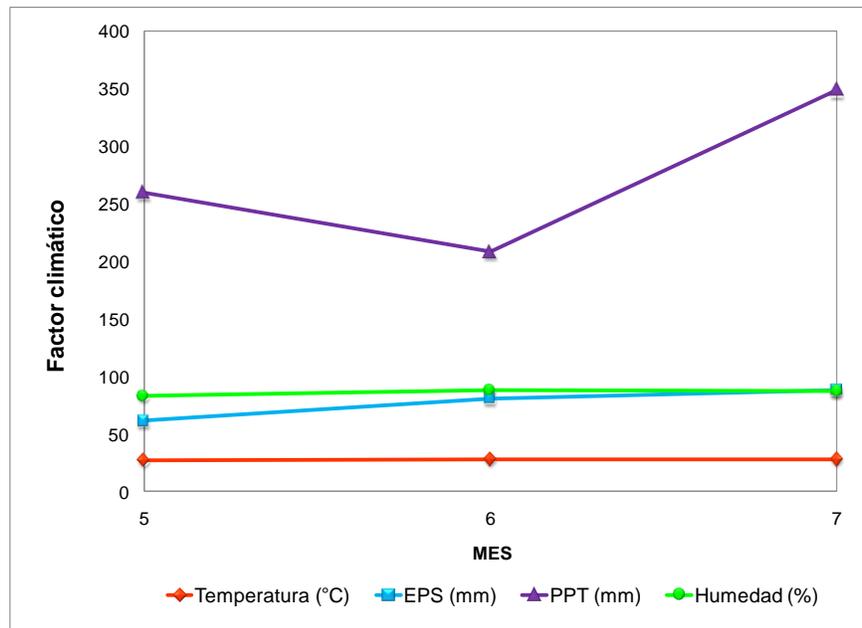
#### **4.3. EFECTO DE RIZOBACTERIAS BAFES SOBRE LA SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD A NIVEL *IN-VIVO***

##### **4.3.1. Factores ambientales**

Durante el tiempo de evaluación del ensayo *in vivo* (21 de mayo a 1 de julio), la temperatura se mantuvo constante con un valor de  $27,5 \pm 1$  °C, mientras que durante las primeras dos semanas (finales del mes 5 correspondiente a mayo), las precipitaciones venían presentando un valor promedio de 208 mm y a partir del mes de junio (mes 6) surgió una etapa de lluvias que ascendió desde los 208,7 mm hasta los 348,2 mm (gráfica 4). Así mismo se aumentó la evapotranspiración (81 mm) generando condiciones más favorables para el desarrollo de la enfermedad durante este período.

**Gráfica 4. Datos de precipitación (PPT), evapotranspiración (ETP), temperatura y humedad relativa correspondientes a los meses de mayo (05), junio (06) y julio (07) de 2009 en las instalaciones de AUGURA.**

Fuente: Gutiérrez, 2009. Estación climática Augura.



#### **4.3.2. Índice de infección (II), tasa de desarrollo (r) y HMJM**

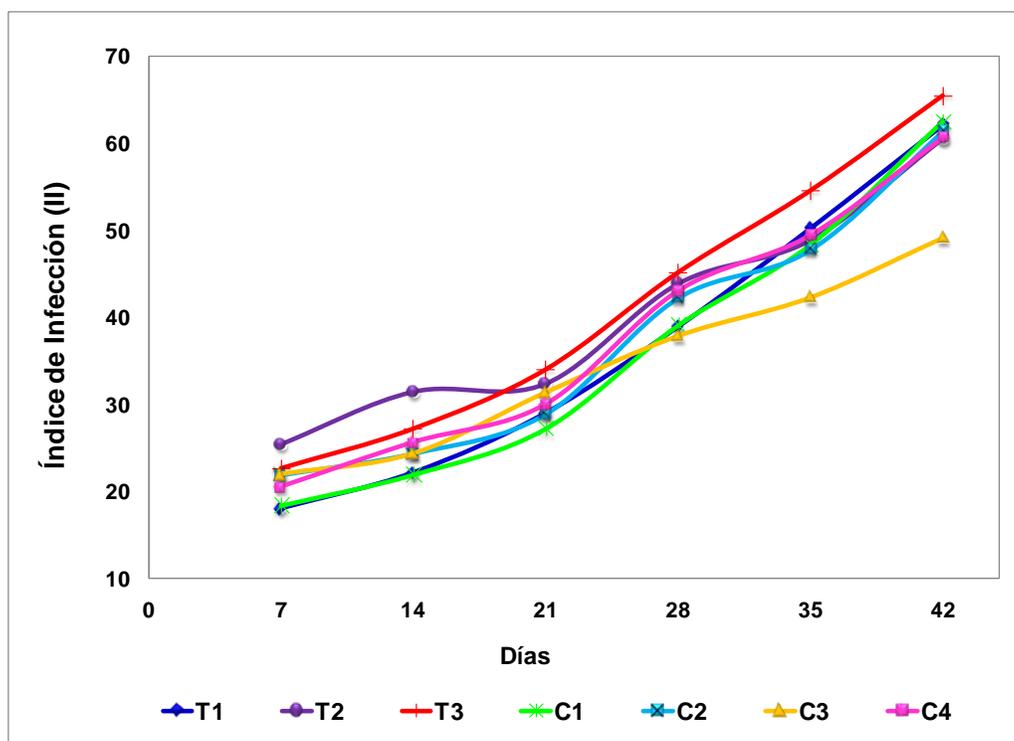
Las pruebas de antagonismo contra *M. fijiensis* a nivel *in vivo* con las dos BAFEs seleccionadas, se realizaron por tres metodologías: Índice de infección (II), tasa de desarrollo (r) y Hoja más joven manchada (HMJM).

Al analizar estadísticamente el área bajo la curva para la variable índice de infección (II) de Sigatoka negra se encontró que no se presentan diferencias estadísticamente significativas entre los diferentes tratamientos (valor  $p=0.29$ ) sin embargo se puede observar una tendencia de disminución para las variables II y ABC en el tratamiento C3 correspondiente a la aplicación del inductor de resistencia. Los tratamientos que mayor valor acumulado de incidencia de la enfermedad tuvieron fueron T3 y T2 correspondientes al consorcio y al aislado EA85 con valores de 203.5 y 196.8 respectivamente (gráfica 6). Adicionalmente,

las observaciones sobre el desarrollo de los síntomas de la enfermedad fueron basadas en los cambios de los grados de severidad entre una semana y otra, por lo tanto los síntomas iniciales de las plantas fueron de suma importancia para determinar sus consecuencias sobre el tratamiento (gráfica 5). Según lo anterior, para el tratamiento T2 específicamente, los síntomas iniciales (día 7) presentados, correspondieron a grados de infección más altos comparados con los demás tratamientos; lo que sugiere que probablemente las plantas se pudieron haber infectado en el invernadero incluso antes de realizar la inoculación artificial y natural; debido a su cercanía a zonas de alta densidad de la enfermedad, por lo tanto la enfermedad se manifestó más rápidamente; alcanzando un mayor valor de II.

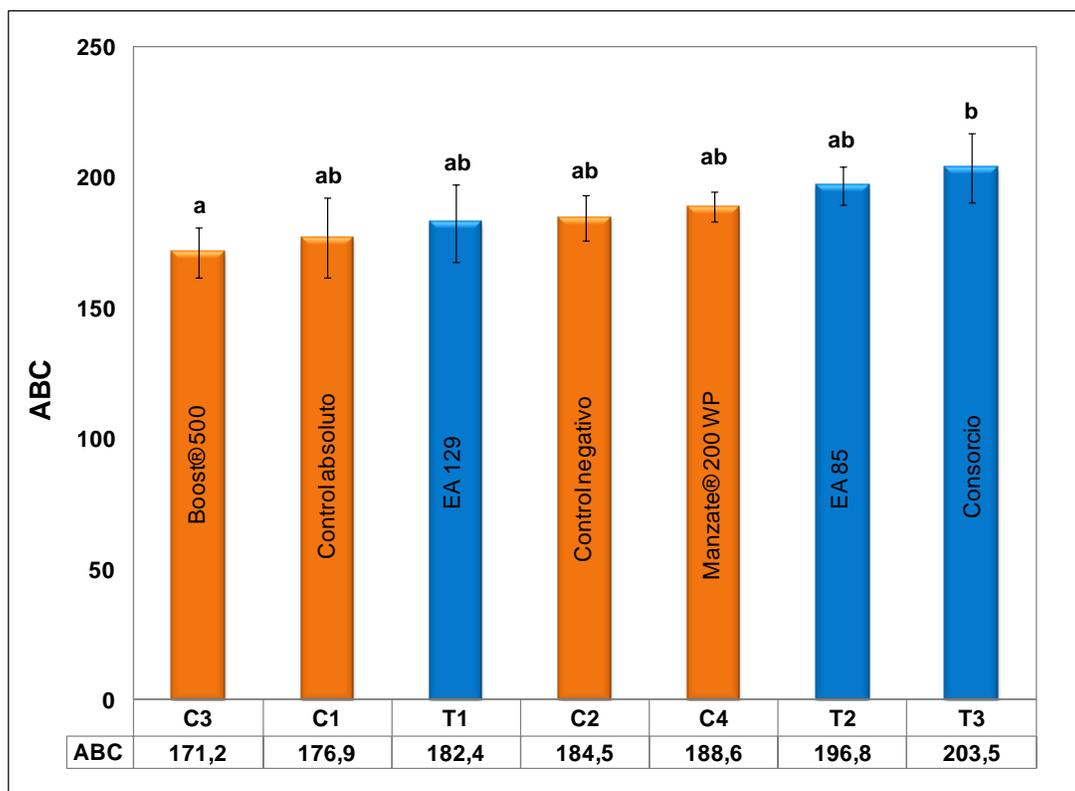
**Gráfica 5. Índice de infección en el tiempo de la enfermedad de la Sigatoka negra en plantas de banano cv. Gran enano tratadas con diferentes rizobacterias aeróbicas formadoras de endospora bajo condiciones *in vivo*.**

El tratamiento C1 es el control absoluto, C2 es el control negativo, C3 y C4 son controles positivos, los demás tratamientos T1, T2 y T3 corresponden a los aislados evaluados (EA129, EA85 y consorcio).



**Gráfica 6. Área bajo la curva (ABC) de la incidencia de la enfermedad de la Sigatoka negra en plantas de banano cv. Gran enano tratadas con diferentes rizobacterias aeróbicas formadoras de endospora bajo condiciones *in vivo*.**

El tratamiento C1 es el control absoluto, C2 es el control negativo, C3 y C4 son controles positivos, los demás tratamientos T1, T2 y T3 corresponden a los aislados evaluados (EA129, EA85 y consorcio). Barras verticales denotan el error estándar, y letras diferentes denotan diferencias significativas por LSD (P=0.29, Anexo IV).

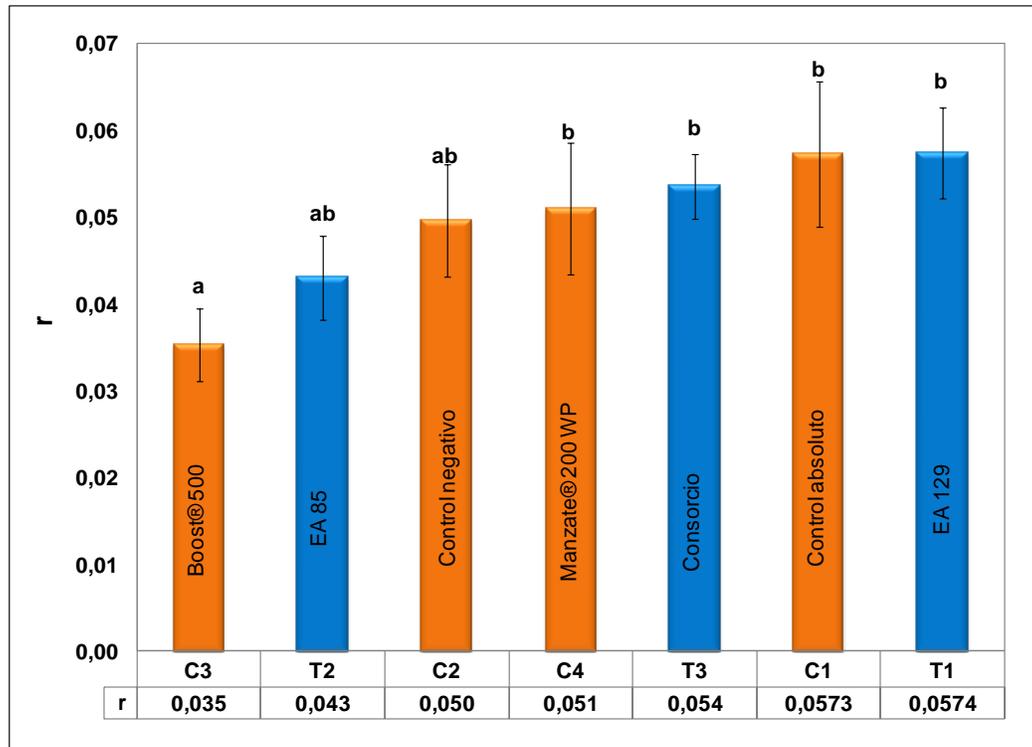


Una vez que se analizaron los datos de áreas bajo la curva se calculó para todos los tratamientos la tasa de desarrollo de la enfermedad ( $r$ ). A pesar de no presentarse resultados significativos en la evaluación estadística de esta variable se pudo observar que el tratamiento correspondiente a la aplicación del inductor de resistencia (C3) además de tener el menor  $r$  y ABC presentó también una menor tasa de desarrollo de la enfermedad, seguido por el tratamiento T2 (gráfica 7); lo que indica que probablemente, este último, tuvo la capacidad de retrasar el progreso de la infección aunque no su severidad. Estos resultados podrían sugerir que la aplicación de Boost® 500 y del aislado EA85 pudo conferir a la planta la

capacidad de disminuir su tasa de desarrollo presentándose una posible inducción de resistencia sistémica. Probablemente, este fenómeno le proporcionó a la planta una señal de defensa desencadenada por la capacidad de el aislado para producir compuestos como antibióticos, sideróforos, LPS entre otros y que posiblemente no se manifestó de manera más clara debido a que no se logró una adecuada colonización de las raíces por parte de las BAFEs (Choudhary *et al.*, 2007). Además, aunque las pruebas *in vitro* hubieran presentado resultados positivos, la actividad antagónica de dichas bacterias puede ocurrir únicamente cuando están en contacto directo con el hongo; inhibiéndolo con la producción de sustancias antifúngicas como las mencionadas anteriormente.

**Gráfica 7. Tasa de desarrollo de la enfermedad de la Sigatoka negra (r) en plantas de banano cv. Gran enano tratadas con rizobacterias aeróbicas formadoras de endospora bajo condiciones *in vivo*.**

El tratamiento C1 es el control absoluto, C2 es el control negativo, C3 y C4 son controles positivos, los demás tratamientos T1, T2 y T3 corresponden a los aislados evaluados (EA129, EA85 y consorcio). Barras verticales denotan el error estándar, y letras diferentes denotan diferencias significativas por LSD (P=0.29, Anexo V).



Aunque los resultados arrojados para la aplicación del Boost® 500 fueron los mejores en este estudio, no fueron los esperados debido a que en estudios anteriores se ha demostrado que este producto ha presentado muy buenos resultados (Patiño, 2001), y actualmente es utilizado con gran efectividad en el sector bananero. De igual forma, los resultados del control químico (Manzate® 200 WP) para el control de *M. fijiensis*, no presentaron diferencias con los demás tratamientos evaluados.

La variable de HMJM, que fue evaluada semanalmente para cada una de las plantas de los diferentes tratamientos, presentó un comportamiento homogéneo, por lo tanto no se pudo considerar como un valor representativo ya que para todos los tratamientos el promedio de la HMJM fue la hoja número 4 (Anexo VI).

Actualmente son pocos los estudios de inducción de resistencia en plantas monocotiledóneas como el banano, sin embargo se han encontrado resultados promisorios en arroz y grano de mijo perla (Pearl Millet) como los reportados por Nandakumar *et al.*, 2001 y Niranjan Raj *et al.*, 2003 referenciados en Vallad y Goodman (2004) a partir de cepas PGPR de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* contra *Rhizoctonia solani* (daño de la vaina) y *Sclerospora glaucum* (moho blando) respectivamente.

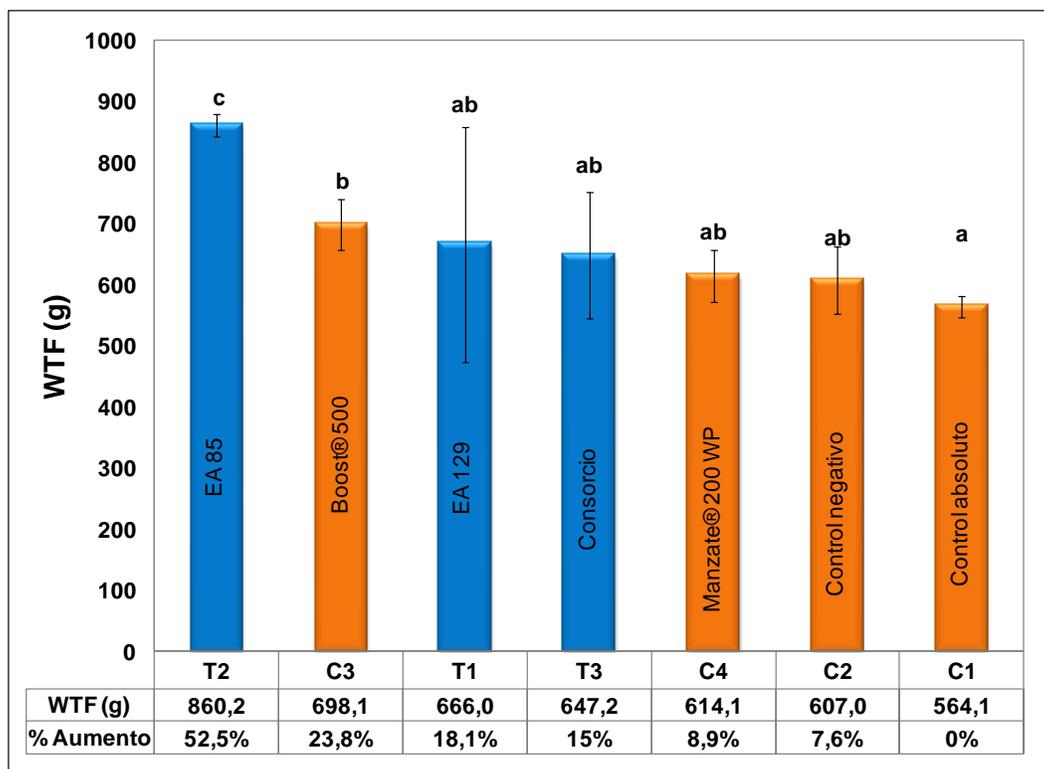
#### **4.4. EFECTO DE LAS RIZOBACTERIAS BAFES SOBRE LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO EN PLANTAS DE BANANO A NIVEL *IN VIVO***

La promoción de crecimiento de las plantas de banano cv. Gran enano a nivel *in vivo*, al ser sometidas a los diferentes tratamientos mencionados en la tabla 6 del numeral 3.7 fue evaluada luego de transcurridos los 61 días del ensayo. Se encontró que algunos tratamientos evaluados presentaron resultados promisorios en promoción de crecimiento para la biomasa fresca total (peso aéreo y peso radical) con relación al control absoluto (plantas sin inoculación de rizobacterias).

La gráfica 8 muestra los resultados de la biomasa fresca total (g) y de los porcentajes de aumento respecto al control negativo.

**Gráfica 8. Efecto de bacterias aeróbicas formadoras de endospora sobre la promoción de crecimiento del peso fresco total (WTF) en banano cv. Gran enano.**

T1, T2, y T3 denotan los tratamientos inoculados con los aislados EA129, EA85 y consorcio, respectivamente. C1, C2, C3 y C4 denotan el control absoluto, control negativo y controles positivos respectivamente. Barras verticales denotan el error estándar, y letras diferentes denotan diferencias significativas por LSD (P = 0.0003, Anexo VII)



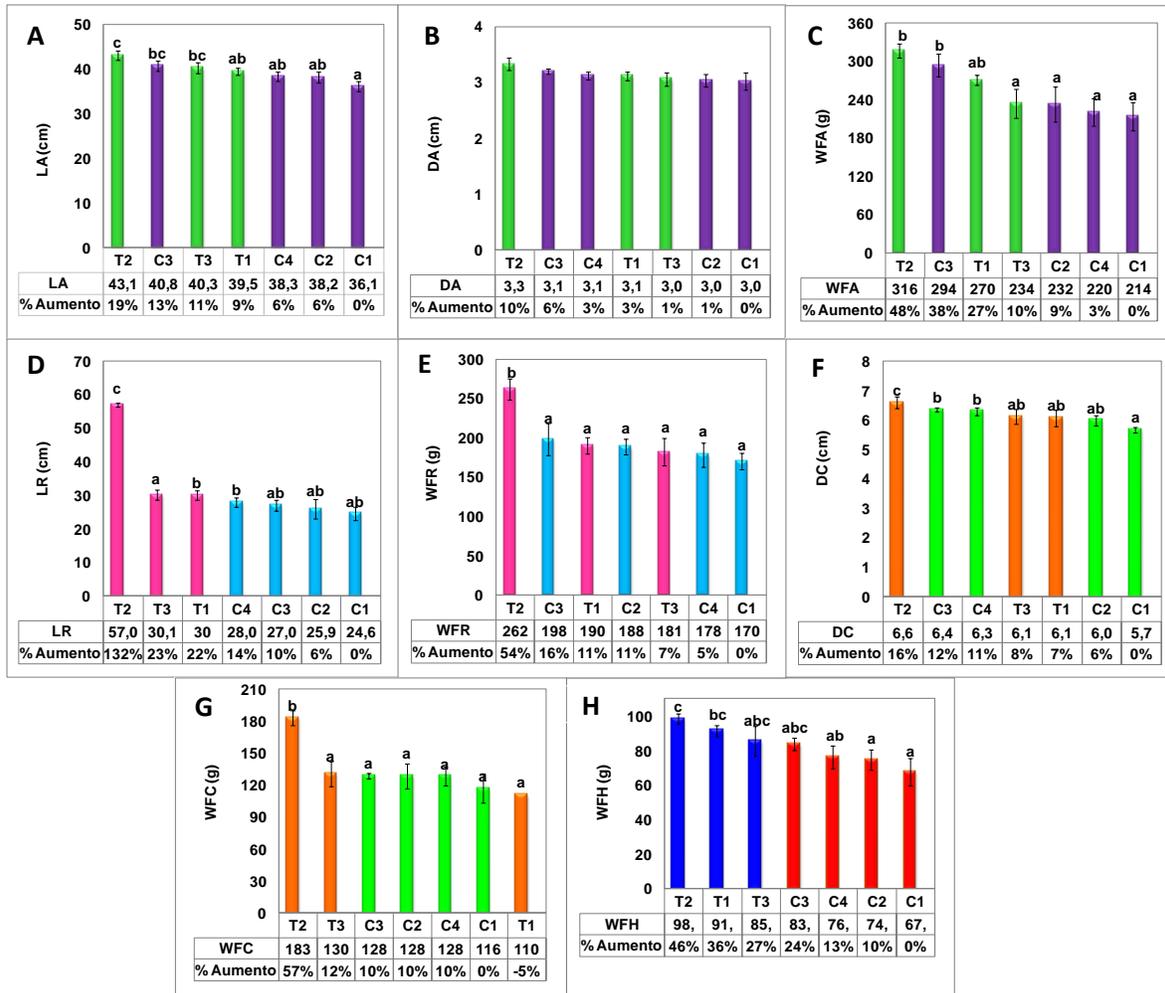
Se observó que el aislado EA85 (T2) presentó el mayor porcentaje de aumento en cuanto a biomasa fresca total (52.5%), seguido por el C3 (23.8%), presentando diferencias significativas frente al control absoluto mientras que los demás tratamientos presentaron porcentajes menos representativos (T1= 18,1%, T3= 15%, C4= 8,9% y C2= 7.6%) con respecto al control absoluto sin obtener diferencias significativas entre ellos; por lo que se considera que el aislado EA85, induce la promoción de crecimiento manifestada en la biomasa fresca total comparada con los demás tratamientos, inclusive con C3 (gráfica 8). Estos

hallazgos también pueden corroborarse con los resultados reportados en la gráfica 9 que hace referencia al porcentaje de aumento específico para cada variable de respuesta evaluada en el ensayo *in vivo* (LA, DA, WFA, LR, WFR, DC, WFC, WFH) para las cuales se presentaron diferencias significativas exceptuando la variable de DA ( $p_{LA}=0.0054$ ,  $p_{DA}=0.12$ ,  $p_{WFA}=0.0031$ ,  $p_{LR}=0.0059$ ,  $p_{WFR}=0.0031$ ,  $p_{DC}=0.0035$ ,  $p_{WFC}=0.0001$ ,  $p_{WFH}=0.0203$ ). Como se puede observar, el tratamiento T2 mostró un crecimiento significativamente elevado para todas las variables con resultados de 19%, 10%, 48%, 132%, 54%, 16%, 57%, 46% respectivamente, en relación al control absoluto, mostrando ser el tratamiento más exitoso en cuanto a promoción de crecimiento.

El tratamiento T3 correspondiente al consorcio bacteriano, no presentó diferencias significativas; debido a que se esperaba que la producción de metabolitos secundarios fuera mayor por el hecho de que se encontraban en consorcio. Lo anterior, puede atribuirse posiblemente a la presencia de un antagonismo entre las BAFEs que pudo inhibir la colonización de las mismas y la producción de metabolitos. Para futuras investigaciones se deben realizar pruebas de antagonismo entre las cepas de estudio para garantizar la colonización de las mismas.

**Gráfica 9. Efecto de bacterias aeróbicas formadoras de endospora sobre la promoción de crecimiento de banano cv. Gran enano.**

A. Longitud aérea (LA) ( $p=0.0054$ , Anexo VIII) B. Diámetro aéreo (DA) ( $p=0.12$ , Anexo IX) C. Peso fresco aéreo (WFA) ( $p=0.0031$ , Anexo X) D. Longitud radical (LR) ( $p=0.0059$ , Anexo XI) E. Peso fresco radical (WFR) ( $p=0.0031$ , Anexo XII) F. Diámetro de corno (DC) ( $p=0.0035$ , Anexo XIII) G. Peso fresco de corno (WFC) ( $p=0.0001$ , Anexo XIV) H. Peso fresco de las hojas (WFH) ( $p=0.0203$ , Anexo XV). Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test de rangos múltiples por el método LSD con 95% de confianza a excepción de la variable LR analizada por el test de Kruskal Wallis y la variable DA que no presentó diferencias significativas.



Para las variables WSC, WSA, WSR y WSH no se presentó la misma tendencia con respecto a los datos de peso fresco; es decir, los resultados no fueron proporcionales a los reportados para las mismas variables medidas en fresco. Esto pudo deberse a que probablemente se presentaron dificultades en el secado

de las muestras que impidieron detectar diferencias significativas ya que no se llegó a un peso constante. Adicionalmente las muestras se secaron en diferentes tiempos debido a la limitada capacidad del horno lo que pudo generar descomposición del tejido de las plantas almacenadas. Por lo tanto, se sugiere repetir el ensayo y garantizar un secado uniforme de todas las muestras en el mismo tiempo de evaluación.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente estudio, puede decirse en términos generales que el aislado EA85 correspondiente al tratamiento 2 fue el que presentó el mayor efecto promotor de crecimiento en las plantas de banano evaluadas. Este efecto podría sugerir que el aislado EA85 está expresando rasgos PGPRs en la rizosfera de banano ejerciendo efectos positivos sobre el crecimiento de las plantas; la producción de hormonas de crecimiento como auxinas, citoquininas y giberelinas; la solubilización de minerales como fosfatos y la oxidación de azufre entre otros, que beneficiaron a la planta para su desarrollo (Holguín *et al.*, 2003; Vessey, 2003; Choudhary *et al.*, 2007). Adicionalmente, según Posada 2009 (datos no publicados) el aislado EA85 presentó un valor representativo de AIA; la cual es una auxina encargada principalmente del enraizamiento y alargamiento apical y no se han encontrado reportes que demuestren que el AIA intervenga en el ensanchamiento del tallo (Raven *et al.*, 1992); por lo que puede sugerirse que posiblemente la promoción de crecimiento obtenida se deba a dicha hormona.

Algunas investigaciones en banano han demostrado resultados promisorios en promoción de crecimiento vegetal. Jaizme-Vega *et al.*, 2003 evaluaron el crecimiento de plantas de banano en dos cultivares diferentes (cv. Gran enano y cv. Híbrido TTC 1297) a través del uso potencial de rizobacterias del género *Bacillus*, obteniendo por medio de la aplicación de su consorcio y después de un periodo de cosecha, que el contenido mineral en las hojas era significativo únicamente en cv. Gran enano y la promoción del desarrollo de las plantas era

representativo en ambos cultivares; involucrando un aumento en la salud y en la tasa de supervivencia de la planta dentro del entorno. Por otra parte, Ramírez (2006) evaluó la promoción de crecimiento en plantas de banano a nivel *in vivo* por medio de cinco rizobacterias (3 *Pseudomonas* y 2 *Bacillus*) con capacidad PGPR asociadas a raíces de banano y plátano, obteniendo como resultado un aumento representativo en la masa radical de las plantas inoculadas.

Como procedimiento adicional a la evaluación de promoción de crecimiento, se realizó la prueba de salud radicular. En cuanto a la cuantificación de nemátodos (*Meloidogyne*, *R. similis*, *Helicotylenchus*, *Hoplolaimus*, *Pratylenchus* y *Mononchus*) no se encontró presencia de estos géneros en ninguno de los tratamientos. Por lo tanto, no puede asegurarse si los aislados evaluados tuvieron algún efecto en el desarrollo de estos, ya que no se presentaron ni siquiera en el control absoluto (C1).

#### **4.5. RECUPERACIÓN DE BACTERIAS TOTALES Y BAFES A NIVEL RADICAL DE PLANTAS DE BANANO**

La recuperación de bacterias de los diferentes tratamientos en el ensayo a nivel *in vivo* permitió encontrar morfologías similares a las de los aislados inoculados en los diferentes tratamientos. Algunas de las colonias observadas en los tratamientos T1, T2 y T3 guardan similitud física con los aislados EA85 (puntiforme, ondulada, plana, lisa brillante y blanca crema) y EA129 (irregular, ondulada, rugosa mate y blanca). Esto sugiere la probable presencia de los aislados inoculados en la rizosfera de las plantas evaluadas.

Al realizarse el análisis estadístico para el Log (UFC/mL) obtenido en la recuperación de bacterias para los diferentes tratamientos, no se encontraron diferencias significativas con respecto a bacterias totales y BAFES, probablemente por la selección inadecuada de las diluciones plateadas. Sin embargo, como se muestra en la tabla 8, las medias son mayores para los tratamientos que fueron

inoculados con las bacterias, lo cual sugiere que había mayor presencia de microorganismos y que además podrían haber correspondido a los aislados evaluados como se mencionó anteriormente.

**Tabla 8. Recuperación de bacterias totales y BAFES del suelo rizosférico de plantas de banano cv. Gran enano.**

p=0.48, Anexo XVI y p=0.99, Anexo XVII respectivamente

Tratamiento	A. Bacterias totales	B. BAFES
	Log UFC/mL	Log UFC/mL
T1	7,49	5,22
T2	7,41	5,5
T3	6,6	5,43
C1	6,88	5,21
C2	6	5
C3	6,3	5,1
C4	7,08	4,89

## 5. CONCLUSIONES

Los metabolitos producidos por las bacterias aeróbicas formadoras de endospora EA85, EA129 y la cepa de *B.subtilis* EA123 poseen una alta actividad antimicrobiana contra *M. fijiensis* a nivel *in vitro*.

La prueba de antagonismo que mejores resultados reportó fue la de inhibición del crecimiento micelial en cultivo sumergido con porcentajes de 93%, 89% y 87% al utilizar las BAFEs EA129, la cepa de *B.subtilis* EA123 y EA85.

La actividad antimicrobiana del extracto libre de células de la BAFE EA85 presentó los mayores porcentajes de inhibición de micelio expandido en medio sólido e inhibición de tubo germinativo con porcentajes de 44.3% y 67%, respectivamente en comparación con las BAFEs EA129 y la cepa de *B.subtilis* EA123.

Los extractos libres de células del aislado EA129 y la cepa de *B.subtilis* EA123 inhibieron el crecimiento de *M. fijiensis* en un 36.7%, 93%, 50% y 38.8%, 89%; 54% respectivamente en las diferentes pruebas *in vitro*.

Bajo las condiciones evaluadas el método de infección artificial que mostró mayor incidencia de la enfermedad fue el de micelio fraccionado comparado con el de ascosporas.

El inductor de resistencia Boost® 500 presentó el menor índice de infección y la menor velocidad de propagación de la enfermedad, mientras que el aislado EA85 presentó un alto índice de infección pero un valor bajo de diseminación de la enfermedad.

Las rizobacterias aeróbicas formadoras de endospora EA85 y EA129 promovieron el crecimiento de plantas de banano cv. Gran enano con un porcentaje de aumento de biomasa total de 52.5% y 0.4% respectivamente, por encima del control absoluto a excepción de su consorcio el cual presentó un retraso en el crecimiento del 6%.

## 6. RECOMENDACIONES

En el caso de la utilización del fungicida y el inductor de resistencia químico a nivel *in vivo*, se recomienda realizar las formulaciones como lo sugiere la casa comercial, ya que la exposición de las plantas a la intemperie puede ocasionar el lavado de las formulaciones con base en agua a causa de la precipitación y demás condiciones ambientales.

En cuanto a la recuperación de bacterias, se recomienda someter la muestra a un baño ultrasonido (47KHz  $\pm$  6%) durante 10 minutos para asegurar la remoción total de los microorganismos de la raíz y adicionalmente ampliar el rango de diluciones sembradas, con el fin de garantizar una concentración más alta de microorganismos y un crecimiento de estos dentro de un rango confiable.

Para la prueba de inhibición de tubo germinativo se recomienda utilizar esmalte transparente y no barniz industrial con el fin de obtener una mayor claridad de las ascosporas al observarlas en el microscopio, debido a que el barniz presenta una coloración amarilla que obstaculiza en parte la medición.

Para obtener mejores resultados y poder lograr un posible antagonismo sobre el hongo *M. fijiensis*, se recomienda realizar varias inoculaciones con los aislados un tiempo antes de someter las plantas a infección natural y/o artificial, con el fin de asegurar su colonización y adaptación al entorno rizosférico y puedan desarrollar algún mecanismo de defensa sobre la planta.

Es importante mencionar que para otros ensayos debería aumentarse el número de replicas para disminuir la variabilidad del mismo y así poder determinar si hay diferencias significativas entre los tratamientos.

## BIBLIOGRAFÍA

- A.E.B.E: Asociación de exportadores de banano del Ecuador. 2005. Historia del banano: El banano en Ecuador el mundo. En: <http://www.aebe.com.ec/Desktop.aspx?Id=14>. Acceso: Agosto de 2009.
- Araya, M. 2002. Metodología utilizada en el laboratorio de nematología de CORBANA S.A. para la extracción de nemátodos de las raíces del banano (*Musa AAA*). 98-109.
- Armendariz, O. 2002. Visión macro del sector bananero. Dirección de investigaciones.
- Arzate, J.; Michel, A; Domínguez, V.; Santos, O. 2006. Antagonismo de *Trichoderma* spp. Sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, agente causal de la Sigatoka negra del plátano (*Musa sp.*) *in vitro* e invernadero. Revista mexicana de fitopatología 24: 98-104.
- ASCC: American Samoa Community College. 2004. Black Leaf Streak Disease. Pests and diseases of American Samoa. Number 10.
- Augura: Asociación de bananeros de Colombia. 2007. Coyuntura bananera Colombiana 2006. En: [www.augura.com.co](http://www.augura.com.co). Acceso: Septiembre de 2009.
- Barrios, M.A. 2006. Estudio de hongos endofíticos como inductores de resistencia para el control de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella Fijiensis* Morelet) en plátano. Turrialba, Costa Rica. Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza (CATIE).

- Bowen, G.D. y Rovira, A.D. 1999. The rhizosphere and its management to improve plant growth. *Advances in agronomy*, 66: 1-102.
- Burr, T.J.; Schroth, M.N. y Suslow, T. 1978. Increased potato yield by treatment of seedpieces with specific strains of *Pseudomonas fluorescens* and *P. putida*. *Phytopathology*, 68: 1377-1383.
- Camacho, J.C. 1997. Evaluación de microorganismos promotores de crecimiento e inductores de resistencia a Sigatoka negra (*M. fijiensis*) en banano (*Musa* sp.) y algunas observaciones sobre la gutación. Turrialba, Costa Rica. Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza (CATIE).
- Carlier, J., D. De Waele y J.V. Escalant. 2002. Evaluación global de la resistencia de los bananos al marchitamiento por *Fusarium*, enfermedades de las manchas foliares causadas por *Mycosphaerella* y nemátodos: Evaluación extensiva (A. Vézina y C. Picq, eds). Guías técnicas INIBAP 6. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, Montpellier, Francia.
- Castillo, G; Altuna, B; Michelena, G; Sánchez, J; Acosta, M. 2005. Cuantificación del contenido de ácido indolacético (AIA) en un caldo de fermentación microbiana. *Anales de Biología* 27: 137-142.
- CATIE. 2006. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. En: <http://web.catie.ac.cr/informacion/RMIP/rmip53/IMAGES/fig1htx.jpg>
- Choudhary, D.K.; Prakash, A. y Johri, B.N. 2007. Induced systemic resistance (ISR) in plants: mechanism of action. *Indian J. Microbiol.* 47: 289–297.
- Correa, J. 2009. Aislamiento y análisis de cDNAs expresados diferencialmente en cultivares resistentes y susceptibles de banano (*Musa* spp.) durante la

- interacción con *Mycosphaerella fijiensis*. Tesis de maestría en Biología, Medellín, Colombia. Universidad de Antioquia. Centro de Investigación Biológica (CIB). 67p.
- Craenen, K. and Ortiz, R. 1998. Influence of black Sigatoka disease on the growth and yield of diploid and tetraploid hybrid plantains. *Crop protection*, 17: 13-18.
- Deleu, M.; Paquoy, M.; Nylander, T. 2005. Fengycin interaction with lipid monolayers at the air-aqueous interface implications for the effect of fengycin on biological membranes. *Journal of Colloid And Interface Science* 283: 358-365.
- Diccionario de Especialidades Agroquímicas. PLM edición 19. 2009. Colombia. 1080p.
- División de producción y protección vegetal. Organización de la alimentación y la agricultura de las naciones unidas FAO. "taller de solarización". 1995. Escuela agrícola panamericana "el zamorano". Honduras.
- Donzelli, B.G.G. y Churchill, A.C.L. 2007. A quantitative assay using mycelial fragments to assess virulence of *Mycosphaerella fijiensis*. *Phytopathology*. 97: 916-929.
- Espinal, C.; Martínez, H.; Peña, Y. 2005. La cadena de banano en Colombia, una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Observatorio Agrocadenas Colombia. Documento de trabajo N° 60. En: [www.agrocadenas.gov.co](http://www.agrocadenas.gov.co). Acceso: Marzo de 2009.
- Gauhl, F. 1989. Untersuchunge zur epidemiologie un okoloigie de schwarsen sigatoka Krankheit (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) an Kockbonanen (*Musa* sp.) in Costa Rica. Thesis Univ. Gottingen (West Germany), 128 p.
- Gutiérrez, C. 2009. Boletín climático # 28, 29 y 30. Estación climática Augura. 2p

- Heerklotz, H. and Seelig, J. 2007. Leakage and lysis of lipid membranes induced by the lipopeptide surfactin. *Eur Biophys J*36: 305-314.
- Hernández, L. G. y Escalona, M. A. 2003. Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR. *Revista de divulgación científica y tecnológica de la universidad Veracruzana*. 16(1).
- Hidalgo, M.; Tapia A.; Rodríguez W. y Serrano E. 2006. Efecto de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) sobre la fotosíntesis y transpiración foliar del banano (*Musa* sp. AAA, cv. Valery). *Agronomía Costarricense*. 30 (1): 35-41.
- Holguín, G; Bashan, Y; Puente, E; Carrillo, A; Bethlenfalvay, G; Rojas, A; Vázquez, P; Toledo, G; Bacilio, M; Glick, B.R; González, L; Lebsky, V; Moreno, M. y Juan Pablo Hernández. 2003. Promoción del crecimiento en plantas por bacterias de la rizosfera. *Agricultura Técnica en México*. 29(2): 201-21.
- Hoss, R., Helbig, J. y Bochow, H. 2000. Function of Host and Fungal Metabolites in Resistance Response of Banana and Plantain in the Black Sigatoka Disease Pathosystem (*Musa* spp.-*Mycosphaerella fijiensis*). *J. Phytopathology*. 148: 387-394.
- Horneck, G.; Rettberg, P.; Reitz, G.; Wehner, J.; Eschweiler, U.; Strauch, K.; Panitz, C.; Starke, V.; Baumstark-Khan, C. 2001. Protection of bacterial spores in space, a contribution to the discussion on panspermia. *Origins of Life and Evolution of the Biosphere* 31: 527-547.
- Hoyos, R. 2007. Proyecto especial Sigatoka negra. Cenibanano. En: [www.augura.com.co/Revista%20definitiva%20JULIO.pdf](http://www.augura.com.co/Revista%20definitiva%20JULIO.pdf). Acceso: Julio 27/09.
- Jacques, P.; Hbid, C.; Destain, J.; Razafindralambo, H.; Paquot, M.; De Pauw, E. and Thonart, P. 1999. Optimization of biosurfactant lipopeptide production from

*Bacillus subtilis* S499 by Plackett-Burman Design. Applied Biochemistry and Biotechnology. 77-79. 223-233.

Jaizme-Vega, M.C.; Rodriguez, A.S.; Piñero, M.S. 2003. Potential use of Rhizobacteria from the *Bacillus* genus to stimulate the plant growth of micropropagated banana. *Fruits* 59 (2): 83-90.

Kloepper J. 1993. Plant growth-promoting rhizobacteria as biological control agents. En: Metting FB, Jr (ed) Soil Microbial Ecology – Applications in Agricultural and Environmental Management (pp 255–274) Marcel Dekker, New York.

Kloepper, J.; Rodríguez, R.; Zehnder, G.; Murphy, J.; Sikora, E.; Fernández, C. 1999. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology* 28: 21-26.

Kloepper, J.; Schroth, M.N., y Miller, T.D. 1980. Effects of rhizosphere colonization by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria on potato plant development and Yield. *Phytopathology*, 70: 1078-1082.

Liu, L.; Kloepper, J.; Tuzun, S. 1995. Induction of Systemic Resistance in Cucumber by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria: Duration of Protection and Effect of Host Resistance on Protection and Root Colonization. *Phytopathology* 85: 1064-1068.

Marín, H.D.; Romero R.A.; Guzmán, M.; Sutton, T.B. 2003. Black Sigatoka: and increasing threat to banana cultivation. *Plant Disease*, 87 (3): 208-222.

Miranda, J.E. 1996. Evaluación de microorganismos antagonistas al hongo *Mycosphaerella Fijjensis* (Morelet), colocados en el interior y exterior de la

planta de banano. Turrialba, Costa Rica. Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza (CATIE).

Mourichon, X.; Carlier, J.; Fouré, E. 1997. Enfermedades de Sigatoka: Raya negra de la hoja (Sigatoka negra) y Enfermedad de Sigatoka (Sigatoka amarilla). INIBAP: Hoja divulgativa N° 8. En: [http://www.bioversityinternational.org/fileadmin/bioversity/publications/pdfs/699\\_ES.pdf](http://www.bioversityinternational.org/fileadmin/bioversity/publications/pdfs/699_ES.pdf). Acceso: Julio 27/09.

Ongena, M. and Jacques, P. 2008. *Bacillus* lipopeptides: versatile weapons for plant disease biocontrol. *Trends in Microbiology*, 16 (3): 115-125.

Orjeda, G. 1998. Evaluación de la resistencia de los bananos a las enfermedades de Sigatoka y marchitamiento por *Fusarium*. Guías Técnicas INIBAP 3. Instituto internacional de los recursos fitogenéticos, Roma, Italia; Red internacional para el mejoramiento del banano y el plátano, Montpellier, Francia. 33-43p.

Orozco, M.; Farías, J.; Manzo, G.; Guzmán, S. 2002. Manejo integrado de la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) del banano en el trópico seco de Mexico. Acorbat: sesión oral fitoprotección. En: [www.musalit.inibap.org/pdf/IN030014\\_es.pdf](http://www.musalit.inibap.org/pdf/IN030014_es.pdf). Acceso: Julio 27/09.

Osorio, G.P. 2006. Evaluación de hongos endofíticos y extractos botánicos para el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banano. Tesis de maestría en ciencias, Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Programa de enseñanza para el desarrollo y la conservación. Escuela de posgraduados. 91 p.

Otálvaro, F.; Nanclares, J.; Vásquez, L.; Quiñones, W.; Echeverri, F.; Arango, R. y Schneider, B. 2007. Phenalenone- type compounds from *Musa acuminata* var.

- “Yangambi Km 5” (AAA) and their activity against *Mycosphaerella fijiensis*. Journal of natural products. 70:887-890.
- Patten, C. L. and Glick, B. R. 2002. Role of *pseudomonas putida* Indoleacetic Acid in Development of the Host Plant Root System. Applied and Environmental Microbiology. 68: 3795-3801.
- Patiño H., L.F. 2001. Efecto de una fuente de energía, tres inductores de resistencia y un sustrato foliar sobre Sigatoka negra en banano. Tesis de maestría en ciencias, Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Programa de enseñanza para el desarrollo y la conservación. Escuela de posgraduados. 73 p.
- Peláez, J.E.; Vásquez, L.E.; Díaz T.J.; Castañeda, D.A.; Rodríguez E. and Arango R.E. 2006. Use of a micro tittle plate dilution assay to measure activity Of antifungal compounds against *Mycosphaerella fijiensis*, Morelet. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín. 59(2): 3425-3433.
- Pérez, J.E. 2007. Selección de mutantes espontáneos resistentes a rifampicina de rizobacterias aisladas de banano y plátano. Universidad de Antioquia. Facultad de ciencias exactas y naturales, Medellín.
- Pérez, L. 1996. Manual para el manejo integrado de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y Sigatoka amarilla (*Mycosphaerella musicola* Leach ex Mulder) en banano y plátano. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Cuba.
- Pieterse, C.; Van Loon, L. 1999. Salycylic Acid-independent plant defence pathways. Trends in plant science reviews 4 (2): 52-58.

- Pieterse, C.; Van Pelt, J.; Ton, J; Parchmann, S.; Mueller, M.; Buchala, A.; Métraux, J.; Van Loon, L. 2000. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance (ISR) in Arabidopsis requires sensitivity to jasmonate and ethylene but is not accompanied by an increase in their production. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 57: 123-134.
- Ponce, A.; Connon, S.; To Yung, P. 2008. Chapter 19: Detection and viability Assessment of Endospore-Forming Pathogens (481-523pp). Book: Principles of bacterial detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems.
- Ramírez, C.A. 2005. Aislamiento y evaluación de rizobacterias con potencial biocontrolador y promotor de crecimiento en plantas de banano. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias, sede Medellín.
- Ramírez, C.A.; Rodríguez, P.A.; Bustamante, E. 2006. Diseño de un sistema de protección radicular y foliar, a partir de microorganismos presentes en la rizosfera de banano y plátano. Asociación de Bananeros de Colombia, AUGURA.
- Ramírez, M. 2008. Rizobacterias asociadas a crisantemo (*Dendrathera grandiflora*. Tevelev) con potencial para promover crecimiento vegetal. Tesis de pregrado en Biología. Universidad de Antioquia. 45p.
- Raven, P; Evert, R.F. y Eichhorn, S.E. 1992. Biología de las plantas. Vol 2. Editorial Reverté S.A. p492
- Raupach, G.S. y Kloepper, J.W. 2000. Biocontrol of cucumber diseases in the field by plant growth-promoting rhizobacteria with and without methyl bromide fumigation. *Plant Disease*, 84: 1073-1075.
- Reigart, J. and Roberts, J. 1999. Recognition and management of pesticide poisonings. Fifth edition. Chapter 1, 2-7.

- Riveros, A.; Rosales, F.; Pocasangre, L. 2001. Manejo alternativo de *Mycosphaerella fijiensis* a través de la inducción de resistencia y uso de bioproductos. En: [http://www.infoagro.com/hortalizas/manejo\\_alternativo\\_Mycosphaerella\\_fijiensis\\_bioproductos.htm](http://www.infoagro.com/hortalizas/manejo_alternativo_Mycosphaerella_fijiensis_bioproductos.htm). Acceso: Septiembre 2009.
- Riveros, A.S.; Giraldo, C.I. and Gamboa, A. 2003. Microbiological control of black leaf streak disease. *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. INIBAP. 287-296.
- Schroth, M.N. y Becker, J.O. 1990. Concepts of ecological and physiological activities of rhizobacteria related to biological control and plant growth promotion. *Biological control of soil-borne plant pathogens*. 389-414.
- Schroth, M.N. y Hancock, J.G. 1981. Selected topics in biological control. *Annual Review of Microbiology*, 35: 453-476.
- Schroth, M.N. y Hancock, J.G. 1982. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. *Science* 216(4553): 1376-1381.
- Schwyn, B. y Neilands, J.B. 1987. Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Analytical biochemistry* 160: 47-56.
- Shirokov, A.; Loginov, O.; Melent'ev, A.; Aktuganov, G. 2002. Protein and peptide factors from *Bacillus sp.* 739 Inhibit the growth of Phytopathogenic fungi. *Applied biochemistry and microbiology* 38: 139-143.
- Shoda, M. (2000). "Bacterial Control of plant disease". *Journal of Bioscience and Engineering*, 89 (6): 515-521.
- Sierra, L. y Moncada, R.N. 2009. Purificación y caracterización parcial de compuestos de *Bacillus subtilis* UA321 contra *Mycosphaerella fijiensis*. Tesis de pregrado en Ingeniería de Procesos. Medellín, Colombia. Universidad Eafit.

- Stansbury, C.; McKirdy, S.; Power, G. 2000. Black Sigatoka: Exotic threat to Western Australia. *Mycosphaerella fijiensis*. Fact Sheet N°14. Agriculture Western Australia. ISSN1443-7783.
- Talavera, M.E.; Bustamante, E.; González, R.; Sánchez, V. 1998. Selección y evaluación en laboratorio y campo de microorganismos glucanólíticos antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis*. *Manejo integrado de plagas (Costa Rica)* 47: 24-30.
- Torrado, M.; Castaño, J. 2008. Frecuencia de las Sigatokas negra y amarilla en plátano (*Musa* spp.) de acuerdo a los estados de desarrollo de la planta. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* 32(125): 465-470, ISSN 0370-3908.
- Uniban: Unión de Bananeros de Urabá S.A. 2005 En: <http://74.125.47.132/search?q=cache:Dfn53HFAZgJ:www.uniban.com/admin/noticias.asp%3FId%3D5+http://www.uniban.com/admin/noticias.asp%3FId%3D5&cd=1&hl=es&ct=clk&gl=co>. Acceso: Septiembre de 2009.
- Vallad G.E., y Goodman, R.M. 2004. Systemic Acquired Resistance and Induced Systemic Resistance in Conventional Agriculture.
- Van Loon, L.C. 2007. Plant responses to plant growth-promoting rhizobacteria. *Eur J Plant Pathol* 119: 243-254.
- Van Loon, L.C. and Bakker, P.A.H.M. 2006. Induced systemic resistance as a mechanism of disease suppression by rhizobacteria. En *PGPR: Biocontrol and Biofertilization* (Siddiqui, Z.A., ed.). Springer. 39-66.
- Van Loon, L.C., Bakker, P.A.H.M., Pieterse, C.M.J., 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria.

- Vásquez, N.; Tapia, A.C.; Galindo, J.J. 1988.  $\mu$ L trastructural studies of the infection process of *Mycosphaerella Fijiensis* on *Musa* cultivars. 191-200.
- Vessey J. Kevin 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant and Soil* 255: 571-586.
- Zahir, Z., Arshad, M. y Frankenberger, Jr. T. 2004. Plant growth-promoting rhizobacteria: applications and perspectives in agriculture. *Advances in Agronomy*, 81: 97-168.
- Zhinong, Y., Reddy, M.S., Ryu, M.C., McInroy, J.A., Wilson, M. and Kloepper, J.W. 2002. Induced systemic protection against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology. Biological control.* 92:1329-1333.

## ANEXOS

### ANEXO I. Datos y análisis estadístico para la prueba de crecimiento de micelio expandido

Tabla con resultados obtenidos y análisis estadístico por medio de: test de varianza, test de Kruskal-Wallis, diagrama de caja y bigotes, normalidad e histograma de frecuencias para la prueba de antagonismo *in vitro* de crecimiento de micelio expandido.

PRUEBA DE ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i> DE MICELIO EXPANDIDO																																
	C. abs	C. abs	C. abs	Molp	Molp	Molp	UA321	UA321	UA321	EA123	EA123	EA123	EA87	EA87	EA87	EA85	EA85	EA129	EA129	EA129	EA98	EA98	EA104	EA130	EA130	EA130	EA229	EA229	EA229	EA250	EA250	
DIÁMETRO (mm)	3,8	4	3,8	4	3,8	3,9	2,8	2	1,8	2,3	2,5	2,1	3,9	4,1	3,9	2,2	2,1	1,4	2	2,3	2,1	2	3,6	3,5	2,5	2,1	3	2,7	3,5	3,5	3	3
	3,9	4,3	4,2	3	3,2	3,5	2,5	2,1	2,3	2,7	2	3	3,7	3	3,4	2,1	2	1,6	2,6	2,3	3,5	2,5	3	3	3,7	2	3	3	3	4	3	3
	4	3,9	4,4	4,1	4,2	3,6	2,9	2,3	2,6	2,2	2,1	2	3,4	3	4,6	3	2,2	2	2,5	2,3	2,7	2,4	2,6	2,7	3,3	2	2,1	2,8	3	3,6	2,4	3,5
	4,2	4	4	4	3,8	3,5	2,5	2,3	2,2	2,8	2	2,5	3,5	3	3,8	1,9	2,8	2	2	2,4	2,8	2,6	3,3	3	3,2	2	2,6	3,7	3	3,5	2,6	3,2
	3,5	3,6	4,1	3,6	4	3,7	2,8	2	2	2	2	3	3,6	3	3	2,2	2,5	1,7	2,5	2	2,5	2,1	3,2	2,8	3	2,6	3	3,5	4	3,2	2,8	3
	4,3	3,6	4,3	3,2	3,5	4	2,1	2,2	2,9	2,1	2,3	2,4	3,9	3	4	1,9	2,1	2	2,3	2,2	2,2	3	3	2,7	3	1,5	2,5	2,8	2,5	3	2,8	4
	3,9	4,3	4,6	3,5	3,7	3,4	2,3	2,2	2,7	2	2,2	2,7	3,8	3	3,5	2	2,3	2,4	2,8	2,1	2,2	2,1	3	2,5	2,7	2	2,5	2,6	2,7	3	2,5	3,7
	3,9	4	3,9	4	3,5	3,6	2,7	2	3,1	2	2,5	2	4	3,3	3,2	1,9	2,8	2	2,4	2,5	3	2	3	2,8	2,8	2,3	3	2,3	4	3,5	2,8	3,2
	4,1	3,9	3,5	3,4	3,1	3,5	2,5	1,8	3	2	2	2,8	4	3,8	2	2	2,5	2,3	2,6	2	2,6	2,2	3	3	3	2,9	3,5	2,6	4	3,5	2,9	3,3
	4,4	3,8	3,5	4	3,9	4	2,2	2	3	2,5	2,1	2	3,7	3,7	2,7	2,1	2	2,4	2,7	2,2	2,8	2	2,8	3,2	3	2,3	3	3	3,8	3,8	2,8	3,2
	3,9	4,4	3,5	4	4	3,5	2,7	2,2	3	2,2	2	2,2	3,6	3	3	1,9	2,1	1,5	2,8	2,6	2,7	3	3,3	3	3	2,4	3,2	4,5	3,5	3	3	3,7
	3,8	4,2	4,2	3,9	4	4	2	1,9	2,8	2	1,7	2,3	3,6	3,4	3,5	3	2,5	2,3	2,5	2,5	2,5	2	3	3	3,4	2,5	3	3,5	3,2	4	2,6	3,5
	4	3,9	3	3,6	3,5	3,4	2,2	2,1	2,5	2,2	2,3	2,5	4,2	4	4	2,3	1,8	2,5	2,4	2,5	2	2,3	3,3	3	3,2	2,3	3	3,8	3,5	3	2,5	3,6
	4,3	4,5	4	3	3,7	3,5	2,6	2,2	2,1	2,5	2,5	3	3,6	3	3,5	2	2	2,2	2,3	3	2,4	2,3	2,6	4	3,2	2,8	3	3,3	3,4	3,6	2,6	4
	2,9	4,2	3,4	3,3	3,6	3,3		2,3	1,8	2,3	3	3	3,6	3	4	3	2,4	2	2,6	2,8	3	2,3	2,5	3,5	2,8	2,6	3	3,2	4	3,5	2,7	3
	4,6	4,6	3,7	3,4	3,5	3,6		2,2	1,9	1,8	3,2	3	3,7	4,5	3,3	1,6	2,2	2	3	2,5	2,5	2,3	2,9	3	3,2	2,2	3,1	3,5	3,7	3,3	2,6	2,7
	3,9	4,4	3,9	3,7	3,5	4,2		2,2	2	1,7	2	2		3,5	4,5	2	2,2	2,4	2,5	2,6	2,5	2,3	3,3	4	3	2,1	3,5	3	4,2	3	2,6	3
	2,8	3,9	4	3,1	3,2	5		2,3	2	2,4	2,1	2,9		3,7	4	1,7	2,2	2,5	2,7	2,2	2,3	2,7	2,8	3		2,3	3	4,2	4,1	3	3	3
	3,7	3,6	4,8	3,4	3,4	3,1		2,4	2,8	2,2	2,4	3		4		3	2	2,6	3	2	2,6	2	2,9	2,7		2		3,2	4	3	2,8	3,5
	3,2	4	3,6	3,6	3	3,8		2	3,1	2,8	2,3	2,8				2,2	2	3	2,6	2,2	3	2,2	3	3,3		2,5		3,7	3,9	4	3,2	3,2
	3,4	4	3,6	3,2	3,9	3,7		2,4	2,5	2,8	2	2,6				1,5	2,5	2	3	2	3,3	2,3	2,8	3		2,4		2,5	3,8	3,9	2,9	3,2
	3,6	4	3,9	3,5	4	3,5		2,3	1,8	2,6	2,1	2,5				2,3	2,3	1,2	2,5	2	2,5	2	2	3,3				3	3,8	4,5	2,7	3,1
	3,9	4,1	4,1	3,4	4	3,5		2,3	1,7	2,7	2,5	2,3				1,2	2,7	2,5	2,5	1,9	3	2,2	2,8	2,8				3,2	3	3,5	3,2	2,9
	3,1	3,6	3,9	3,8	3,9	4		2,2	2,7	2,1	3	3				2,3		2,8	2,5	2,3	2,5	2	3	3,3				3,3	4	4	3,4	3,2
	4,3	3,2	3,4	3,6	4	3,3		1,9	3,1	2,6	3,2	2,4				2,1		2,9	2,4	2,2	2,6	1,9	2,8	3				2,6	3,5	3,3	3	3
	4,7		4,7	3,6	3,8	3,4		2	3	2,6	2,8	2,3				2		2,5	3	2,2	2,8	2,2	3,2	2,7				3	3,4	3,5	3,2	3
	4,5		3,9	4,2	3,5	4		2,2	3	2,1	3,3	2				2,2		2,4	2,7	2		2	3,2	3				3,9	5	4	2,9	3
	3,9		3,6	3,5	4	3,4		2,1	2,1	2	3,2	1,8				2		3	2,2	2,5	3	3,2						3,5	3,2	3,5	2,7	3,5
	3,8		4	3,5	3,6	3,5		2,1	1,9	2	3,2	2				2,2		2	2			2,1	3	3,3				3,56		3	3,2	3
	4		4,5	3,8	4	3,8		2,3	1,8		3,4	2,5				1,9		1,5	2			2,5	3	3				3		3,4	3	3

Variance Check

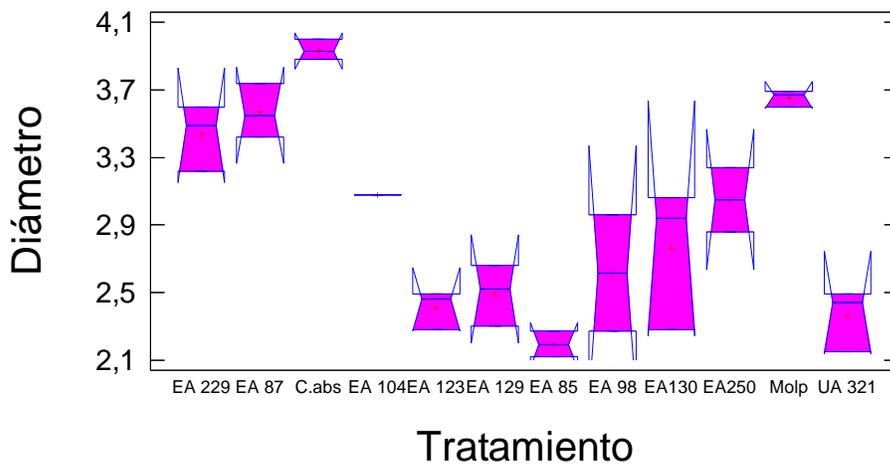
Cochran's C test: 0,3709 P-Value = 0,134  
 Bartlett's test: 2,34251 P-Value = 0,172  
 Hartley's test: 106,59  
 Levene's test: 1,13011 P-Value = 0,38985

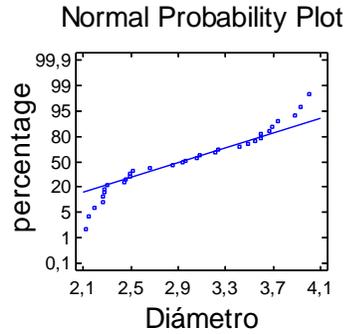
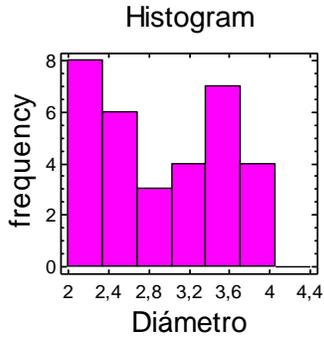
Kruskal-Wallis Test for Diámetro by Tratamiento

Tratamiento	Sample Size	Average Rank
EA 229	3	22,8333
EA 87	3	25,0
C.abs	3	31,0
EA 104	1	19,0
EA 123	3	9,33333
EA 129	3	11,6667
EA 85	3	2,83333
EA 98	2	10,75
EA130	3	13,5
EA250	2	18,0
Molp	3	26,8333
UA 321	3	7,5

Test statistic = 27,515 P-Value = 0,00383916

Diámetro (Box-and-Whisker Plot)





95% confidence intervals  
 Mean: 2,9641 +/- 0,22307 [2,741,3,1871]  
 Sigma: [0,49603,0,82258]

Diagnostics  
 Shapiro-Wilks P-value = 0,0082  
 Lag 1 autocorrelation = 0,70564 +/- 0,34648

## ANEXO II. Datos y análisis estadístico para la prueba de crecimiento en cultivo sumergido

Tabla con resultados obtenidos y análisis estadístico por medio de: test de varianza, test de Kruskal-Wallis, diagrama de caja y bigotes, normalidad e histograma de frecuencias para la prueba de antagonismo *in vitro* de microplatos.

PRUEBA DE ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i> EN CULTIVO SUMERGIDO								
	A	B	C	D	E	F	G	H
1	Blanco							
2	Control negativo							
3	Control Positivo ( cepa 321)							
4	EA85			EA104				
5	EA130'			EA87'				
6	EA229'			EA129				
7	EA123			EA98				
8	EA250			EA85'				
9	EA87			EA104'				
10	EA129'			EA229				
11	EA250'			EA123'				
12	EA98'			EA130				
1	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0,096	0,122	0,389	0,138	0,425	0,349	0,196	0,34
3	0,009	0,016	0,036	0,045	0,007	0,096	0,022	-0,004
4	2,553	0,029	0,025	0,047	0,425	0,558	0,482	0,225
5	0,225	0,116	0,074	0,418	0,062	0,722	0,082	0,056
6	2,207	2,369	0,12	0,065	0,018	0,067	0,02	-0,046
7	0,025	0,016	2,314	0,056	2,129	0,616	0,314	0,216
8	0,174	2,798	0,08	0,211	0,02	0,051	0,029	0,027
9	-0,006	0,02	0,082	0,011	0,009	0,06	0,016	0,025
10	0,025	0,009	0,016	0,022	2,229	0,129	0,054	1
11	2,305	0,029	0,14	0,982	0,018	0,036	0,014	0,034
12	1,98	0,394	0,305	0,238	0,011	2,194	0,011	0,02
Pozos del microplato contaminados.								

Variance Check

Cochran's C test: 0,43405 P-Value = 0,00012

Bartlett's test: 6,26181 P-Value = 0,0

Hartley's test: 1744,57

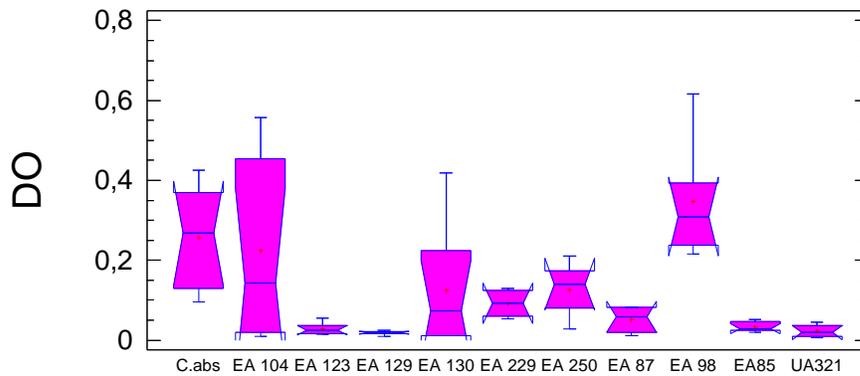
Levene's test: 5,81837 P-Value = 0,00000490

Kruskal-Wallis Test for DO by Tratamiento

Tratamiento	Sample Size	Average Rank
C.abs	8	56,0625
EA 104	8	41,75
EA 123	7	21,5
EA 129	6	14,25
EA 130	7	33,8571
EA 229	4	42,75
EA 250	5	45,2
EA 87	6	30,8333
EA 98	6	61,0
EA85	7	26,4286
UA321	6	16,0833

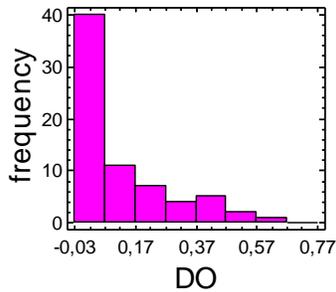
Test statistic = 37,0851 P-Value = 0,0000547068

### D.O (Box-and-Whisker Plot)

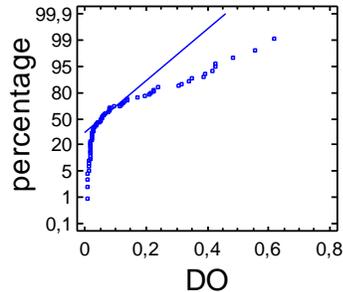


### Tratamiento

#### Histogram



#### Normal Probability Plot



95% confidence intervals  
 Mean: 0,12571 +/- 0,036093 [0,089621,0,16181]  
 Sigma: [0,12979,0,18163]

Diagnostics  
 Shapiro-Wilks P-value = 0,0000  
 Lag 1 autocorrelation = 0,5481 +/- 0,23426

### ANEXO III. Datos y análisis estadístico para la prueba de tubo germinativo de las ascosporas

Tabla con resultados obtenidos y análisis estadístico por medio de: test de varianza, test de Kruskal-Wallis, diagrama de caja y bigotes, normalidad e histograma de frecuencias para la prueba de antagonismo *in vitro* de inhibición del tubo germinativo.

PRUEBA DE ANTAGONISMO <i>IN VITRO</i> DE INHIBICIÓN DE TUBO GERMINATIVO													
LONGITUD (µm)	C .abs	C .abs	C .abs	UA 321	UA 321	EA 123	EA 123	EA 123	EA 129	EA 129	EA 85	EA 85	
	62	62,4	69,7	22,1	42,8	33,6	27,1	22,0	42,6	30,8	30,3	25,3	24,4
	78,2	61,3	63,4	40,9	38,9	48,3	36,6	31,4	33,6	17,6	20,6	27,4	23,9
	61,4	63,8	71,4	29,7	36,5	33,0	36,6	34,7	19,4	38,9	21,4	24,4	21,4
	64	68,1	70,7	32,8	31,9	31,5	21,2	30,0	31,2	33	25,2	25,7	26,7
	59,4	55,2	62,2	20,0	39,1	25,1	21,4	28,7	45,4	27,5	27,7	27,5	23,2
	72,9	72,9	52,4	23,7	32,3	22,8	34,3	33,2	37,8	34,9	17,2	29,2	20
	66,5	62,9	61,2	31,9	34,2	39,1	30,6	32,1	36,7	31,8	11,2	18,5	24,8
	76,7	66,1	65,8	30,8	27,4	29,8	33,7	39,4	35,2	25,7	21,8	11,8	17,2
	66,8	69,4	68,4	34,4	40,3	32,1	34,7	23,6	32,4	34,3	18,8	14,3	11,5
	61,9	72,7	55,7	22,5	27,1	25,5	29,0	28,4	41,6	29,9	22,2	15,4	20,6
	70,1	61,8	65,3	41,7	27,7	32,9	34,7	25,0	23,2	28,4	20,3	22,6	25,9
	77,8	76,2	59,7	38,7	23,5	35,9	22,3	27,5	45,3	25,3	20,3	33,4	18
58,5	65,4	71,2	29,5	49,1	33,1	21,8	31,9	34,8	31,9	14,3	18,3	22,1	
64,6	69,4	61,4	23,4	29,8	32,6	22,9	28,8	38,5	32,4	22,9	39,1	24,6	
78,9	73,6	64,3	34,2	21,4	30,3	19,0	33,5	39,1	31,2	21,4	25,5	22,4	
76,5	68	61,9	22,1	43,5	20,4	25,9	25,4	19,5	22,8	18,6	21,4	23,7	
66,1	55,5	60,1	25,8	22,8	38,9	39,5	23,9	27,5	40,4	21,8	22,6	21,6	
60,6	62,3	63,6	26,8	33,8	30,6	20,3	40,2	35,8	39,7	21,7	21,7	9,5	
64,6	69,7	61,4	25,4	23,4	38,4	21,4	33,9	42,4	17,4	18,6	39,2	14,5	
70,5	73,7	75,5	32,8	22,8	36,4	38,0	32,0	39,6	31,5	22,9	20	20,3	
54,2	73	65,6	21,8	24,5	42,8	38,4	24,5	31,5	30,5	24,9	19	21,2	
69,1	68,8	67	20,8	22,4	36,3	34,5	23,2	31,2	38,9	28,9	28,4	21,5	
69,6	58,8	64,4	22,7	25,4	37,7	26,3	35,6	23,6	31,7	33,7	30,8	25,7	
60,7	71,5	61,7	23,2	25,7	42,6	24,8	23,7	37,4	28,6	25,2	21,4	13,2	
75,2	67,6	65,8	20,1	21,3	21,4	25,8	31,9	40,1	40,6	14,4	18,5	17,3	
67,5	65,1	79,8	29,7	32,5	17,1	31,9	28,3	33,9	44,2	15,7	16,6	23,5	
56,8	74,2	62,2	31,1	21,2	25,8	36,8	31,4	29,5	40,9	26,2	23,4	26	
57,1	69,9	69,8	43,1	23,4	21,1	28,8	29,5	41,6	32,2	25,7	21,4	19,5	
71,5	69	68,2	32,6	25,5	44,3	28,1	25,4	28,7	53,4	20,4	23,9	19,5	
61,2	69,6	79,3	19,2	24,7	33,7	27,1	21,2	26,6	34,6	12,9	17,1	21,9	

Variance Check

Cochran's C test: 0,430789 P-Value = 0,61

Bartlett's test: 1,19557 P-Value = 0,8918

Hartley's test: 4,60538

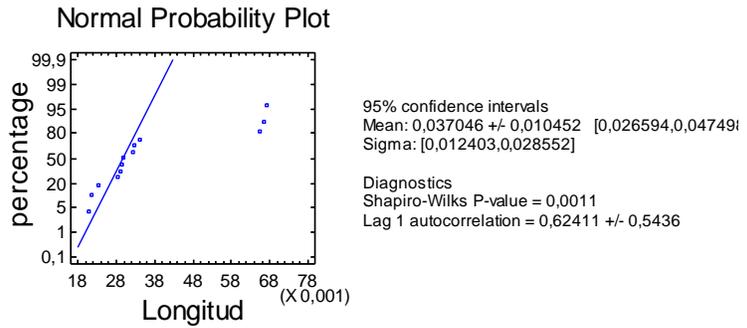
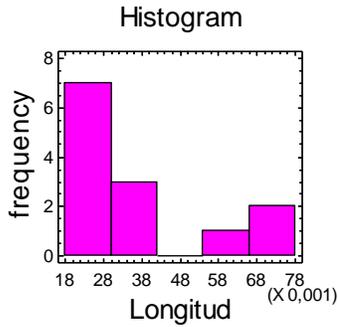
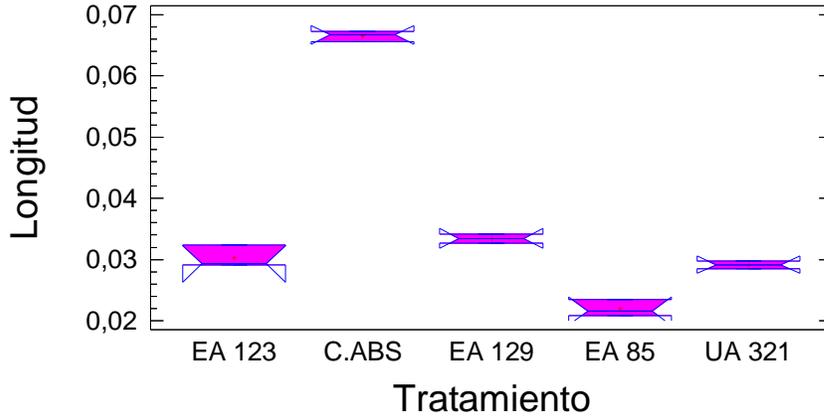
Levene's test: 0,117231 P-Value = 0,97259

Kruskal-Wallis Test for Longitud by Tratamiento

Tratamiento	Sample Size	Average Rank
EA 123	3	6,33333
C.ABS	3	12,0
EA 129	2	9,5
EA 85	3	2,0
UA 321	2	5,5

Test statistic = 11,0989 P-Value = 0,0254747

### Longitud (Box-and-Whisker Plot)



### ANEXO IV. Análisis estadístico para la variable área bajo la curva (ABC)

Test de varianza, test de rangos múltiples, tabla Anova, gráfica de medias, histograma y prueba de normalidad para el área bajo la curva (ABC) a nivel *in vivo*.

ANOVA Table for ABC by Tratamiento

Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between groups	5942,96	6	990,493	1,28
Within groups	31810,6	41	775,867	
Total (Corr.)	37753,5	47		

Multiple Range Tests for ABC by Tratamiento

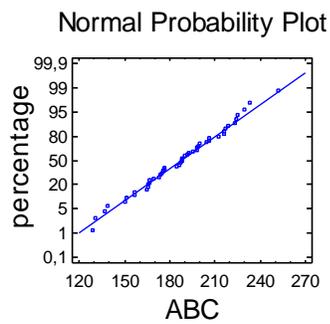
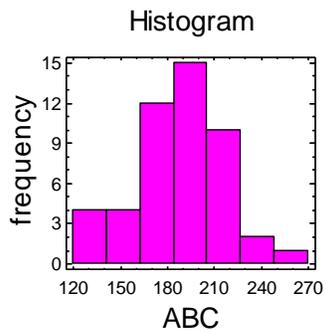
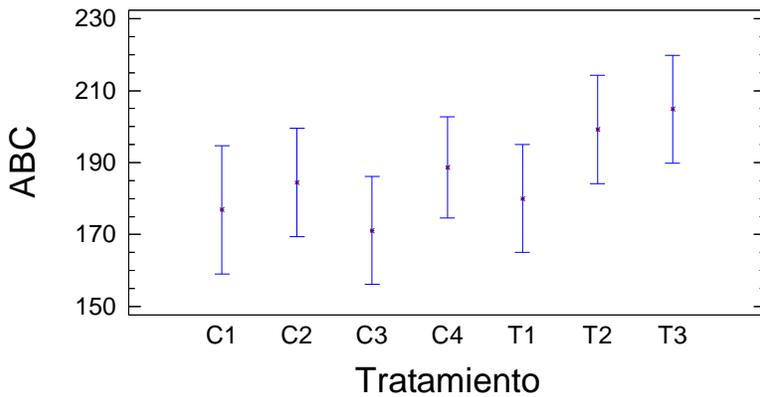
Method: 95,0 percent LSD

Tratamiento	Count	Mean	Homogeneous Groups
C3	7	171,161	X
C1	5	176,861	XX
T1	7	180,007	XX
C2	7	184,478	XX
C4	8	188,597	XX
T2	7	199,194	XX
T3	7	204,83	X

Variance Check

Cochran's C test: 0,231166 P-Value = 0,  
 Bartlett's test: 1,16069 P-Value = 0,45  
 Hartley's test: 5,01665  
 Levene's test: 1,03882 P-Value = 0,4145

Área bajo la curva (Means and 95% LSD intervals)



95% confidence intervals  
 Mean: 186,89 +/- 8,2297 [178,66,195,12]  
 Sigma: [23,594,35,501]

Diagnostics  
 Shapiro-Wilks P-value = 0,8295  
 Lag 1 autocorrelation = 0,28529 +/- 0,2829

## ANEXO V. Análisis estadístico para la variable tasa de desarrollo de la enfermedad (r)

Test de varianza, test de rangos múltiples, tabla Anova, gráfica de medias, histograma y prueba de normalidad para la tasa de desarrollo de la enfermedad (r) a nivel *in vivo*.

ANOVA Table for r by Tratamiento

Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between groups	0,00284628	6	0,000474379	1,98
Within groups	0,0098129	41	0,000239339	
Total (Corr.)	0,0126592	47		

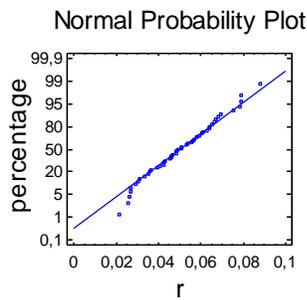
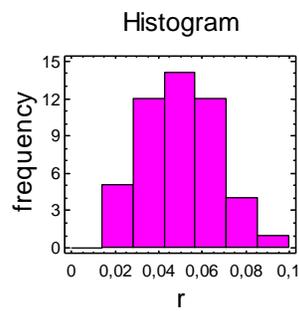
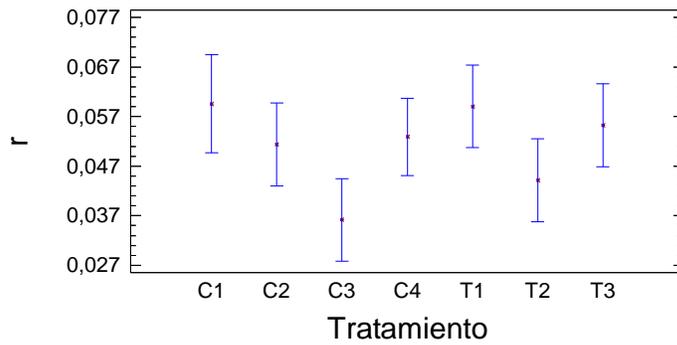
Multiple Range Tests for r by Tratamiento

Method: 95,0 percent LSD			
Tratamiento	Count	Mean	Homogeneous Groups
C3	7	0,0361571	X
T2	7	0,0441714	XX
C2	7	0,0514	XX
C4	8	0,0529125	X
T3	7	0,0552571	X
T1	7	0,0590429	X
C1	5	0,05958	X

Variance Check

Cochran's C test: 0,272274      P-Value =  
 Bartlett's test: 1,15143      P-Value = 0  
 Hartley's test: 4,80476  
 Levene's test: 0,597444      P-Value = 0,

Difusión de la enfermedad (Means and 95%LSD intervals)



95% confidence intervals  
 Mean: 0,050904 +/- 0,0047655 [0,046139,0,05567]  
 Sigma: [0,013662,0,020557]  
 Diagnostics  
 Shapiro-Wilks P-value = 0,4361  
 Lag 1 autocorrelation = 0,11864 +/- 0,2829

**ANEXO VI. Análisis estadístico para la variable hoja más joven manchada (HMJM)**

Test de varianza, test de Kruskal-Wallis, Diagrama de caja y bigotes, histograma y prueba de normalidad para la variable de la hoja más joven manchada (HMJM) a nivel *in vivo*.

Variance Check

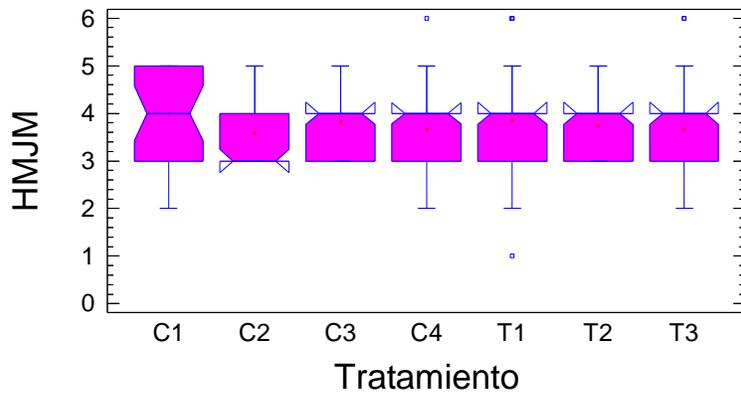
Cochran's C test: 0,26349 P-Value = 0,00  
 Bartlett's test: 1,07296 P-Value = 0,003  
 Hartley's test: 2,97997  
 Levene's test: 1,56821 P-Value = 0,15637

Kruskal-Wallis Test for HMJM by Tratamiento

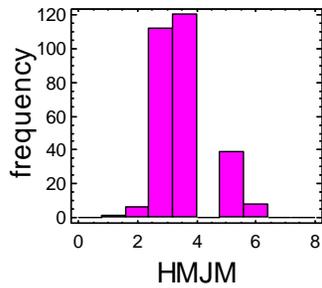
Tratamiento	Sample Size	Average Rank
C1	29	166,81
C2	41	126,22
C3	42	154,107
C4	47	134,606
T1	42	150,071
T2	42	143,107
T3	42	134,048

Test statistic = 7,14987 P-Value = 0,30721

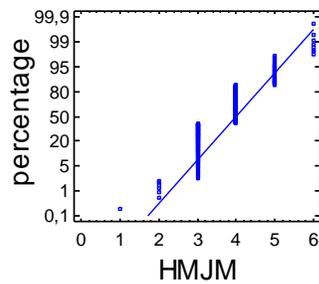
H.M.J.M (Box-and-Whisker Plot)



Histogram



Normal Probability Plot



95% confidence intervals  
 Mean: 3,7509 +/- 0,097185 [3,6537,3,8481]  
 Sigma: [0,77025,0,90822]

Diagnostics  
 Shapiro-Wilks P-value = 0,0000  
 Lag 1 autocorrelation = 0,23566 +/- 0,1161

## ANEXO VII. Análisis estadístico para la variable peso fresco total (WFT)

Tabla Anova, test de rangos múltiples, análisis de varianza, gráfica de medias, histograma de frecuencias y prueba de normalidad para la variable de peso fresco total (WFT) en el ensayo de promoción de crecimiento a nivel *in vivo*.

ANOVA Table for WFT by Tratamiento

Analysis of Variance

Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between groups	315563,0	6	52593,8	5,94
Within groups	300995,0	34	8852,81	
Total (Corr.)	616558,0	40		

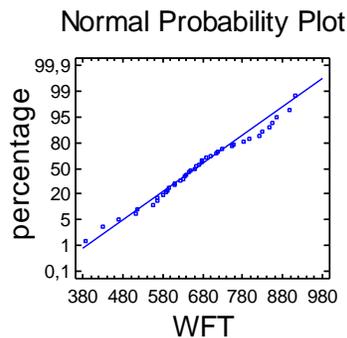
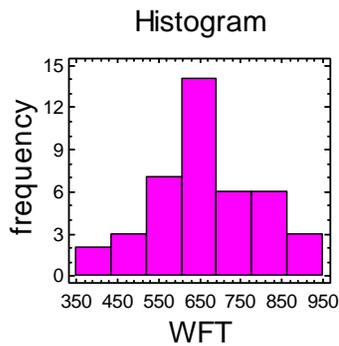
Multiple Range Tests for WFT by Tratamiento

Method: 95,0 percent LSD

Tratamiento	Count	Mean	Homogeneous Groups
C1	4	564,112	X
C2	6	607,045	XX
C4	7	614,103	XX
T3	6	647,19	XX
T1	6	666,022	XX
C3	6	698,097	X
T2	6	860,243	X

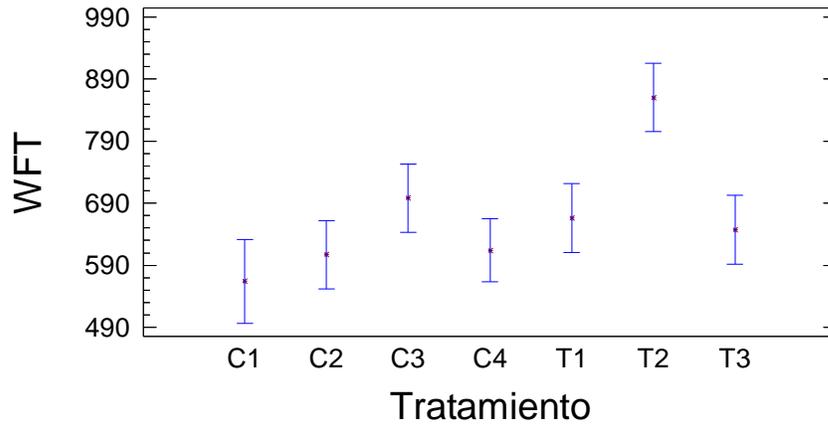
Variance Check

Cochran's C test: 0,32063 P-Value = 0,1  
 Bartlett's test: 1,43943 P-Value = 0,01  
 Hartley's test: 15,8461  
 Levene's test: 1,06427 P-Value = 0,4021



95% confidence intervals  
 Mean: 668,95 +/- 39,188 [629,76,708,13]  
 Sigma: [101,93,158,85]  
 Diagnostics  
 Shapiro-Wilks P-value = 0,7259  
 Lag 1 autocorrelation = 0,30966 +/- 0,3061

### W.F.T Means and 95% percent LSD Intervals



### ANEXO VIII. Análisis estadístico para la variable longitud aérea (LA)

Tabla Anova, test de rangos múltiples, análisis de varianza, gráfica de medias, histograma de frecuencias y prueba de normalidad para la variable de longitud aérea (LA) en el ensayo de promoción de crecimiento a nivel *in vivo*.

ANOVA Table for LA by tratamiento

Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between groups	184,201	6	30,7002	3,65
Within groups	345,076	41	8,41648	
Total (Corr.)	529,277	47		

Multiple Range Tests for LA by tratamiento

Method: 95,0 percent LSD			
tratamiento	Count	Mean	Homogeneous Groups
C1	5	36,14	X
C2	7	38,2429	XX
C4	8	38,325	XX
T1	7	39,5	XX
T3	7	40,2571	XX
C3	7	40,7714	XX
T2	7	43,1	X

Variance Check

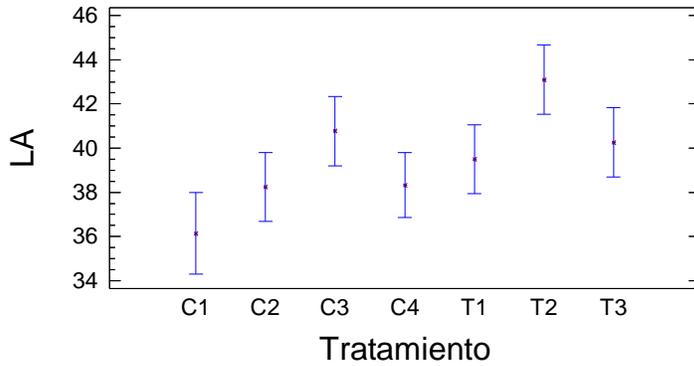
Cochran's C test: 0,18946 P-Value = 1,0

Bartlett's test: 1,05369 P-Value = 0,91

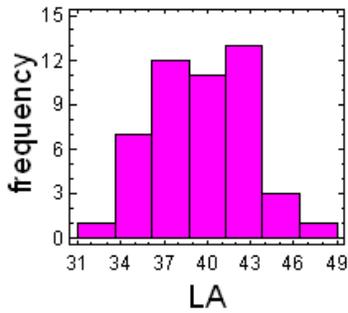
Hartley's test: 2,87771

Levene's test: 0,27087 P-Value = 0,9474

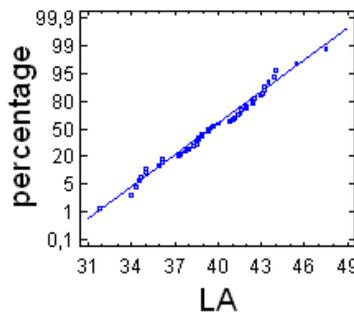
L.A (Means and 95% LSD intervals)



Histogram



Normal Probability Plot



95% confidence intervals  
Mean: 39,592 +/- 0,97442 [38,617,40,566]  
Sigma: [2,7936,4,2034]

Diagnostics  
Shapiro-Wilks P-value = 0,8620  
Lag 1 autocorrelation = 0,23251 +/- 0,2829

**ANEXO IX. Análisis estadístico para la variable diámetro aéreo (DA)**

Tabla Anova, test de rangos múltiples, análisis de varianza, gráfica de medias, histograma de frecuencias y prueba de normalidad para la variable de diámetro aéreo (DA) en el ensayo de promoción de crecimiento a nivel *in vivo*.

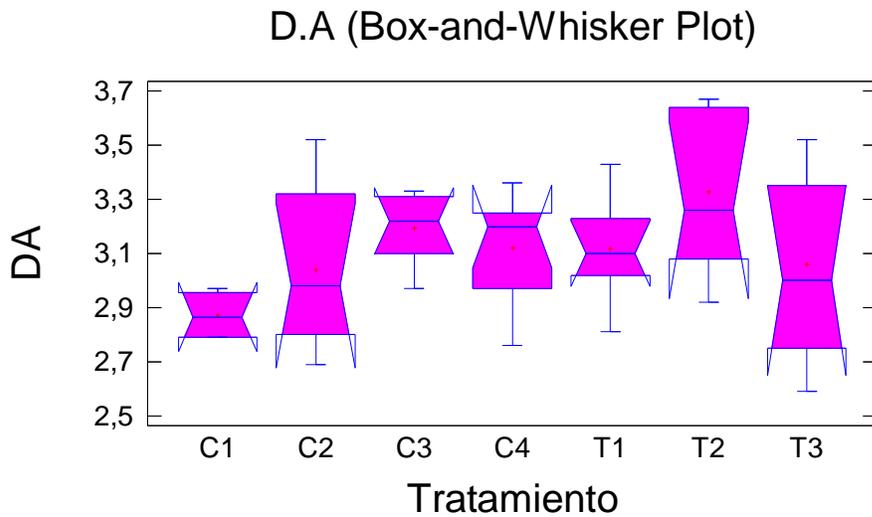
### Variance Check

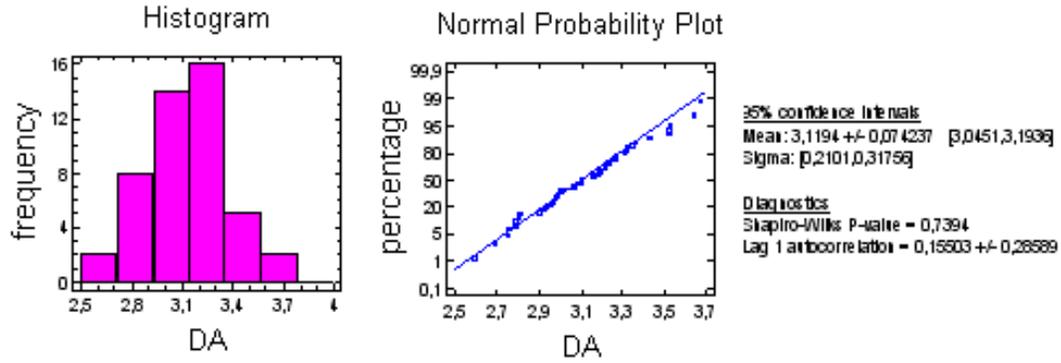
Cochran's C test: 0,28135      P-Value = 0,3  
Bartlett's test: 1,27145      P-Value = 0,17  
Hartley's test: 11,5535  
Levene's test: 1,27367      P-Value = 0,2911

### Kruskal-Wallis Test for DA by Tratamiento

Tratamiento	Sample Size	Average Rank
C1	4	8,875
C2	7	19,2857
C3	7	29,2143
C4	8	24,8125
T1	7	24,4286
T2	7	33,1429
T3	7	21,6429

Test statistic = 10,0673      P-Value = 0,121846





**ANEXO X. Análisis estadístico para la variable peso fresco aéreo (WFA)**

Tabla Anova, test de rangos múltiples, análisis de varianza, gráfica de medias, histograma de frecuencias y prueba de normalidad para la variable de peso fresco aéreo (WFA) en el ensayo de promoción de crecimiento a nivel *in vivo*.

ANOVA Table for WFA by Tratamiento

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	F
Between groups	63602,4	6	10600,4	3,99	
Within groups	108872,0	41	2655,41		
Total (Corr.)	172474,0	47			

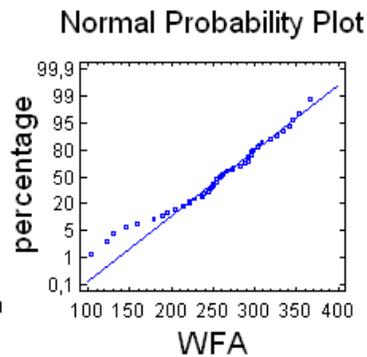
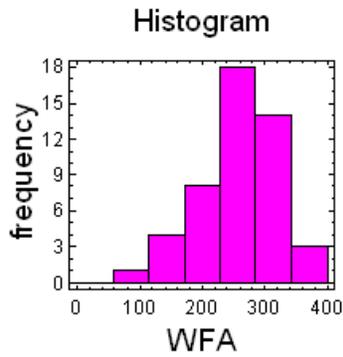
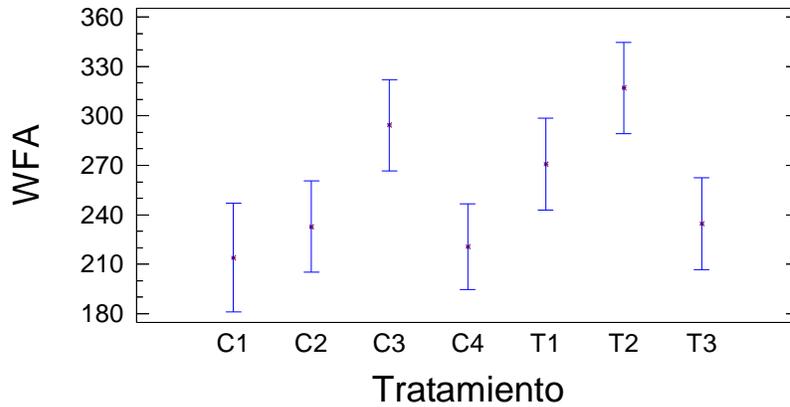
Multiple Range Tests for WFA by Tratamiento

Method: 95,0 percent LSD			
Tratamiento	Count	Mean	Homogeneous Groups
C1	5	213,98	X
C4	8	220,694	X
C2	7	232,857	X
T3	7	234,464	X
T1	7	270,817	XX
C3	7	294,307	X
T2	7	316,943	X

### Variance Check

Cochran's C test: 0,283769 P-Value = 0,1  
Bartlett's test: 1,30148 P-Value = 0,1  
Hartley's test: 11,6259  
Levene's test: 1,12529 P-Value = 0,364

### W.F.A (Means and 95% LSD intervals)



95% confidence intervals  
Mean: 255,86 +/- 17,59 [238,27,273,45]  
Sigma: [50,429,75,878]  
  
Diagnostics  
Shapiro-Wilks P-value = 0,1787  
Lag 1 autocorrelation = 0,15757 +/- 0,2829

### ANEXO XI. Análisis estadístico para la variable longitud radical (LR)

Análisis de varianza, test de Kruskal-Wallis, diagrama de caja y bigotes, histograma de frecuencias y prueba de normalidad para la variable de longitud radical (LR) en el ensayo de promoción de crecimiento a nivel *in vivo*.

## Variance Check

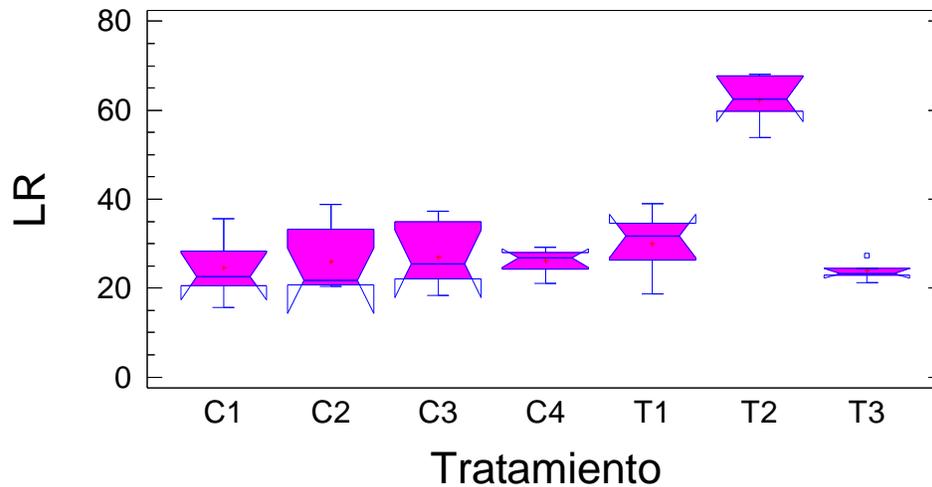
Cochran's C test: 0,238865      P-Value = 0,  
Bartlett's test: 1,33263      P-Value = 0,12  
Hartley's test: 11,6319  
Levene's test: 0,843577      P-Value = 0,544

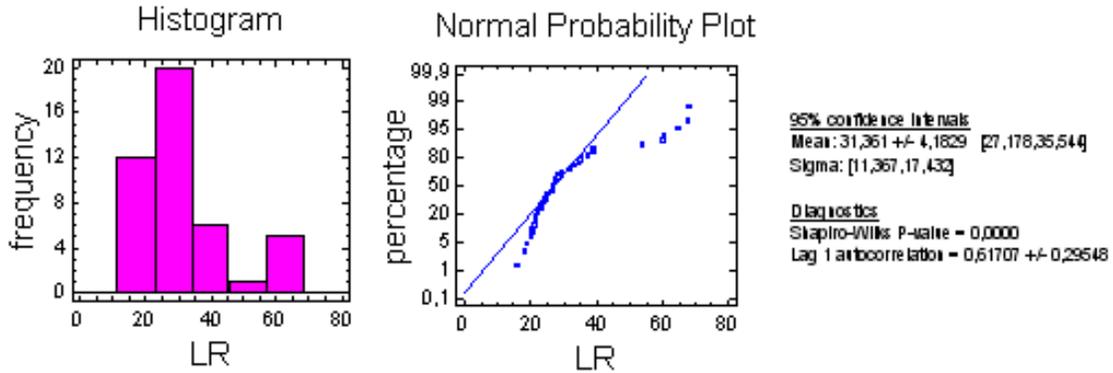
## Kruskal-Wallis Test for LR by Tratamiento

Tratamiento	Sample Size	Average Rank
C1	5	16,2
C2	7	16,5714
C3	7	19,7857
C4	7	21,3571
T1	7	25,5714
T2	6	41,5
T3	5	15,4

Test statistic = 18,1194      P-Value = 0,00594055

## L.R (Box-and-Whisker Plot)





**ANEXO XII. Análisis estadístico para la variable peso fresco radical (WFR)**

Tabla Anova, test de rangos múltiples, análisis de varianza, gráfica de medias, histograma de frecuencias y prueba de normalidad para la variable de peso fresco radical (WFR) en el ensayo de promoción de crecimiento a nivel *in vivo*.

ANOVA Table for WFR by Tratamiento

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	F
Between groups	32683,0	6	5447,17	4,15	
Within groups	44619,4	34	1312,33		
Total (Corr.)	77302,4	40			

Multiple Range Tests for WFR by Tratamiento

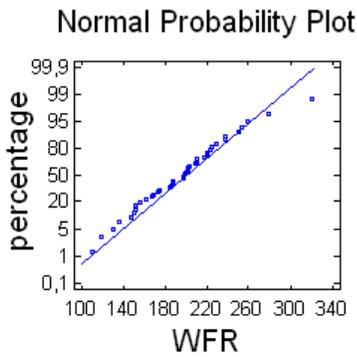
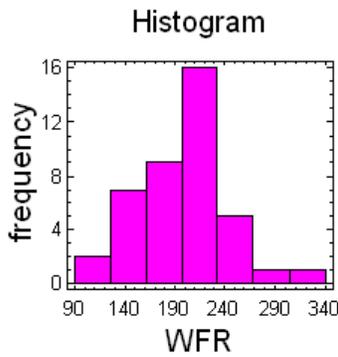
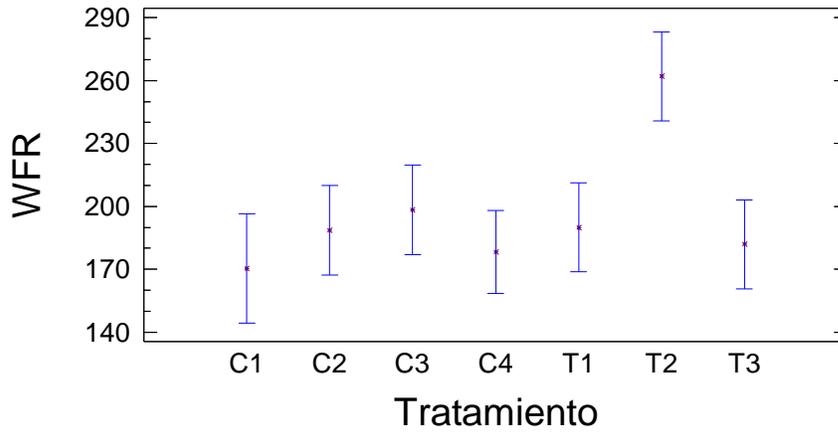
Method: 95,0 percent LSD

Tratamiento	Count	Mean	Homogeneous Groups
C1	4	170,525	X
C4	7	178,314	X
T3	6	181,925	X
C2	6	188,667	X
T1	6	190,033	X
C3	6	198,367	X
T2	6	262,017	X

Variance Check

Cochran's C test: 0,285442 P-Value = 0,9120  
 Bartlett's test: 1,17257 P-Value = 0,9120  
 Hartley's test: 5,77566  
 Levene's test: 0,823476 P-Value = 0,5120

W.F.R (Means and 95% LSD intervals)



95% confidence intervals  
 Mean: 196,5 +/- 13,876 [182,62,210,37]  
 Sigma: [36,092,56,248]

Diagnostics  
 Shapiro-Wilks P-value = 0,9120  
 Lag 1 autocorrelation = 0,39507 +/- 0,3061

**ANEXO XIII. Análisis estadístico para la variable diámetro de corno (DC)**

Tabla Anova, test de rangos múltiples, análisis de varianza, gráfica de medias, histograma de frecuencias y prueba de normalidad para la variable de diámetro de corno (DC) en el ensayo de promoción de crecimiento a nivel *in vivo*.

ANOVA Table for DC by Tratamiento

Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between groups	5,51117	6	0,918529	3,92
Within groups	9,60655	41	0,234306	
Total (Corr.)	15,1177	47		

Multiple Range Tests for DC by Tratamiento

Method: 95,0 percent LSD

Tratamiento	Count	Mean	Homogeneous Groups
C1	5	5,674	X
C2	7	5,99571	XX
T1	7	6,07143	XX
T3	7	6,12714	XX
C4	8	6,28875	X
C3	7	6,35429	X
T2	7	6,90571	X

Variance Check

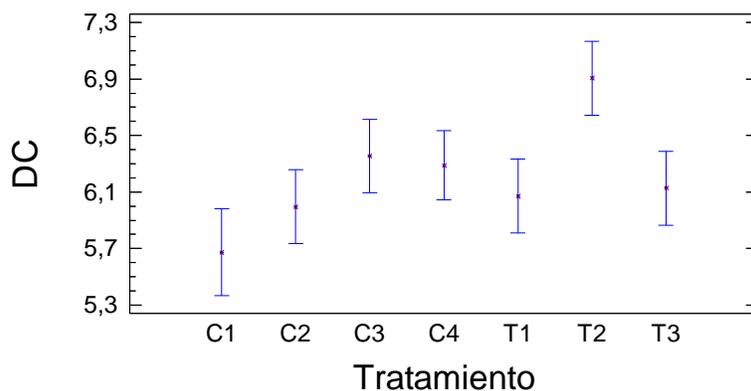
Cochran's C test: 0,325051 P-Value = 0,151

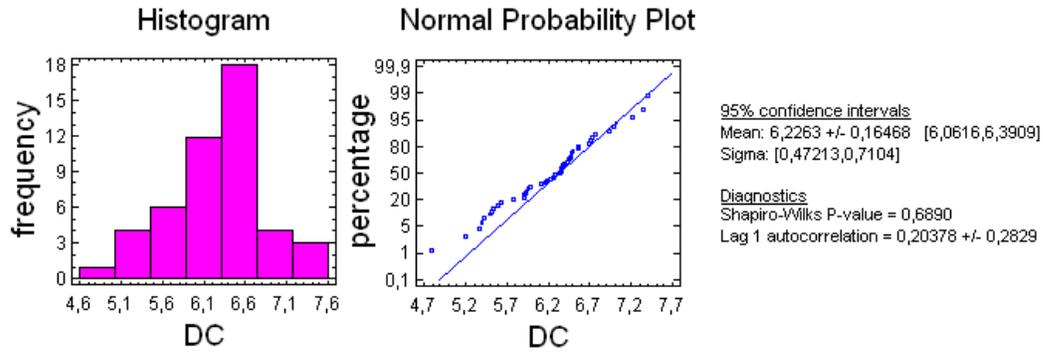
Bartlett's test: 1,47644 P-Value = 0,02041

Hartley's test: 19,6775

Levene's test: 1,84508 P-Value = 0,114075

D.C (Means and 95% LSD intervals)





**ANEXO XIV. Análisis estadístico para la variable peso fresco de cormo (WFC)**

Tabla Anova, test de rangos múltiples, análisis de varianza, gráfica de medias, histograma de frecuencias y prueba de normalidad para la variable de peso fresco de cormo (WFC) en el ensayo de promoción de crecimiento a nivel *in vivo*.

ANOVA Table for WFC by Tratamiento

Analysis of Variance					
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio	P
Between groups	22806,9	6	3801,14	6,71	
Within groups	23209,1	41	566,076		
Total (Corr.)	46016,0	47			

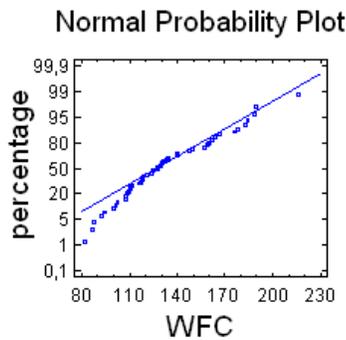
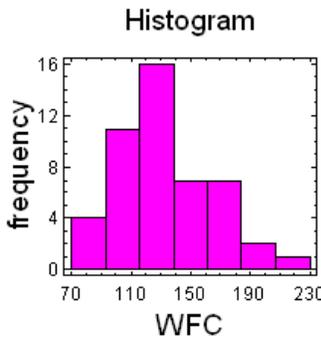
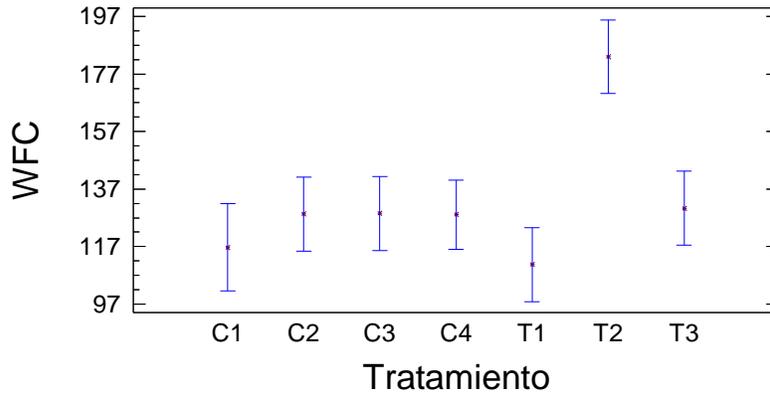
Multiple Range Tests for WFC by Tratamiento

Method: 95,0 percent LSD			
Tratamiento	Count	Mean	Homogeneous Groups
T1	7	110,751	X
C1	5	116,71	X
C4	8	128,096	X
C2	7	128,324	X
C3	7	128,533	X
T3	7	130,306	X
T2	7	182,973	X

Variance Check

Cochran's C test: 0,23966 P-Value = 0  
Bartlett's test: 1,37145 P-Value = 0,  
Hartley's test: 18,1374  
Levene's test: 1,0298 P-Value = 0,420

W.F.C (Means and 95% LSD intervals)



**ANEXO XV. Análisis estadístico para la variable peso fresco de las hojas (WFH)**

Tabla Anova, test de rangos múltiples, análisis de varianza, gráfica de medias, histograma de frecuencias y prueba de normalidad para la variable de peso fresco de hojas (WFH) en el ensayo de promoción de crecimiento a nivel *in vivo*.

ANOVA Table for WFH by Tratamiento

Analysis of Variance				
Source	Sum of Squares	Df	Mean Square	F-Ratio
Between groups	3899,98	6	649,997	2,86
Within groups	9326,93	41	227,486	
Total (Corr.)	13226,9	47		

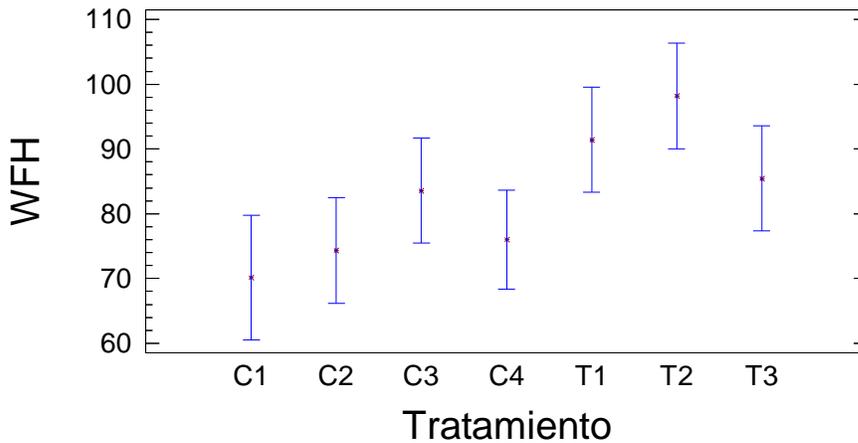
Multiple Range Tests for WFH by Tratamiento

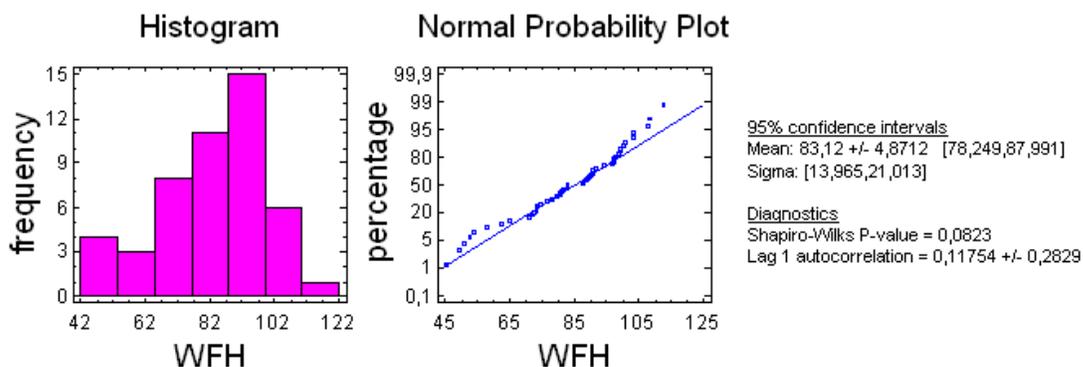
Method: 95,0 percent LSD				
Tratamiento	Count	Mean	Homogeneous Groups	
C1	5	70,15	X	
C2	7	74,3429	X	
C4	8	76,0	XX	
C3	7	83,5714	XXX	
T3	7	85,4571	XXX	
T1	7	91,4357	XX	
T2	7	98,1929	X	

Variance Check

Cochran's C test: 0,317355 P-Value = 0,  
 Bartlett's test: 1,31792 P-Value = 0,10  
 Hartley's test: 8,1509  
 Levene's test: 1,93768 P-Value = 0,0975

W.F.H (Means and 95% LSD intervals)





### ANEXO XVI. Análisis estadístico para la recuperación de bacterias totales

Test de Kruskal-Wallis, diagrama de caja y bigotes, histograma de frecuencia y prueba de normalidad para la variable UFC/mL en el ensayo de recuperación de bacterias totales a nivel *in vivo*.

Variance Check

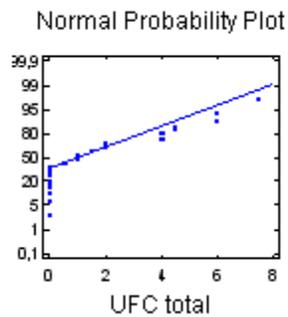
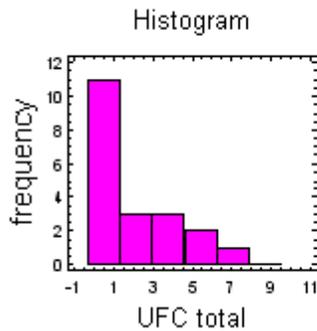
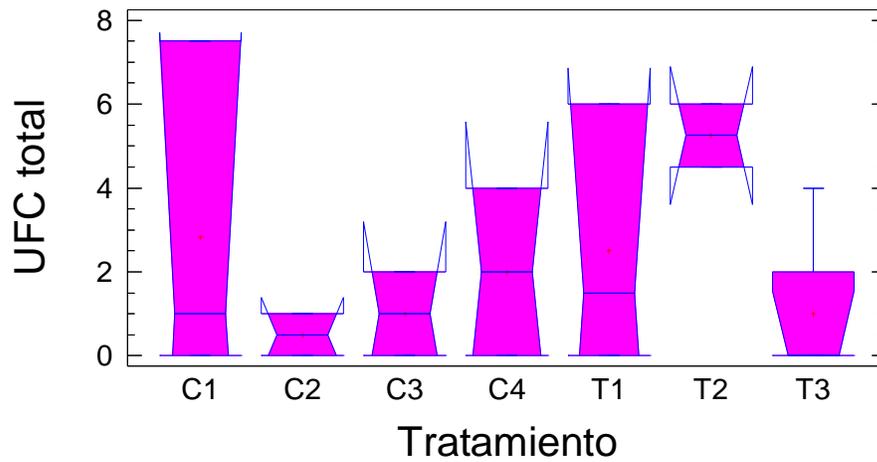
Cochran's C test: 0,439779 P-Value = 0,24  
Bartlett's test: 1,83109 P-Value = 0,3841  
Hartley's test: 66,3333  
Levene's test: 0,423551 P-Value = 0,85049

Kruskal-Wallis Test for UFC total by Tratamiento

Tratamiento	Sample Size	Average Rank
C1	3	11,6667
C2	3	8,0
C3	2	9,0
C4	3	11,1667
T1	3	11,6667
T2	2	17,75
T3	4	7,25

Test statistic = 5,51107 P-Value = 0,48012

## UFC Total (Box-and-Whisker Plot)



95% confidence intervals  
 Mean: 2 +/- 1,1414 [0,85864,3,1414]  
 Sigma: [1,8546,3,5619]

Diagnostics  
 Shapiro-Wilks P-value = 0,0007  
 Lag 1 autocorrelation = -0,30973 +/- 0,43826

## ANEXO XVII. Análisis estadístico para la recuperación de BAFES

Test de Kruskal-Wallis, diagrama de caja y bigotes, histograma de frecuencia y prueba de normalidad para la variable UFC/mL en el ensayo de recuperación de BAFES.

### Variance Check

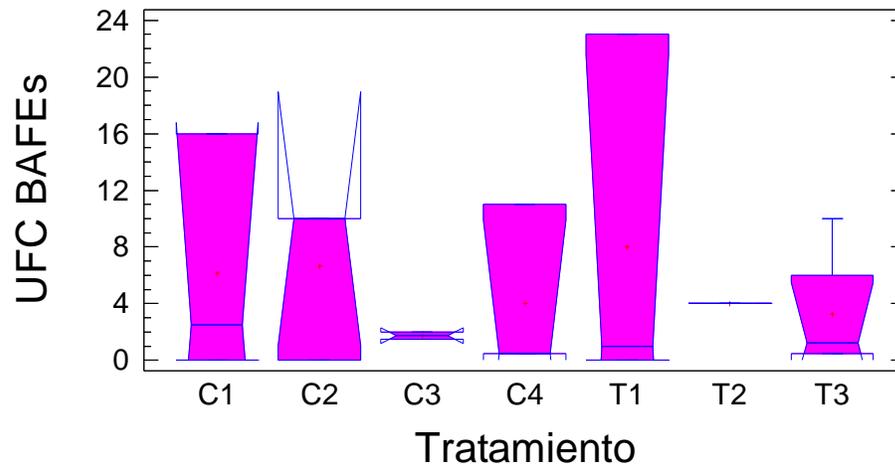
Cochran's C test: 0,505925 P-Value = 0,1  
 Bartlett's test: 2,02877 P-Value = 0,222  
 Hartley's test: 1352,0  
 Levene's test: 0,397493 P-Value = 0,86771

Kruskal-Wallis Test for UFC BAFEs by Tratamiento

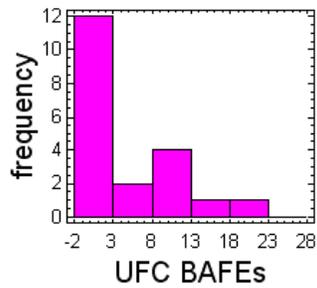
Tratamiento	Sample Size	Average Rank
C1	3	11,0
C2	3	11,3333
C3	2	9,75
C4	3	9,66667
T1	3	10,0
T2	2	13,5
T3	4	9,375

Test statistic = 0,865999 P-Value = 0,990186

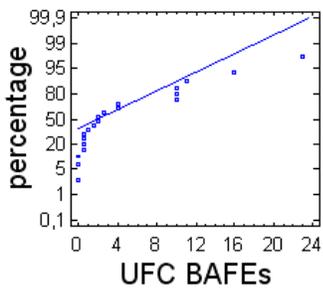
### UFC BAFEs (Box-and-Whisker Plot)



### Histogram



### Normal Probability Plot



95% confidence intervals  
 Mean: 4,95 +/- 2,9725 [-1,9775,7,9225]  
 Sigma: [4,8301,9,2766]

Diagnostics  
 Shapiro-Wilks P-value = 0,0002  
 Lag 1 autocorrelation = -0,30984 +/- 0,43826

### ANEXO XVIII. Formatos utilizados en las pruebas *in vivo*

Formatos utilizados para realizar las mediciones de los ensayos *in vivo* de promoción de crecimiento y de severidad.

**FORMATO A1. Medicion de pesos secos y frescos para las variables: raíz (R), pseudotallo (A), cormo (C) y hojas (H)**

PLANTA	WR		WA		WC		WH	
	Fresco	Seco	Fresco	Seco	Fresco	Seco	Fresco	Seco
T1	1							
	2							
	3							
	4							
	5							
	6							
	7							
	8							
T2	1							
	2							
	3							
	4							
	5							
	6							
	7							
	8							
T3	1							
	2							
	3							
	4							
	5							
	6							
	7							
	8							
C1	1							
	2							
	3							
	4							
	5							
	6							
	7							
	8							
C2	1							
	2							
	3							
	4							
	5							
	6							
	7							
	8							
C3	1							
	2							
	3							
	4							
	5							
	6							
	7							
	8							
C4	1							
	2							
	3							
	4							
	5							
	6							
	7							
	8							

**FORMATO A2. Medicion de longitudes y diámetros para las variables:  
pseudotallo (A), raíz (R) y cormo (C)**

	PLANTA	LA	DA	LR			DC
				Raíz 1	Raíz 2	Raíz 3	
T1	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
	7						
	8						
T2	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
	7						
	8						
T3	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
	7						
	8						
C1	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
	7						
	8						
C2	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
	7						
	8						
C3	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
	7						
	8						
C4	1						
	2						
	3						
	4						
	5						
	6						
	7						
	8						

**FORMATO A3. Medición de la severidad de la enfermedad de la Sigatoka  
negra en plantas de banano**

<b>Escala de medición:</b>	Stover modificada por Gauhl							
<b>PLANTA #:</b>								
<b>TRATAMIENTO:</b>								
<b>Hoja N°</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>
<b>semana 1</b>								
<b>semana 2</b>								
<b>semana 3</b>								
<b>semana 4</b>								
<b>semana 5</b>								
<b>semana 6</b>								
<b>HMJM</b>								