



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Dinámica poblacional de bacterias de la filósfera de banano  
(*Musa sp.*) por acción de sustratos foliares relacionado al control  
de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*).**

**Maria Isabel Aristizabal Guerra**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias Agropecuarias  
Medellín, Colombia

2011

**Dinámica poblacional de bacterias de la filósfera de banano  
(*Musa sp.*) por acción de sustratos foliares relacionado al control  
de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*).**

**Maria Isabel Aristizabal Guerra**

Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar por el título de:  
Magister en Ciencias Agrarias

Investigadores Principales:

Ingeniero Agrónomo, Msc. Fitopatología, Luis Fernando Patiño

Bacterióloga, Msc. Biotecnología, Luz Estella Vásquez

Director:

Ingeniero Agrónomo, Ph.D. Fitopatología, Pablo Buriticá Céspedes

Línea de Investigación:

Sanidad Vegetal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias Agropecuarias

Medellín, Colombia

2011

**Population dynamics of phyllosphere bacteria in banana (*Musa* sp.) under the action of substrates, related to control of Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*).**

**Maria Isabel Aristizabal Guerra**

A thesis presented for the degree of:

Master of Agricultural Sciences

Principal Investigators:

Agronomist, MSc. Phytopathology, Luis Fernando Patiño

Bacteriologist, Msc. Biotechnology, Luz Estella Vasquez

Director:

Agronomist, Ph.D. Phytopathology, Pablo Buriticá Céspedes

Research line:

Plant health

Universidad Nacional of Colombia

Faculty of Agricultural Sciences

Medellín, Colombia

2011

## Agradecimientos

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, IICA, Augura y al Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid por la financiación de este proyecto. A la Universidad Nacional de Colombia por su apoyo en mi formación académica. A Luis Fernando Patiño por tenerme en cuenta para hacer parte de esta investigación, por sus excelentes propuestas y por su gestión administrativa. A Luz Estella Vásquez por su incondicional asesoría, sus aportes y su disponibilidad. Al jefe del Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Politécnico Jaime Isaza Cadavid, Cesar Hernández por sus valiosos consejos, por su apoyo incondicional y por facilitarme el uso de su laboratorio para la realización de los diversos procedimientos que hicieron posible la culminación de este proyecto. A todos los estudiantes que fueron mi compañía en la realización de las pruebas de laboratorio y campo: Paula Aguilar, Marcela Villegas, Julián Correa, Liliana Ramírez, Daniel Alzate, Carolina Corrales, Cristian Higueta, Jackson Osorio, Adalberto Herrera, Juliette Osorio, Laura Villegas, Fanny, Julián Arango, Alejandra Fajardo. A Luz Dary Mejía y a la memoria de Hernando Ortiz por alegrarme los comienzos del día con su gran saludo y excelente compañía. Al todo el personal de la sede de laboratorios y de la sede regional de Urabá del Politécnico Jaime Isaza Cadavid, así como al personal de Cenibanano por la disponibilidad en el uso de sus instalaciones para la realización de los diferentes objetivos del proyecto. A las fincas de banano de exportación de la zona de Urabá (Cortijo, Montecristo, Santillana, Zumbadora, y Cibeles) y el Magdalena (*Burdeos* y *Juliana 1*) que facilitaron la consecución de muestras para los diferentes procedimientos. A Darío Castañeda y Carlos Lopera por la asesoría estadística. A Ivonne y a todas las personas que colaboraron de una u otra forma con el desarrollo y culminación de este proyecto. A mi amiga Sandra y finalmente a Dios y a mi excelente familia (Libardo, Carmen, Mariana, Pelu y Aleja) por creer en mí y apoyarme en la continuación de los estudios superiores y hacer de esto una gran experiencia de vida.

## Resumen

El efecto de los sustratos foliares sobre la dinámica poblacional de bacterias líticas nativas de la filósfera de banano fue evaluado a nivel *in vitro*, bajo cubierta (casa de malla) y en parcelas experimentales, este último, simulando las condiciones de una producción comercial de banano de exportación. *In vitro* se evaluaron dieciocho sustratos compuestos de harina cebada (HC) y quitina (Q), de estos se seleccionaron los cinco mejores utilizando como criterio su capacidad de fomentar en mayor proporción el crecimiento de bacterias líticas. Los sustratos seleccionados fueron aplicados en plántulas de banano bajo cubierta, se seleccionaron los dos mejores que pasaron a ser aplicados solos y en combinación con mezcla fungicida en plantas de banano establecidas en parcelas experimentales. Además de la dinámica de crecimiento de las bacterias líticas también se evaluó el efecto de los sustratos sobre el desarrollo del agente causal de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*). En cuanto a la dinámica poblacional de las bacterias en parcelas experimentales se obtuvo que el sustrato, compuesto de Buffer fosfato + HC + Q + Urea + Neofat + mezcla fungicida, incrementó las poblaciones de bacterias líticas en comparación con el testigo (sin control químico). En cuanto al nivel de control de enfermedad el tratamiento que redujo en forma significativa la enfermedad fue el sustrato foliar compuesto de solución mineral base + HC + Urea + Neofat + aceite, mostrando una respuesta de reducción de la enfermedad del 22,6%. La dinámica de las bacterias líticas sobre medios de cultivo con harina de cebada y quitina coloidal también se evaluó bajo el efecto de inductores de resistencia, a diferentes concentraciones de Ácido Salicílico (AS) y Acibenzolar-S Metil (ASM). Al evaluar las bacterias en medios con AS, no hubo crecimiento de éstas, mientras que en presencia de ASM, se obtuvo un crecimiento inferior al tratamiento testigo. Por su parte en la fase bajo cubierta (interacción de la hoja tratada con los inductores de resistencia), se encontró un incremento de estas bacterias en hojas tratadas con AS, mientras que el ASM redujo la población de las bacterias de interés. Con el fin de establecer qué tipo de microorganismos habitan la filósfera de las plantas de banano, se realizó una captura a partir de hojas de banano de cultivos comerciales de exportación y una identificación de los aislamientos con mayor potencial lítico, mediante análisis moleculares amplificando la región 16S rRNA. Los diferentes aislamientos se caracterizaron desde el punto de vista morfológico y de características tintoriales. Se identificaron a nivel de género 80 de los aislamientos y el 94% de estos a nivel de especie. Se cuenta con una colección de 102 bacterias con actividad lítica. Los aislamientos están crioconservados en glicerol. Se

evaluó la compatibilidad y antagonismo de 40 aislamientos de la colección. La compatibilidad se evaluó con diferentes fungicidas usados en el control convencional de Sigatoka negra a nivel *in vitro* encontrando solo crecimiento bajo la acción de dosis experimentales de fungicidas, con valores por debajo del tratamiento testigo. El antagonismo se evaluó bajo la acción de *M. fijiensis* en medios de cultivo líquidos y sólidos, obteniéndose que el 32,5% de los aislamientos evaluados presentaron 100% de inhibición de la germinación del hongo.

**Palabras claves:** *Mycosphaerella fijiensis*, control biológico, quitina, harina de cebada, Ácido salicílico, Acibenzolar-S Metil, fungicidas.

## Abstract

The effect of the foliar substrates on the population dynamics of native lytic bacteria from banana phyllosphere was evaluated at *in vitro* level, in greenhouse and experimental lots, the latter, simulating the conditions of banana commercial production for exportation. *In vitro* eighteen substrates were evaluated, of barley flour (HC) and chitin (Q) composed, from this there were selected the best five by using to as criterion their capacity to foment greater proportion on the growth of lytic bacteria. The selected substrates were applied in banana seedling under greenhouse: the best two were selected and passed to be applied by themselves and combined with a fungicide mixture in banana plants which were established in experimental lots. In addition to the dynamic growth of lytic bacteria, the effect of the substrates on the development of the casual agent of the black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*) was also evaluated. As for the dynamical population of the bacteria in experimental lots there was found that the foliar substratum, composed of phosphate buffer + HC + Q + Urea + Neofat fungicide mixture, it increased the population of lytic bacteria compared to the witnessed (without chemical control). As the level of disease control, the treatment that significantly reduced the disease was the foliar substratum (Mineral solution base + HC + Urea + Neofat) mixed with oil, responded showing a reduction of 22,6% of the disease. The dynamic of the lytic bacteria on growing medium with barley flour and colloidal chitin were also evaluated under the effect of resistance inductors at different concentrations of salicylic acid (SA) and Acibenzolar-S Methyl (ASM). When evaluating the bacteria in media with AS, there was no growth of it, while in the presence of ASM, there was obtained a lower growth to the treatment witnessed. On the other hand, during the stage of under greenhouse (interaction of the leaf treated with the resistance inductors), there was found a increasement of these bacteria on leaves treated with AS, whereas ASM reduced on a way the population of the bacteria of interest. In order to establish what kind of microorganisms inhabit the phyllosphere of the banana plants, it was taken a sample from banana leaves of the commercial crops for exportation and an identification of isolates with greater lytic potential, through molecular analysis amplifying the region 16S rRNA. The different isolates were characterized from the morphological point of view and staining characteristics. At genus level, 80% of the isolates were identified well as 94% at specie level at specie level, with a collection of 102 bacteria with lytic activity. The isolates are cryopreserved in glycerol. It was evaluated the compatibility and antagonism of isolates of the collection. The compatibility was evaluated with different fungicides used in conventional control of black Sigatoka at *in vitro* level finding only growth under the action of experimental fungicide doses, with values below the witness treatment. Antagonism was evaluated under the action of *M. fijiensis* in media of liquid and solid growing, it was observed that 32,5% from the evaluated isolates showed 100% of inhibition of the fungus germination.

**Key words:** *Mycosphaerella fijiensis*, biological control, chitin, barley flour, Salicylic Acid, Acibenzolar-S Methyl, fungicides.

## Contenido

	<b>Pág.</b>
<b>Resumen</b> .....	V
<b>Abstract</b> .....	VII
<b>Lista de figuras</b> .....	XII
<b>Lista de tablas</b> .....	XIII
<b>Lista de gráficos</b> .....	XIV
<b>Lista de anexos</b> .....	XVI
<b>Introducción</b> .....	17
<b>1. Objetivos</b> .....	19
1.1 Objetivo general.....	19
1.2 Objetivos específicos.....	19
<b>2. Marco teórico</b> .....	20
2.1 Control biológico de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos.....	20
2.2 La inducción de resistencia como alternativa de control de enfermedades en cultivos.....	25
<b>3. Materiales y métodos</b> .....	27
3.1 Localización.....	27
3.2 Metodología.....	27
3.2.1 Establecimiento de una colección de cepas bacterianas glucanolíticas y quitinolíticas nativas de hojas de banano.....	27
3.2.2. Evaluación de diferentes sustratos a nivel <i>in vitro</i> que fomenten poblaciones de bacterias quitinolíticas glucanolíticas.....	30
3.2.3 Evaluación bajo cubierta las poblaciones de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas con los cinco mejores sustratos provenientes de la evaluación <i>in vitro</i> .....	32

	<b>Pág.</b>
3.2.4 Medición de la compatibilidad de las bacterias nativas de la filósfera de banano con aceite mineral y mezcla convencional de fungicidas a dosis comerciales, y el efecto de las bacterias sobre el desarrollo del hongo causal de la Sigatoka negra.....	34
3.2.5 Relación de la dinámica poblacional de las bacterias líticas con la severidad de la enfermedad en plantas de banano establecidas en campo usando los mejores sustratos.....	36
3.2.6 Determinación del efecto de inductores de resistencia sobre la dinámica de bacterias líticas.....	40
<b>4. Resultados y discusión.....</b>	<b>42</b>
4.1 Colección de cepas bacterianas líticas.....	42
4.2 Dinámica poblacional de bacterias líticas por acción de sustratos a nivel <i>in vitro</i> .....	45
4.3 Dinámica poblacional de bacterias nativas líticas por acción de sustratos aplicados bajo cubierta.....	47
4.4 Antagonismo y compatibilidad de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> con bacterias líticas.....	49
4.4.1 Antagonismo.....	49
4.4.2 Compatibilidad.....	51
4.5 Relación de la dinámica poblacional de bacterias líticas con la severidad de la enfermedad en parcelas experimentales.....	54
4.5.1 Efecto de los sustratos foliares sobre el desarrollo de la Sigatoka negra.....	55
4.5.2 Relación de la Sigatoka negra con la dinámica poblacional de bacterias líticas.....	56
4.6 Dinámica poblacional de bacterias líticas por efecto de inductores de resistencia.....	59
4.6.1 <i>In vitro</i> .....	59
4.6.2 Bajo cubierta.....	62
<b>5. Conclusiones y recomendaciones.....</b>	<b>64</b>
5.1 Conclusiones.....	64
5.2 Recomendaciones.....	65

---

	<b>Pág.</b>
<b>6. Bibliografía.....</b>	<b>66</b>
<b>7. Anexos.....</b>	<b>75</b>

## Lista de figuras

	<b>Pág.</b>
Figura 1: Estadios de <i>M. fijiensis</i> sobre la hoja de banano.....	27
Figura 2: Formación de halo de consumo sobre medio con quitina coloidal como fuente de carbono. Cepa 38QG.....	28
Figura 3: Evaluación bajo cubierta.....	33
Figura 4: Inoculación natural.....	33
Figura 5: Toma de muestra usando el hisopo.....	33
Figura 6: Parcelas lineales establecidas para la evaluación de los sustratos.....	37
Figura 7: Escala de Stover modificada por Gauhl (1989).....	38
Figura 8: Muestreo de hoja mediante la metodología del hisopo en parcelas lineales.....	39

---

## Lista de tablas

	<b>Pág.</b>
Tabla 1: Secuencias de los primers universales empleados.....	30
Tabla 2: Distribución en porcentaje de los diferentes géneros determinados en los diferentes aislados bacterianos.....	42
Tabla 3: Identificación detallada de los diferentes aislados bacterianos.....	43

## Lista de gráficos

	Pág.
Gráfico 1: Efecto de los sustratos foliares sobre la dinámica de crecimiento <i>in vitro</i> de la mezcla de cepas.....	46
Gráfico 2: Efecto de los sustratos foliares sobre la dinámica de poblacional de bacterias quitinolíticas nativas de la filósfera en plantas bajo cubierta (casa de mallas).....	47
Gráfico 3: Efecto de los sustratos foliares sobre la dinámica de poblacional de bacterias glucanolíticas nativas de la filósfera en plantas bajo cubierta (casa de mallas).....	48
Gráfico 4: Efecto de las bacterias líticas sobre el porcentaje de inhibición de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> .....	50
Gráfico 5: Efecto de las bacterias líticas sobre el peso seco (g) de <i>Mycosphaerella fijiensis</i> .....	51
Gráfico 6: Compatibilidad de los aislados bacterianos 5, 48, 50, 92, 41 y 19 con la mezcla fungicida y el aceite mineral.....	52
Gráfico 7: Efecto de la mezcla fungicida y el aceite mineral sobre la variable ufc.mL de los aislados bacterianos 5, 48, 50, 92, 41 y 19.....	53
Gráfico 8: Efecto de la mezcla fungicida y aceite mineral sobre la variable halo de los aislamientos bacterianos líticos.....	54
Gráfico 9: Índice de severidad para la evaluación de los sustratos foliares en parcelas lineales (condiciones de campo).....	55
Gráfico 10: Área bajo la curva de desarrollo de la Sigatoka negra para el efecto de los sustratos foliares, en condiciones de campo. Tratamientos con letras diferentes indican diferencia significativa, según la prueba de Tukey ( $p < 0,05$ ).....	55
Gráfico 11: Dinámica poblacional de bacterias glucanolíticas con el desarrollo de Sigatoka negra por acción de sustratos foliares solos y en mezcla con aceite y fungicidas.....	57
Gráfico 12: Dinámica poblacional de bacterias quitinolíticas con el desarrollo de Sigatoka negra por acción de sustratos foliares solos y en mezcla con aceite y fungicidas.....	57
Gráfico 13: Relación de la dinámica poblacional de bacterias glucanolíticas con el desarrollo de Sigatoka negra por acción de sustratos foliares solos y en mezcla con aceite y fungicidas.....	58

---

	<b>Pág.</b>
Gráfico 14: Relación de la dinámica poblacional de bacterias quitinolíticas con el desarrollo de <i>Sigatoka</i> negra por acción de sustratos foliares solos y en mezcla con aceite y fungicidas.....	58
Gráfico 15: Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de inductores de resistencia sobre la variable ufc.mL de la mezcla de aislados bacterianos.....	60
Gráfico 16: Evaluación <i>in vitro</i> del efecto de inductores de resistencia sobre el halo de consumo de aislados bacterianos.....	61
Gráfico 17: Efecto de los inductores de resistencia sobre la variable ufc/cm <sup>2</sup> de bacterias glucanolíticas.....	62
Gráfico 18: Efecto de los inductores de resistencia sobre la variable ufc/cm <sup>2</sup> de bacterias quitinolíticas.....	62
Gráfico 19: Efecto de inductores de resistencia sobre la variable ufc/cm <sup>2</sup> de bacterias en plantas bajo cubierta. Valores poblacionales en muestreos en el tiempo.....	63

## Lista de anexos

	<b>Pág.</b>
Anexo A: Procedencia y descripción morfológica y tintorial de los aislados bacterianos.....	75
Anexo B: Homologías obtenidas para las secuencias de ADN ribosomal 16S de cada uno de los aislados bacterianos.....	80
Anexo C: Resultado del análisis estadístico del efecto de los sustratos foliares sobre la mezcla de bacterias líticas para la variable ufc.mL a nivel <i>in vitro</i> .....	93
Anexo D: Resultado del análisis estadístico del efecto de los sustratos foliares sobre las bacterias quitinolíticas para la variable ufc.cm <sup>2</sup> bajo cubierta.....	94
Anexo E: Resultado del análisis estadístico del efecto de los sustratos foliares sobre las bacterias glucanolíticas para la variable ufc.cm <sup>2</sup> bajo cubierta.....	95
Anexo F: Resultado del análisis estadístico del antagonismo de las bacterias líticas sobre el crecimiento de <i>M. fijiensis</i> . Peso seco.....	96
Anexo G: Resultado del análisis estadístico de la compatibilidad de las bacterias líticas con fungicidas y aceite para la variable ufc.mL.....	97
Anexo H: Resultado del análisis estadístico de la compatibilidad de las bacterias líticas con fungicidas y aceite para la variable halo.....	98
Anexo I: Resultado del análisis estadístico del efecto de los sustratos foliares solos y en mezcla con fungicida y aceite sobre la Sigatoka negra.....	99
Anexo J: Resultado del análisis estadístico del efecto de sustratos foliares solos y en mezcla con fungicida para la variable ufc.cm <sup>2</sup> de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas en parcelas experimentales.....	100
Anexo K: Resultado del análisis estadístico del efecto de los inductores de resistencia sobre la mezcla de bacterias líticas para la variable ufc.mL y halo <i>in vitro</i> .....	101
Anexo L: Resultado del análisis estadístico del efecto de los inductores de resistencia sobre las bacterias líticas para la variable ufc.cm <sup>2</sup> bajo cubierta.....	102
Anexo M: Costo del sustrato foliar (precios 2010).....	103

## Introducción

La Sigatoka Negra es considerada la enfermedad más limitante y costosa del banano, ya que su control representa el 27% de los costos totales de producción; y se ha estimado que la enfermedad causa más del 38% de pérdidas de producción en plátano, y las pérdidas en banano se estiman ser mayores cuando el control falla (Marín *et al.* 2003). La enfermedad no llega a destruir la planta por completo, ni causa una muerte repentina, sin embargo, su capacidad para alcanzar el 100% de incidencia y su marcado impacto sobre la producción y la calidad, la ubican como el principal problema fitosanitario del cultivo de banano (Guzmán, 2006). En ausencia total de control de la enfermedad, variables importantes como el peso del racimo puede reducirse hasta un 57% (Belalcazar, 1991), mientras que la calidad de la fruta puede verse afectada hasta en un 100% (Guzmán, 2006). En condiciones de control deficiente (reducido número de hojas a la cosecha), el principal efecto de la enfermedad es en la prolongación del periodo floración-cosecha y en la reducción de la vida verde. En plantaciones comerciales de Cavendish (grupo de bananos de exportación que domina el mercado mundial), las pérdidas de mayor magnitud se relacionan con la eliminación de racimos en el campo, provenientes de plantas con poca cantidad de hojas (menos de 4 hojas sanas), debido al riesgo que presentan de maduración prematura ocasionada por la enfermedad (Guzmán, 2006).

En Colombia, el control químico de la Sigatoka negra ha pasado de US\$300 ha.año a mediados de 1980 a cerca de US\$936 ha.año en el 2009, sin contar con las incalculables pérdidas de fruta repicada por defoliación causada por la enfermedad. En la región de Urabá a comienzos de los años 1990's se realizaban 19 ciclos de aplicación de fungicidas necesarios para producir una fruta con estándares de exportación y en el 2009 se tuvo un promedio de 30 ciclos de fungicidas (Augura, 2009).

Con este escenario se puede apreciar claramente el efecto catastrófico de la Sigatoka Negra en la rentabilidad actual y futura del negocio bananero; siendo el panorama más dramático al preverse que los precios mundiales del banano, calculados como valor unitario anual de las importaciones mundiales, disminuirán en alrededor del 1,3% anual entre 2000 y 2010 de acuerdo al diagnóstico arrojado por Agrocadenas (2006).

En las plantaciones bananeras, el control de la Sigatoka Negra se basa principalmente en la aplicación de fungicidas químicos, los cuales están siendo vulnerados por el hongo, debido al surgimiento de poblaciones del mismo con pérdida de sensibilidad al modo de

acción de los fungicidas sistémicos (Marín *et al.* 2003; Patiño, 2003), llegando a ser tan grave la situación que, de cuatro grupos de fungicidas sistémicos usados en la industria de banano: benzimidazoles, estrobilurinas, morfolinas y triazoles, solo se pueden aplicar en Colombia los dos últimos, con el agravante que dentro del grupo de triazoles, cinco de las siete moléculas pertenecientes a este grupo ya no son funcionales para controlar la enfermedad, debido al mismo problema de la resistencia a fungicidas. La no disponibilidad de moléculas fungicidas con modos de acción novedosos, y a la proyección de una demanda creciente de los consumidores por una fruta más libre del uso de plaguicidas, enfatizan más aún en la prioridad de encontrar alternativas que permitan complementar el manejo integrado de la enfermedad (L.F Patiño, *comunicación personal*).

La tendencia futura por demanda de banano va estar marcada por las mayores exigencias mundiales en relación a los aspectos de inocuidad, calidad, sanidad y nutrición, parámetros que están cambiando la demanda por banano y la forma en que se produce la fruta en el mundo. Los procesos de investigación y transferencia tecnológica son factores definitivos para elevar los niveles de producción y productividad de las plantaciones bananeras (Agrocadenas, 2006).

Con base en lo anterior, se presenta el siguiente proyecto sobre bacterias líticas nativas de los ecosistemas bananeros con potencial de control biológico sobre el hongo causal de la Sigatoka negra, mediante la aplicación de sustratos foliares, reduciendo los potenciales riesgos de la aplicación masiva de un microorganismo foráneo (de un ambiente diferente) para controlar la enfermedad, al favorecer las poblaciones naturales residentes en la filósfera de banano. Esta alternativa de control se podría ajustar tanto a los actuales sistemas convencionales de banano, como aquellos basados en producción limpia u orgánica, propendiendo así por la sostenibilidad y aumento de la competitividad de la industria de banano de exportación en Colombia.

## 1. Objetivos

### 1.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de sustratos foliares sobre la dinámica de las poblaciones de bacterias líticas nativas de la filósfera de banano y el desarrollo de la Sigatoka negra.

### 1.2 Objetivos específicos

- Establecer una colección de cepas bacterianas glucanolíticas y quitinolíticas nativas de hojas de banano.
- Evaluar diferentes sustratos a nivel *in vitro* que fomenten las poblaciones de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas.
- Evaluar en plántulas de banano bajo cubierta, el incremento poblacional de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas con los cinco mejores sustratos provenientes de la evaluación *in vitro*.
- Medir la compatibilidad de las bacterias nativas de la filósfera de banano con aceite mineral y mezcla convencional de fungicidas a dosis comerciales, y sobre el desarrollo del hongo causal de la Sigatoka negra.
- Relacionar la dinámica poblacional de las bacterias líticas con la severidad de la enfermedad en plantas de banano establecidas en campo usando los mejores sustratos.
- Determinar el efecto de inductores de resistencia sobre la dinámica de bacterias líticas.

## 2. Marco teórico

### 2.1 Control biológico de enfermedades causadas por hongos fitopatógenos

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

Dentro de la regulación biológica de fitopatógenos, una de las estrategias consiste en el uso de microorganismos antagonistas productores de sustancias antibióticas y/o enzimas líticas que actúen sobre sus esporas o tubos germinativos, en su fase epífita de crecimiento (Andrews, 1992; Elad *et al.* 2002). Por ejemplo, el empleo de microorganismos productores de quitinasas y/o glucanasas en la regulación de hongos basidiomicetos y ascomicetos ha demostrado ser de utilidad, pues la pared celular de dichos hongos está constituida principalmente por microfibrillas de quitina y glucanos, hecho que los hace sensibles al ataque de estas enzimas, especialmente a nivel de la hifa (Sahai y Manocha, 1993; Alexopoulos *et al.* 1996; Mahadevan y Crawford, 1997; Cohen-Kupiec y Chet, 1998). Esta biorregulación mediante el uso de bacterias líticas antagonistas, ha sido estudiada con diversos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, *Phytophthora capsici*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*, *Bipolaris sorokiniana* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomate*, entre otros (Chernin *et al.* 1995; Valois *et al.* 1996; Ordentlich *et al.* 1998; Singh *et al.* 1999; Zhang y Yuen, 2000; Parra y Ramírez, 2002; Ji y Wilson, 2003; Sid Ahmed *et al.* 2003).

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

Chernin *et al.* (1995), reportaron que tres cepas quitinolíticas de *Enterobacter agglomerans* (IC960, IC993 y IC1270), aisladas de suelo, lograron disminuir la incidencia de *Rhizoctonia solani* en algodón, en un 64 a 86%, bajo condiciones de invernadero; mientras que dos mutantes (IC1270-E1 y IC1270-2h) de una de las cepas (IC1270), las

cuales no evidenciaron actividad quitinolítica, fueron incapaces de proteger a las plantas contra la enfermedad.

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

Singh *et al.* (1999), demostraron que la combinación de dos cepas bacterianas aisladas de suelo, *Paenibacillus* sp. 300 y *Streptomyces* sp. 385, suprimieron el daño producido por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* a una planta de pepino cohombro (*Cucumis sativus*). Tal actividad supresora, se cree involucró la acción de enzimas quitinolíticas y glucanólíticas.

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

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

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

Por otro lado, se ha demostrado que las poblaciones del microorganismo antagonista pueden ser incrementadas mediante la aplicación de sustratos foliares que las favorezcan nutricionalmente, aumentando consecuentemente su actividad biorreguladora (Davis *et al.* 1992; Fokkema *et al.* 1979; Ploper *et al.* 1992; Stadler y Mueller, 1996), en lugar de la aplicación directa y masiva de los agentes biológicos de control, evitando los riesgos potenciales asociados a este tipo de aplicación en campo.

La quitina ha sido aplicada como sustrato junto con la bacteria *Bacillus cereus* cepa 304 para el control de la mancha foliar en maní causada por *Cercospora arachidicola*, incrementándose el tamaño poblacional de la bacteria sobre las hojas y resultando en un control significativo de la enfermedad (Kokalis-Burelle *et al.* 1992). Los aminoácidos también han sido utilizados como sustratos para incrementar el tamaño poblacional de cepas de bacterias antagonistas no patogénicas sobre frutas de manzana, logrando un control mejorado del moho azul que afecta esta fruta (Janisiewicz, Usall y Bors, 1992). Se ha reportado también que la aplicación de metionina incrementó el tamaño poblacional

del agente de control biológico *Pseudomonas putida* AP-1 en el suelo, donde la supresión de la marchitez por *Fusarium* en tomate fue mayor cuando la bacteria fue aplicada con el aminoácido en relación a su aplicación individual (Yamada y Ogiso 1997).

La habilidad para incrementar selectivamente el tamaño poblacional y la eficacia de un microorganismo biocontrolador, empleando enmiendas nutricionales, se basa en el hecho de que la concentración y diversidad de nutrientes constituye un factor limitante para el crecimiento de las poblaciones microbianas en la planta, especialmente las localizadas en el filoplano; pues dicho lugar constituye un hábitat donde la concentración de fuentes de carbono y nitrógeno es escasa (Andrews, 1992; Janisiewicz y Bors, 1995; Wilson y Lindow, 1994; Wilson *et al.* 1995; Salazar, 2005), observándose por ejemplo que la aplicación exógena de carbono incrementa las poblaciones de *P. putida* y *P. syringae* en la filósfera de frijol y tomate respectivamente (Wilson y Lindow, 1995; Ji y Wilson, 2003).

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

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

En el caso de la biorregulación para el hongo causal de la Sigatoka Negra, *Mycosphaerella fijiensis*, se han realizado algunas investigaciones basadas en el uso de antagonistas nativos de la filósfera de musáceas alimenticias y en el uso de sustratos foliares.

González *et al.* (1996), aislaron 120 microorganismos quitinolíticos de la filósfera de plantas de banano var. Gran Enano, en Costa Rica. Pruebas de antagonismo *in vitro*, mostraron que las cepas R1 y A23, pertenecientes a la especie *S. marcescens*, inhibieron la longitud del tubo germinativo de *M. fijiensis* en un 74.2% y 71.4%, respectivamente. En pruebas con fungicidas sintéticos, se determinó que los dos aislados fueron compatibles con mancozeb, propiconazol, tridemorf y con benomil,

cuando fueron usados a concentraciones de hasta 1000 ppm debido a que en la evaluación no presentaron zona de inhibición bacterial producida por el fungicida, mientras que la aplicación de Agrimicin (bactericida) impidió el crecimiento bacterial. Posteriormente, en ensayos de casa de mallas y parcelas experimentales, y utilizando plantas de banano var. Gran Enano, evaluaron el efecto de diversos sustratos -R1 + A23, quitina, R1 + A23 + quitina, un fungicida sintético y agua- sobre la evolución de la Sigatoka Negra. En la casa de mallas, los tratamientos controlaron la enfermedad en un 84%, sin presentar diferencias significativas entre ellos y con el fungicida, pero si hubo diferencia significativa con respecto al testigo absoluto. En el campo, todos los tratamientos fueron superiores al testigo, pero el tratamiento con fungicidas controló la enfermedad en un 60%, mientras que los otros tratamientos la controlaron en un 40% en promedio sin presentar diferencias significativas entre ellos.

Ruíz-Silvera *et al.* (1997) evaluaron el efecto de diferentes sustratos, extracto de hojas de banano, leche, abono foliar, melaza y almidón de yuca, solos ó en combinación sobre el crecimiento de bacterias antagonistas de *M. fijiensis* tanto *in vitro* como en casa de mallas. En el ensayo *in vitro*, el extracto de hojas de banano fue el mejor sustrato para el crecimiento de *S. marcescens* R1. En las pruebas realizadas en casa de mallas, el sustrato compuesto por leche y melaza mostró los mejores resultados con respecto al establecimiento de *S. marcescens* R1. Posteriormente, estos autores evaluaron el efecto de diversos sustratos foliares sobre la evolución de la Sigatoka Negra en plantas de banano var. Gran Enano, en condiciones de invernadero y condiciones de campo. En condiciones de invernadero, el sustrato compuesto de *S. marcescens* R1 y melaza presentó los mejores resultados para controlar la enfermedad. Sin embargo, en el ensayo de campo no se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos y el testigo absoluto.

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

Osorio *et al.* (2004) realizaron una selección de bacterias quitinolíticas nativas del Urabá antioqueño con potencial antagonista hacia *M. fijiensis*. Veinte de las 116 bacterias aisladas inicialmente provenientes de agua de pozo, lavados de la filósfera ó muestras de suelo de plantas de banano y plátano, evidenciaron las mayores tasas de degradación de la quitina. Tres de tales aislados fueron seleccionados por su antagonismo *in vitro* contra

*M. fijiensis* y su compatibilidad con fungicidas sintéticos usados en el control de la Sigatoka Negra para su inclusión en diversos sustratos solos o en mezcla con una solución mineral mínima y un adherente comercial, los cuales fueron aplicados en las hojas en condiciones de invernadero a plántulas de banano var. Gran Enano, sometidas a un proceso de inoculación natural con el patógeno. Ninguna de las bacterias evaluadas, presentó diferencias significativas con el testigo absoluto. Sin embargo, al aplicarlas en rotación con fungicidas sintéticos se obtuvo un control estadísticamente igual al ofrecido por el sistema estándar de control químico, bajo condiciones de campo.

Una caracterización parcial de las bacterias quitinolíticas y glucanolíticas epífitas aisladas de la filósfera de plantaciones comerciales de banano y plátano en Costa Rica y en Urabá Colombia evidenció la presencia de bacterias con potencial biorregulador contra *M. fijiensis*. Estas bacterias, con morfología de bacilos Gram negativos principalmente, cocos ó bacilos Gram positivos, fueron capaces de producir quitinasas y glucanasas en medios de crecimiento selectivos con quitina ó  $\beta$ -(1,3) glucano, respectivamente, como única fuente de carbono, en períodos inferiores a 48 h de incubación (Osorio *et al.* 2004; Salazar, 2005). Esta capacidad puede permitir a las bacterias aisladas actuar sobre la quitina y/o  $\beta$ -(1,3) glucano presentes en la pared celular de las ascosporas del hongo, antes de que éstas penetren en el estoma; pues se ha observado que transcurren al menos 48 h entre la llegada de la ascospora a la hoja y el inicio del proceso de penetración en el estoma (Beveraggi, 1992; Stover, 1980; citados por Marín *et al.* 2003).

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

La información obtenida de la caracterización química fue empleada para formular un sustrato foliar que permitiera incrementar, de manera selectiva, las poblaciones de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas de la filósfera de las musáceas estudiadas, seleccionando dos sustratos a base de quitina coloidal, harina de cebada y úrea, los cuales incrementaron en más de 10,000 veces la población de estas bacterias líticas (Salazar, 2005). En la experimentación en campo la aplicación de dichos sustratos en rotación con fungicidas convencionales permitió una reducción del 46% en el número de ciclos (representada en 6 ciclos menos) con respecto al control químico estándar para un

control similar de la enfermedad donde el control absoluto fue estadísticamente diferente (Patiño *et al.* 2006). Es posible elaborar un sustrato foliar con un elemento de bajo costo y fácil obtención como la harina de cebada como sustrato apropiado para la selección de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas en la filósfera de banano, perfilando así un reemplazo de la quitina coloidal de alto costo y laboriosa obtención por la harina de cebada.

## 2.2 La inducción de resistencia como alternativa de control de enfermedades en cultivos

La inducción de resistencia a través de la aplicación de sustancias químicas sintéticas puede ser una alternativa de control de enfermedades en los cultivos de plantas, en las cuales desencadenan señales que activan varias respuestas de defensa. Esta estrategia ha sido reportada con reducciones significativas de enfermedad en cultivos como trigo, repollo, tomate, banano, melón y tabaco, para un amplio espectro de patógenos como *Erysiphe graminis* f. sp. tritici, *Peronospora parasitica*, Virus del Mosaico del Pepino, virus de la marchitez manchada del tomate TSWV, *Clavibacter michiganensis* subsp. michiganensis II, *Xanthomonas axonopodis* pv. vesicatoria, *Mycosphaerella fijiensis*, *Didymella bryoniae* y *Botrytis cinerea* (Görlach *et al.* 1996; Sticher, Mauch-Mani, y Métraux 1997; Godard *et al.* 1999; Anfoka, 2000; Pappu *et al.* 2000; Griesbach *et al.* 2000; Madrigal *et al.* 1998; Romero *et al.* 2001; Corrales *et al.* 2002; Patiño, 2002; Hincapié, 2003; Pérez *et al.*, 2003; Rizzo *et al.* 2003; Małolepsza, 2006).

Actualmente, se conocen dos tipos de resistencia, la resistencia sistémica adquirida (RSA) y la resistencia sistémica inducida (RSI). La RSA puede ser inducida por agentes bióticos (tales como patógenos atenuados) o abióticos (como compuestos químicos) y se asocia al incremento de la concentración de la fitohormona salicilato y a la producción de proteínas relacionadas con patogénesis (PRP). La RSI es estimulada por rizobacterias promotoras del crecimiento (PGPR) y se asocia a la mayor sensibilidad a las fitohormonas etileno y jasmonato sin producción de proteínas relacionadas con patogénesis (Pieterse *et al.* 1996; Kloepper *et al.*, 2004), pero hasta ahora, los inductores químicos han sido los más efectivos, sobresaliendo las moléculas ácido salicílico (AS) y sus análogos funcionales ácido 2,6-dicloroisonicotínico (INA) y Benzo (1,2,3) tiadiazole-7-carbotionico ácido-s-metil ester (BTH- Asm) (Kessmann, *et al.* 1994; Sticher, Mauch-Mani, y Métraux 1997; Vallad y Goodman, 2004).

Ambos mecanismos pueden resultar en una resistencia general de las plantas hacia diversos patógenos (Pieterse *et al.* 1996; Kloepper *et al.* 2004).

Las bacterias promotoras del crecimiento, como *Bacillus* sp. (Kloepper *et al.* 2004; Buensanteai, 2009), *Pseudomonas* spp. (Verhagen *et al.* 2010), *Paenibacillus* spp. (Beneduzi *et al.* 2010), constituyen algunos de los diversos grupos de microorganismos asociados a las plantas con el potencial de inducir mecanismos de defensa.

Otros autores (Raupach y Kloepper, 2000) han evaluado PGPR previamente encontradas para inducir resistencia sistémica (RSI) como *Bacillus subtilis* cepa GB03, *Bacillus*

*pumilus* INR7 y *Curtobacterium flaccumfaciens* con la finalidad de corroborar dicha resistencia y la severidad de *P. syringae* pv. *Lachrymans* en pepino, encontrando promoción significativa del crecimiento en las plantas inoculadas y reducción significativa de enfermedades foliares con estas bacterias, comparada con el tratamiento testigo que no fue tratado. Los resultados demuestran que la actividad de RSI mediada por PGPR basada en la protección contra patógenos de origen natural se produce.

Por otro lado, numerosos estudios muestran que AS juega un papel central en la defensa de las plantas contra patógenos. AS aumenta los niveles en zonas infectadas en respuesta al ataque de patógenos, y la aplicación exógena de AS puede inducir una serie de genes relacionados con la patogénesis y establecer RSA (Uknes *et al.* 1992).

La actividad lítica de las bacterias puede ser desencadenante de un sistema de resistencia (RSA) contra la Sigatoka negra.

En este sentido, se reporta que las quitinasas juegan un papel protector contra fitopatógenos fúngicos, debido a su habilidad para atacar directamente la pared celular de los hongos. Las quitinasas, además, son enzimas no específicas por el sustrato y también pueden degradar otros compuestos dentro de los que se incluyen las proteínas (Radwan *et al.* 1994). Adicionalmente, las quitinasas liberan oligo-N-acetyl glucosamina que funcionan como elicitores para la activación de respuestas relacionadas con defensa en las plantas (Ren y West, 1992).

Para Sigatoka negra, al aplicar el inductor Asm y la inducción vía Acido Salicílico (AS) en mezcla con fungicidas, bacterias líticas, y con un producto a base de extractos vegetales, se han encontrado reducciones significativas de la enfermedad (Corrales *et al.* 2002; Patiño 2002; Vawdry y Grice, 2005; Zuluaga *et al.* 2007).

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1 Localización

El estudio se realizó en conjunto en la Sede de Laboratorios del Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid en la ciudad de Medellín (Antioquia) y en la Sede regional de Urabá de la misma institución en el municipio de Apartadó (Antioquia) corregimiento El Reposo, donde se estableció la fase bajo cubierta y la de parcelas experimentales en campo. La zona cuenta con una altitud de 30 m.s.n.m., localizado en un ecosistema bosque muy húmedo pluvial montano (bmh-pM), con una temperatura promedio de 24°C, una precipitación anual promedio de 2650 mm y una humedad relativa del 87% (Chica *et al.* 2004).

#### 3.2 Metodología

##### 3.2.1 Establecimiento de una colección de cepas bacterianas glucanolíticas y quitinolíticas nativas de hojas de banano

- **Aislamiento**

Se seleccionaron lotes de fincas bananeras en la zona de Urabá con alta y baja incidencia de la enfermedad causada por *Mycosphaerella fijiensis* en plantas con diferentes estadios en la escala de Fouré, siendo la mayor parte de la colección a partir de muestras en estadios 1 y 2 (Figura 1). Se colectó la parte de la hoja afectada con una deshojadora, que luego se redujo al centro de la lesión, se exceptuaron bordes y nervaduras. El empaque se realizó en bolsas de papel inmediatamente después del corte. El envío de la zona de Urabá al sitio de procesamiento y siembra se realizó dentro de las 24 horas siguientes.



Figura 1: Estadios de *M. fijiensis* sobre la hoja de banano. (Henao, 2007).

En condiciones de laboratorio, se tomaron de cada muestra porciones con áreas de 25 cm<sup>2</sup>, los cuales fueron inmediatamente sumergidos en 20 mL de una solución buffer fosfato estéril a pH 7.0, compuesto por 5.8g.L<sup>-1</sup> de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Merck) y 3.5g.L<sup>-1</sup> de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Merck) (Arango, 2002). La solución se agitó en un agitador orbital por 20 minutos. Se realizaron diluciones seriales hasta 10<sup>-3</sup> y de esta última, se tomaron alícuotas de 20 µL, que fueron sembradas mediante la técnica de siembra en superficie (asa de vidrio) en medios de cultivo con agar bacteriológico mas quitina coloidal (4%) y agar bacteriológico mas harina de cebada (2.5%) (Salazar, 2005). Al cabo de una incubación a 28°C durante 48 horas, fueron identificadas colonias que formaban halo de consumo translúcido sobre los medios con estas fuentes de carbono (harina de cebada y quitina coloidal) (Figura 2).



**Figura 2: Formación de halo de consumo sobre medio con quitina coloidal como fuente de carbono. Cepa 38QG.**

#### ▪ **Almacenamiento**

Para la conservación definitiva de los aislamientos que presentaron halo de consumo sobre los medios selectivos (actividad lítica) se realizó el siguiente procedimiento: Se transfirieron las colonias a 5 mL de Trypticase Soy Broth (TSB) (Beckton Dickinson, 30g.L) en tubos de centrifuga de 50 mL. Los tubos se colocaron en agitación a 100 rpm durante 48 horas o hasta que se evidenció turbidez. Se centrifugó a 6000 rpm por 20 minutos. Se descarto el sobrenadante. Se adicionaron 5 mL de TSB + Glicerol (Merck) en partes iguales (autoclavados juntos en solución). La solución fue agitada en el vórtex. Se dispersó en crioviales de 1.5 mL y se almacenó a -70° C (Day y Stacey, 2007).

#### ▪ **Identificación molecular de aislados bacterianos (Corporación para investigaciones biológicas CIB)**

- Preparación de aislados bacterianos para extracción de ADN genómico

A partir de cada aislado se tomó con palillo de madera estéril una colonia y se inocularon en tubos de vidrio con tapa rosca autoclavados previamente conteniendo 6 ml de medio

Luria Bertani (LB) líquido, los tubos inoculados fueron incubados a  $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 200 RPM de agitación por 72 horas.

- Extracción de ADN cromosómico bacteriano

Extracción de ADN bacteriano por el método Gilbertson (sin fenol cloroformo): Se recuperaron las bacterias por centrifugación a 10.000 rpm por 10 minutos a partir de los cultivos bacterianos descritos anteriormente. El pellet bacteriano fue transferido a un tubo eppendorf al que se le adicionó 500  $\mu\text{l}$  de Buffer de extracción (Tris-HCl 100 mM, NaCl 500 mM y EDTA 50 mM) y 50  $\mu\text{l}$  lisozima (5 mg.ml) se mezcló suavemente por inversión y se dejó en hielo por 10 minutos. Posteriormente se agregaron 40  $\mu\text{l}$  de SDS al 20 % (W/V) y se mezcló por inversión para luego adicionar 250  $\mu\text{l}$  de acetato de potasio 5 M y se incubó en baño María a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 10 min, se centrifugó durante 15 min a 11.000 rpm. El sobrenadante fue transferido a un tubo eppendorf nuevo y se agregó 0.5 volúmenes de isopropanol frío. Se mezcló por inversión e incubó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 horas. Se centrifugó a 11.000 rpm durante 15 min, se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó 2 veces con 0.5 ml de etanol 70 %. El etanol fue eliminado y el precipitado se secó en una centrifuga con vacío. Por último, el precipitado se resuspendió en agua ultrapura.

Extracción de ADN cromosómico bacteriano por el método reportado por Wren *et al.* 1987 (con fenol-cloroformo): Se recuperaron las bacterias por centrifugación a 10000 rpm por 10 minutos. El pellet bacteriano fue transferido a un tubo eppendorf al que se le adicionaron 500  $\mu\text{l}$  de Tris-HCl 50 mM que contiene sacarosa al 0.25 % W/V) y 50  $\mu\text{l}$  de lisozima recién preparada (10 mg.ml), se mezcló suavemente por inversión y se incubó a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. Posteriormente se adicionaron 40  $\mu\text{l}$  de SDS al 5 % (W/V), 150  $\mu\text{l}$  de TE 1X y 2  $\mu\text{l}$  de Proteinasa K (20 mg.ml), se mezcló por inversión y se incubó en baño María a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 4 horas. Luego se adicionó 1 volumen igual de Fenol/Cloroformo y se mezcló por inversión, se centrifugó durante 10 min a 11.000 rpm. El sobrenadante fue transferido a un tubo eppendorf nuevo y se agregó 0.1 volúmenes acetato de sodio 3 M y 0.6 volúmenes de isopropanol frío. Se mezcló por inversión e incubó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 horas. Se centrifugó a 11.000 rpm durante 15 min, se eliminó el sobrenadante y el pellet se lavó 3 veces con 0.5 ml de etanol 70 %. El etanol fue eliminado y el precipitado se secó en una centrifuga con vacío. Por último, el precipitado se resuspendió en agua ultrapura.

- Amplificación de ADN ribosomal 16S por PCR

La amplificación del ADN ribosomal 16S se realizó mediante PCR convencional, usando dos juegos de cebadores específicos para la identificación de bacterias: 27F/1492R y 518F/800R (Tabla 1), estos cebadores han sido ampliamente utilizados para la determinación taxonómica de cepas bacterianas (Galkiewicz y Kellogg, 2008). 27F y 1492R, amplificaron una región del ADN Ribosomal 16S correspondiente a un fragmento de 1500 pb aproximadamente y el amplificado correspondiente al los cebadores 518F y 800R es de 300 pb aproximadamente.

**Tabla 1: Secuencias de los primers universales empleados.**

Primer	Secuencia
27F	5' AGAGTTTGATCATGGCTCAG 3'
1492R	5' TACGGCTACCTTGTTACGACTT 3'
518F	5' CCAGCAGCCGCGGTAATACG 3'
800R	5' TACCAGGGTATCTAATCC 3'

Para cada reacción, se utilizaron 100 ng de ADN genómico extraído, mezclado con una solución que contenía cada cebador a una concentración 0.4  $\mu$ M, 0.2mM de dNTPs, 1.5 unidades de *Taq* polimerasa (Fermentas, Maryland, USA), 1X de buffer de PCR (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.3) y 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>. Las amplificaciones fueron realizadas en un termociclador iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA, U.S.A.), mediante las siguientes condiciones: un paso inicial de 95 °C por 15 min; 30 ciclos de amplificación de 1 min de denaturación a 95 °C, 1 min de alineamiento a 56 °C y 2 min de extensión a 72 °C; seguido de un ciclo extra de extensión de 10 min a 72 °C. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en un gel de agarosa al 1 %, a 75 voltios durante 1 h, luego fueron teñidos con bromuro de etidio (1  $\mu$ g.ml) y visualizados en luz ultravioleta.

- Análisis de las secuencias amplificadas del ADN ribosomal 16S de los aislados bacterianos

Los productos de la reacción de PCR de cada uno de los aislados bacterianos fueron secuenciados por la compañía MACROGEN. Con las secuencias determinadas se hizo el análisis bioinformático mediante la aplicación SEQMAN del programa especializado en análisis de secuencias LASERGEN Versión 7.0 (DNASTAR Inc). Para esto se realizó inicialmente el ensamble de las cuatro secuencias correspondientes para cada uno de los aislados en una sola secuencia consenso de aproximadamente 1400pb. Luego de tener ensamblada la secuencia consenso de cada uno de los aislados bacterianos, estas fueron comparadas en el GENBANK (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), con el fin de determinar homología de las secuencias con la base de datos y así poder identificarlas.

### **3.2.2 Evaluación de diferentes sustratos a nivel *in vitro* que fomenten las poblaciones de bacterias quitinolíticas y gluconolíticas**

Se seleccionaron tres cepas de la colección codificadas como 10Q, 33G, 48G y una mezcla de estas (Mix), las cuales, además de poseer actividad lítica, eran diferentes en

cuanto a pigmentación y tinción de Gram, lo que permitía una diferenciación a nivel visual. Fueron aisladas en medios selectivos (agar bacteriológico (2%) y harina de cebada (2.5%) o agar bacteriológico (2%) y quitina coloidal (4%)) para activar la capacidad lítica sobre los medios, luego de su crecimiento las colonias se llevaron a una solución con agua destilada estéril (utilizando como referencia para la concentración el patrón Mc Farland ( $1.5 \times 10^9$  ufc.mL)). Se inocularon los diferentes sustratos con alícuotas de 50  $\mu$ L de las soluciones que contenían las cepas. En tubos de ensayo se prepararon 5 mL de cada sustrato. Los sustratos fueron los siguientes:

T1: SMB\* + Q (Quitina)

T2: SMB + HC (Harina Cebada)

T3: SMB + UREA

T4: SMB

T5: SMB + Q + UREA

T6: SMB + HC + UREA

T7: Estaba planteado como SMB + U, que es igual a T3.

T8: SMB + Q + NEOFAT\*\*

T9: SMB + HC + NEOFAT

T10: SMB + UREA + NEOFAT

T11: SMB + NEOFAT

T12: SMB + Q + UREA + NEOFAT

T13: SMB + HC + UREA + NEOFAT

T14: Estaba planteado como SMB + U + Coadyuvante (Neofat), que es igual a T10.

T15: NEOFAT

T16: BUFFER\*\*\*

T17: BUFFER + UREA

T18: BUFFER + Q

T19: BUFFER + HC

T0: AGUA (Testigo)

\*SMB: Solución Mineral Base, compuesta de 1 g.L de  $K_2HPO_4$ , 0,5 g.L de  $MgSO_4$ , 1 g.L de NaCl, 1 g.L de  $CaNO_3$ .

\*\*Neofat: Coadyuvante con propiedades adherentes y dispersantes empleado en estrategias de control biológico, a concentración convencional (1mL.L).

\*\*\* BUFFER: 5.8g.L de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 3.5g.L de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , a pH 7.

Quitina coloidal; 40mL.L, Urea; 40 g.L y Harina de cebada; 25 g.L.

Los sustratos inoculados con cada cepa y el mix se agitaron en un agitador orbital durante 48 horas para asegurar el crecimiento de las cepas. Luego de este tiempo se tomaron alícuotas de 20  $\mu\text{L}$  y se sembraron mediante la técnica de siembra en superficie en medios selectivos (agar bacteriológico mas quitina coloidal y agar bacteriológico mas harina de cebada) y se incubaron a 28°C hasta que se evidenció el crecimiento (entre 48-72 horas), donde se realizaron conteos de colonias de cada cepa para luego ser llevada a términos de ufc.mL.

Se realizaron tres fases o repeticiones del experimento separadas en el tiempo. Los resultados fueron evaluados a partir de un diseño completamente aleatorio, con 18 tratamientos y 2 repeticiones por tratamiento, siendo cada repetición una caja de Petri, utilizando el software Statistica release 6, aplicando un Modelo Lineal Generalizado (GLM).

### **3.2.3 Evaluación en plántulas de banano del incremento poblacional de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas por acción de los cinco mejores sustratos provenientes de la evaluación *in vitro* en condiciones de casa de mallas (bajo cubierta)**

Las plantas que se usaron provenían de cultivo *in vitro*, las cuales, luego de cumplir su etapa de vivero, fueron trasplantadas a bolsas plásticas en sustrato arena - cisco de arroz en relación 1:1. Posteriormente fueron ingresadas a casa de malla (figura 3) y transcurridos 2 meses les fueron realizadas la aplicación de los siguientes sustratos:

T1: SMB + Q

T2: SMB + Q + UREA + NEOFAT

T3: SMB + HC + UREA + NEOFAT

T4: SMB + UREA

T5: Adicional: BUFFER + HC +Q + UREA+NEOFAT

T0: Testigo (plantas sin aplicación de sustratos)



**Figura 3: Evaluación bajo cubierta.**



**Figura 4: Inoculación natural.**

Se utilizaron 14 plantas por tratamiento para un total de 84 plantas.

Los sustratos fueron aplicados en el haz de las hojas en las horas de la tarde. Las plantas permanecieron allí hasta la mañana del día siguiente, momento en el cual se llevaron a campo hasta el final de la tarde para favorecer la inoculación natural (Figura 4). Se realizaron aplicaciones de los sustratos cada 7 días. Se muestrearon 2 plantas/vez, los días 1, 3, 6, 9, 12, 15 y 18 partiendo de la primera aplicación, seleccionando áreas de 25 cm<sup>2</sup> del primer tercio de la hoja número dos de cada planta.

Para la captura de las bacterias se utilizó la metodología descrita por Downes e Ito (2001), la cual consiste en frotar un área determinada (haz de la hoja) con un hisopo estéril y húmedo con buffer fosfato en por lo menos dos direcciones distintas, rotándolo ligeramente (Figura 5). Después se descargó el hisopo en un medio de recogida que contenía 2 mL de buffer fosfato estéril a pH 7.0 (5.8g.L de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 3.5g.L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). Los tubos se conservaron en hielo hasta su procesamiento (no más de 6 horas).



**Figura 5: Toma de muestra usando el hisopo.**

Una vez en el laboratorio, se realizaron diluciones seriadas por muestra, hasta la dilución 10<sup>-9</sup>. De las diluciones se tomaron 20 µL y fueron sembrados por duplicado mediante la técnica de siembra en superficie en los medios selectivos (agar bacteriológico (2%) con harina de cebada (4%) y agar bacteriológico (2%) con quitina coloidal (4%)). El proceso

de incubación, se realizó a 28°C. Se hizo lectura cuando se evidenció crecimiento (entre 48-72 horas), donde se realizaron conteos de colonias para luego ser llevadas a términos de ufc.cm<sup>2</sup>. Se realizaron tres fases o repeticiones del experimento separadas en el tiempo.

Los resultados fueron evaluados a partir de un diseño de bloques completos al azar, con 3 bloques (fases o repeticiones en el tiempo), 6 tratamientos y 14 repeticiones por tratamiento, siendo cada repetición una caja de Petri, utilizando el software Statistica release 6, aplicando un Modelo Lineal Generalizado (GLM).

### **3.2.4 Efecto de las bacterias sobre el desarrollo del hongo causal de la Sigatoka negra y medición de la compatibilidad de las bacterias nativas de la filósfera de banano con aceite mineral y mezcla convencional de fungicidas a dosis comerciales.**

- **Efecto de las bacterias sobre el desarrollo de *Mycosphaerella fijiensis***
- Activación y preparación del inóculo de *M. fijiensis* para las pruebas de antagonismo

La activación del micelio de *M. fijiensis* se realizó sembrando 100 µL del micelio conservado en cajas de Petri con PDA y 200 ppm de cloranfenicol e incubando las cajas por 12 días a oscuridad a 21 ± 3°C. A toda la biomasa obtenida en la caja se le realizó el procedimiento de fragmentación de micelio y se inocularon 10 mL de la solución obtenida en 100 mL de caldo Sabouraud para ser incubados por 8 días a 30,0 ± 0,5 °C. Luego, este micelio fue fragmentado y filtrado en tela para ser utilizado en las pruebas de antagonismo. La concentración del inóculo del hongo se cuantificó sembrando 100 µL de éste en cajas de PDA, las cuales fueron incubadas por 10 días a 21 ± 3°C a oscuridad para finalmente contar las ufc viables de fragmentos de micelio por µL (Ceballos, 2009).

- Obtención de los extractos bacterianos para las pruebas de antagonismo

Los aislados bacterianos 1, 10, 14, 19, 22, 26, 28, 29, 32, 33, 38, 41, 44, 48, 5, 50, 53, 56, 57, 58, 6, 60, 64, 67, 68, 70, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 86, 88, 89, 92 y 95 se activaron en los medios selectivos durante 48 horas, luego se sembraron en TSB y fueron mantenidas en agitación a 100 rpm y 28°C durante 48 horas. Los cultivos fueron centrifugados dos veces a 6000 rpm, recuperando los sobrenadantes. Los sobrenadantes obtenidos fueron almacenados hasta las pruebas de antagonismo en nevera a 4°C por no más de 5 días.

- Pruebas de antagonismo *in vitro* por la técnica de platos duales

Para esto se utilizó la metodología trabajada por Riveros *et al.* (2003) citado por Ceballos (2009), donde se evaluó el porcentaje de inhibición de crecimiento de las colonias del

hongo en cultivos duales con el extracto de cada una de las bacterias. Para esto, 100  $\mu$ L de los extractos bacterianos fueron plateados en cajas Petri de 9 cm de diámetro con PDA. Posteriormente, en la misma caja Petri se platearon 100  $\mu$ L del inóculo preparado de *M. fijiensis*. El crecimiento micelial del hongo se determinó midiendo los diámetros de las colonias de *M.fijiensis* luego de quince días de incubación a  $21 \pm 3^\circ\text{C}$  en oscuridad. El porcentaje de inhibición de crecimiento micelial (% Inh.) para cada tratamiento (Tto), se calculó considerando el crecimiento del hongo del control absoluto (C.Abs) como 100% y utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Inh} = ((\Phi \text{ promedio C.Abs} - \Phi \text{ Tto}) / \Phi \text{ promedio C. Abs}) * 100$$

Los resultados fueron evaluados a partir de un diseño completamente aleatorio, con 43 tratamientos (40 aislados bacterianos, dos mezclas de ellos y un testigo solo con el hongo) con 3 repeticiones por tratamiento, siendo cada repetición una caja de Petri, utilizando el software Statistica release 6, aplicando un Modelo Lineal Generalizado (GLM).

- Pruebas de antagonismo en medios líquidos

En tubos de centrifuga se prepararon partes iguales de los extractos bacterianos, del inóculo de *M. fijiensis* y de caldo Sabouraud. Fueron agitados en un agitador orbital a 100 rpm a  $28^\circ\text{C}$  durante 15 días. Luego se centrifugaron a 6000 rpm durante 20 minutos, se eliminó el sobrenadante y se llevó a horno a  $60^\circ\text{C}$  durante 3 horas para eliminar el exceso de agua, para posteriormente determinar el peso seco del micelio de cada tratamiento.

Los resultados fueron evaluados a partir de un diseño completamente aleatorio, con 43 tratamientos (40 aislados bacterianos, dos mezclas de ellos y un testigo solo con el hongo) con 3 repeticiones por tratamiento, siendo cada repetición un tubo de centrifuga, utilizando el software Statistica release 6, aplicando un Modelo Lineal Generalizado (GLM).

- **Compatibilidad de las bacterias con aceite mineral y fungicidas**

Para evaluar la compatibilidad de los aislados 5, 48, 50 92, 41 y 19 en medios líquidos selectivos (caldo de cultivo) con quitina y harina de cebada, se agregó el aceite a dosis comercial y la mezcla convencional de fungicidas a dosis comerciales y a dosis experimentales. Los tratamientos evaluados fueron:

T1: Clorotalonil 900.000 ppm (BC) dosis comercial	T5: Tridemorf 1 ppm (C1)
T2: Clorotalonil 3 ppm (B3)	T6: Tridemorf 10 ppm (C10)
T3: Clorotalonil 1 ppm (B1)	T7: Difenconazol 100.000 ppm (SC) dosis comercial
T4: Tridemorf 430.000 ppm (CC) dosis comercial	T8: Difenconazol 0.1 ppm (S0.1)

T9: Difenconazol 1 ppm (S1)

T0: Testigo (medio líquido + aislado bacteriano).

T10: Aceite 50% (A)

La inoculación de los medios se llevó a cabo con los aislamientos de la colección mencionados anteriormente debido a que presentaron el mejor comportamiento en las pruebas de antagonismo (porcentaje de inhibición del micelio de *M. fijiensis*), además de ser diferentes por morfología y sitio de aislamiento. Dichos aislados se activaron en los medios selectivos durante 48 horas y luego se transfirieron las colonias a una solución con agua destilada estéril (utilizando como referencia para la concentración de la solución el patrón Mc Farland ( $1.5 \times 10^9$  ufc/mL). Se inocularon los diferentes tratamientos con 50 $\mu$ L de la solución de cada aislamiento por separado. Se agitaron en un agitador orbital por 48 horas a 28°C. Luego se colectaron las células por centrifugación a 6000 rpm durante 20 minutos. Se realizaron dos lavados del pellet celular resuspendiendo con agua destilada estéril cada vez y nuevamente centrifugando. Al término de la última centrifugación se resuspendió el pellet con 1 mL de agua destilada estéril, este se uso como fuente de inóculo para sembrar por la técnica de siembra en superficie, 20 $\mu$ L en los medios selectivos sólidos correspondientes. Se evaluó el crecimiento de colonias, post tratamiento a las 48 horas, donde se realizaron conteos de colonias para luego ser llevados a términos de ufc.mL.

Los resultados fueron analizados a partir de un diseño completamente aleatorio, con 11 tratamientos y 4 repeticiones por tratamiento para cada aislamiento, siendo cada repetición una caja de Petri, utilizando el software Statistica release 6, aplicando un Modelo Lineal Generalizado (GLM).

### **3.2.5 Relación de la dinámica poblacional de las bacterias líticas con la severidad de la enfermedad en plantas de banano establecidas en campo usando los mejores sustratos**

Las actividades para la evaluación en campo, se iniciaron con el acondicionamiento del terreno para el establecimiento de las parcelas lineales. Esta actividad incluyó labores de chapeo, tumba de árboles, construcción de drenajes. Se adoptó el establecimiento de parcelas lineales de banano (Figura 6), separadas por una barrera de pasto King-grass, destinada a evitar la deriva de las aplicaciones sobre las parcelas contiguas. Cada parcela lineal, constó de 7 plantas del cultivar Gran enano, pero sólo las cinco centrales fueron para la evaluación.



**Figura 6: Parcelas lineales establecidas para la evaluación de los sustratos.**

Los tratamientos aplicados fueron los siguientes:

T1: Mejor sustrato foliar 1 (SF1)

T2: Mejor sustrato foliar 2 (SF2)

T3: SF1 + aceite mineral a dosis convencional

T4: SF2 + aceite mineral a dosis convencional

T5: SF 1 + mezcla fungicida convencional

T6: SF 2 + mezcla fungicida convencional

T7: Aceite mineral a dosis y frecuencia de aplicación convencional

T8: Mezcla fungicida a dosis y frecuencia de aplicación convencional

T9: Testigo (plantas sin control químico)

Los tratamientos fueron aplicados en dosis equivalente a 5 galones por hectárea de mezcla total, los que llevan fungicidas se aplican en dosis equivalente a la recomendada por la casa comercial, la cual varía con cada producto. Los tratamientos fueron aplicados semanalmente para los sustratos solos, y la aplicación de los fungicidas convencionales se hace de acuerdo al tipo de producto siendo cada 7-9 días si este es protectante o cada 12-14 días si es sistémico. Todos los tratamientos recibieron el control cultural de la enfermedad que se practica en una finca convencional.

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

Grado 0 = Hoja sin síntomas visibles

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

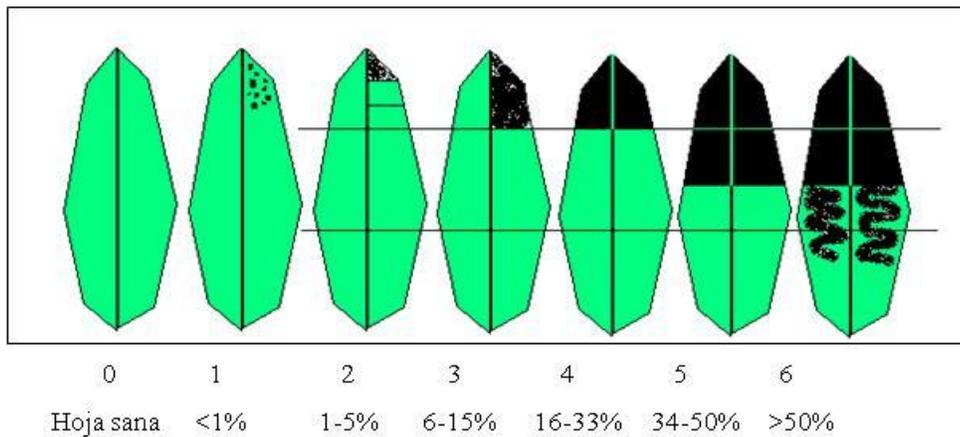
Grado 2 = Hoja con 1 – 5% de área foliar atacada

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

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

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

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



**Figura 7: Escala de Stover modificada por Gauhl (1989).**

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

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

Para estimar el comportamiento de los tratamientos en el tiempo, se usó la variable área bajo la curva del desarrollo de la enfermedad (ABCDE). Se realizaron evaluaciones durante 16 semanas. Los resultados fueron analizados mediante el software Statistica release 6. Se utilizó un diseño de bloques completamente al azar.

La evaluación de la dinámica poblacional para este objetivo se realizó bajo la misma metodología utilizada en el objetivo tres, numeral 3.2.3 (Figura 8).



**Figura 8: Muestreo de hoja mediante la metodología del hisopo en parcelas lineales.**

Una vez en el laboratorio, se realizaron diluciones seriadas por muestra, hasta la dilución  $10^{-9}$ . De las diluciones se tomaron  $20 \mu\text{L}$  y fueron sembrados por duplicado mediante la técnica de siembra en superficie en los medios selectivos (agar bacteriológico (2%) con harina de cebada (2.5%) y agar bacteriológico (2%) con quitina coloidal (4%)). El proceso de incubación, se realizó a  $28^{\circ}\text{C}$ . Se hizo lectura cuando se evidencio crecimiento (entre 48-72 horas), donde se realizaron conteos de colonias para luego ser llevada a términos de  $\text{ufc.cm}^2$ . Se realizaron evaluaciones semanales durante 16 semanas. Los tratamientos evaluados fueron:

T1: Mejor sustrato foliar 1 (SF1)

T2: Mejor sustrato foliar 2 (SF2)

T3: SF1 + mezcla fungicida convencional

T4: SF2 + mezcla fungicida convencional

T5: Mezcla fungicida a dosis y frecuencia de aplicación convencional

T0: Testigo (plantas sin control químico)

Los resultados fueron analizados mediante un diseño completamente aleatorio, con 6 tratamientos y 32 repeticiones por tratamiento, siendo cada repetición una caja de Petri, utilizando el software Statistica release 6, aplicando un Modelo Lineal Generalizado (GLM).

### **3.2.6 Determinación del efecto de inductores de resistencia sobre la dinámica de bacterias líticas**

- ***In vitro***

Se seleccionaron tres aislamientos de la colección (10, 33 y 48) y una mezcla de ellos, los cuales fueran diferenciables en los medios de cultivo. Los aislados se activaron en los medios selectivos (agar bacteriológico (2%) con harina de cebada (2.5%) y agar bacteriológico (2%) con quitina coloidal (4%)) por 48 horas. Luego, las colonias que crecieron se llevaron a una solución con agua destilada estéril (utilizando como referencia para la concentración el patrón Mc Farland ( $1.5 \times 10^9$  ufc/mL)). Se prepararon los medios selectivos con los diferentes inductores (Acibenzolar-S Metil y Ácido Salicílico), para ser servidos en cajas de Petri. Se procedió a inocular los medios tratados con 20  $\mu$ L de la solución de los aislados, mediante la técnica de siembra en superficie (asa de vidrio). Los tratamientos evaluados fueron:

T1: Acibenzolar-S Metil 2000 ppm (Asm 20)

T2: Acibenzolar-S Metil 4000 ppm (Asm 40)

T3: Ácido Salicílico 2000 ppm (AS 20)

T4: Ácido Salicílico 4000 ppm (AS 40)

T0: Testigo (medios de cultivo sin inductor)

Se evaluó el crecimiento (expresado en ufc.mL) y formación de halo (0=no halo, 1= halo) de los aislamientos líticos entre a las 48 horas después de la inoculación.

Los resultados fueron analizados mediante un diseño completamente al azar, con 5 tratamientos y 4 repeticiones, siendo cada repetición una caja de Petri, utilizando el software Statistica release 6, aplicando un Modelo Lineal Generalizado (GLM).

- **Bajo cubierta**

Se aplicaron los inductores con bomba de motor, a las mismas concentraciones evaluadas en la fase *in vitro*. Luego de una hora se aplicó una solución compuesta de buffer fosfato y la mezcla de los aislados que se utilizaron en el punto anterior (utilizando como referencia para la concentración el patrón Mc Farland ( $1.5 \times 10^9$  ufc.mL). Se utilizaron 24 plantas para cada tratamiento incluido el testigo que no tuvo aplicación de inductores, pero sí, de la solución de los aislados. Para un total de 120 plantas.

El primer muestreo de las hojas para observar actividad de bacterias líticas se inició 72 horas después de las aplicaciones de inductores y la solución de bacterias. El segundo muestreo fue 72 horas después y así sucesivamente hasta completar 8 muestreos. Se colectaron muestras de la hoja #2 (marcada en cada planta desde el inicio) de 3 plantas de cada tratamiento, cada vez, utilizando plantas diferentes que se aleatorizaron y marcaron desde el inicio del experimento.

El muestreo se llevo a cabo por la metodología descrita por Downes e Ito (2001) en un área de 25 cm<sup>2</sup> de la hoja. Una vez en el laboratorio se realizaron diluciones seriales, de las cuales se sembraron por duplicado en los medios selectivos 20 µL utilizando la técnica de siembra en superficie (asa de vidrio). Se mantuvieron los medios a una temperatura de 28°C por 72 horas, luego de las cuales se realizaron conteos de colonias de bacterias líticas para luego ser llevada a términos de ufc.cm<sup>2</sup>.

Los resultados fueron analizados mediante un diseño completamente al azar, con 5 tratamientos y 96 repeticiones, siendo cada repetición una caja de Petri, utilizando el software Statistica release 6, aplicando un Modelo Lineal Generalizado (GLM).

## 4. Resultados y discusión

### 4.1 Colección de cepas bacterianas líticas

Se procesaron con regularidad muestras de hojas de banano, de fincas comerciales procedentes de la zona bananera de Urabá y del Magdalena. De cada ensayo, se seleccionaron las colonias que evidenciaron un halo de degradación del medio de cultivo alrededor de la colonia, lo cual es indicativo de la actividad lítica del aislamiento, llegando a un total de 102 aislamientos de bacterias. Estos aislados fueron purificados mediante la técnica de repique por agotamiento y se les realizó tinción de Gram. También se registraron características morfológicas, presencia de esporas y color de la colonia con base en la paleta de colores Pantone® (Anexo A). De los 102 aislamientos 80 de ellos fueron parte del proceso de identificación (Tabla 2).

**Tabla 2: Distribución en porcentaje de los diferentes géneros determinados en la identificación de los aislados bacterianos.**

GÉNEROS DETERMINADOS EN LOS AISLADOS	DISTRIBUCIÓN EN PORCENTAJE
<i>Bacillus</i>	72%
<i>Cellulomonas</i>	1%
<i>Cellulosimicrobium</i>	4%
<i>Microbacterium</i>	3%
<i>Streptomyces</i>	2%
<i>Paenibacillus</i>	1%
<i>Enterobacter</i>	1%
<i>Stenotrophomonas</i>	1%
<i>Sphingomonas</i>	1%
<i>Pseudomonas</i>	1%
<i>Staphylococcus</i>	1%
<i>Curtobacterium</i>	5%
<i>Massilia</i>	2%
<i>Arthrobacter</i>	2%
<i>Flavobacterium</i>	1%

Luego de establecer la distribución por géneros de los aislados bacterianos se determinaron las especies bacterianas con mayor grado de homología con las accesiones que se encuentran en el GENE BANK. Para el aislado 1 se encontró similitud con dos diferentes especies de microorganismos: *Cellulomonas* sp. y *Cellulosimicrobium cellulans* (Tabla 3), según lo reportado por Schumann *et al.* en 2001, *Cellulomonas cellulans* fue reclasificado como *Cellulosimicrobium cellulans*, por lo tanto este aislado correspondería a esta última clasificación.

Dentro del género *Bacillus*, el cual fue el más abundante en los aislados analizados, se presentó que, para un mismo aislado, se obtuvieran especies distintas, el caso de mayor relevancia se presentó con los aislados 13, 19, 55, 56, 64, 67, 74, 75, 81, 92, 103, 105, que tenían el mismo porcentaje de homología con *Bacillus cereus* y con *Bacillus thuringiensis*. *B. anthracis*, *B. cereus*, y *B. thuringiensis* son miembros del grupo de bacterias *Bacillus cereus*, por lo cual se encuentran estrechamente relacionados genéticamente, la única forma de diferenciar entre cepas de *B. cereus* y cepas de *B. thuringiensis* es la presencia de los genes codificantes para las toxinas insecticidas de Bt que se encuentran por lo general en plásmidos (Helgason *et al.* 2000). A pesar de esto, el Bergey's Manual of Determinative Bacteriology reconoce la individualidad de estas especies basándose sobre todo en dos características diferenciales: la presencia de la inclusión o cristal parasporal y sus propiedades insecticidas (Sauka y Benintende, 2008).

**Tabla 3: Identificación detallada de los diferentes aislados bacterianos.**

Género		Código del Aislado
<i>Cellulomonas</i>	<i>Cellulomonas</i> sp.	1
<i>Cellulosimicrobium</i>	<i>Cellulosimicrobium cellulans</i>	1, 48, 76
<i>Microbacterium</i>	<i>Microbacterium testaceum</i>	5
	<i>Microbacterium arborescens</i>	48
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	4, 6, 8, 14, 17, 21, 23, 26, 28, 29, 32, 36, 37, 40, 41, 44, 45, 46, 50, 54, 73, 77, 78, 82, 84, 93, 95, 96, 98, 100, 101, 104, 106, 109
	<i>Bacillus vallismortis</i>	57, 88
	<i>Bacillus velezensis</i>	88
	<i>Bacillus aryabhatai</i>	60
	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	8, 53, 57, 58, 60, 77, 78
	<i>Bacillus megaterium</i>	60, 97, 99
	<i>Bacillus pumilus</i>	16, 18, 20, 22, 52, 70
	<i>Bacillus altitudinis</i>	18, 20
	<i>Bacillus safensis</i>	52
	<i>Bacillus cereus</i>	13, 19, 33, 55, 56, 64, 67, 74, 75, 81, 92, 103,

		105
	<i>Bacillus thuringiensis</i>	13, 19, 55, 56, 64, 67, 74, 75, 81, 92, 103, 105
<i>Streptomyces</i>	<i>Streptomyces</i> sp.	10
	<i>Streptomyces griseus</i>	72
<i>Paenibacillus</i>	<i>Paenibacillus</i> sp.	38
<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter hormaechei</i>	59
<i>Stenotrophomonas</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	108
<i>Sphingomonas</i>	<i>Sphingomonas yabuuchiae</i>	107
<i>Pseudomonas</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	51
<i>Staphylococcus</i>	<i>Staphylococcus warneri</i>	68
<i>Curtobacterium</i>	<i>Curtobacterium citreum</i>	74, 86, 102
	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	71, 102
<i>Massilia</i>	<i>Massilia</i> sp.	79, 80
<i>Arthrobacter</i>	<i>Arthrobacter</i> sp.	89, 90
<i>Flavobacterium</i>	<i>Flavobacterium oceanosedimentum</i>	74

A pesar de que la secuenciación de la región del ADN ribosomal 16S ha sido muy útil para identificar cepas bacterianas, esta presenta limitaciones cuando las diferencias genéticas son muy pequeñas entre microorganismos emparentados filogenéticamente (Torres y Angel, 2010).

El análisis genómico ha demostrado recientemente que una fracción de los genomas de especies bacterianas (con frecuencia un 5% -15%) proviene de otras especies debido a la transferencia de segmentos, incluidos los elementos de transposición, plásmidos o fagos (Majewski and Cohan 1999; Ochman et al. 2000). Esta observación pone de relieve la importancia del intercambio genético en bacterias, dando lugar a profundas diferencias entre ellas y los organismos eucariotas altamente sexuales (animales y plantas), que suelen ser la base de los conceptos de las especies actuales. A pesar de los eucariotas son sistemas genéticamente cerrados, las bacterias están abiertas a la transferencia de genes de otros organismos como especies distantes relacionadas. Por lo tanto, mientras que las plantas y los animales deben evolucionar a partir exclusivamente de su propio material genético, cada especie bacteriana puede tomar hasta adaptaciones existentes de una gran diversidad de otras especies (Cohan, 2002).

Por esta razón se hace necesario en algunos casos complementar la información obtenida con otro tipo de marcadores moleculares como el análisis del gen de la Gyrasa  $\alpha$  y  $\beta$ , región interespaciadora ADN<sub>r</sub> 16-23S y el uso de fingerprinting de ADN, cuando este último sea posible de realizar (Torres y Angel, 2010).

Las bacterias formadoras de esporas como los *Bacillus*, también presentan variaciones en características como utilización de nutrientes, movilidad y condiciones fisicoquímicas óptimas de crecimiento (McSpadden, 2004). Variaciones cuantitativas y cualitativas de estas características llevan a que estas bacterias habiten diversos nichos en los agroecosistemas. En el trabajo realizado por Arias. *et al.* (1999), se reporta que *B. pumilus* y *B. subtilis* son las bacterias cultivables más abundantes a partir de la filósfera de soya.

Se destaca la especie *B. subtilis*, considerada entre las de mayor actividad en el control biológico de enfermedades de origen fúngico y bacteriano (Fernández-Larrea, 2001). Entre los mecanismos que utilizan para el biocontrol se encuentran la antibiosis directa a través de la excreción de sustancias con actividad biocida, tales como subtilisina, iturinas y polimixinas (Rahman *et al.* 2006). La abundancia de las cepas inoculadas de *Bacillus* pueden fluctuar, pero generalmente disminuye en el tiempo, especialmente cuando se aplica a concentraciones más altas que las poblaciones nativas (McSpadden, 2004).

Reconocidas las ventajas de algunas de las especies pertenecientes al género *Bacillus* por la contribución que realizan al crecimiento y la bioprotección de especies vegetales, *B. thuringiensis* sigue siendo la especie más utilizada en la producción de formulados biológicos, destinados al control de insectos plaga.

Se ha observado que las bacterias más abundantes en las hojas son las pigmentadas (e.j. *Methylobacterium mesophilicum*, *Pseudomonas syringae*), a las cuales se les ha atribuido una mejor adaptación a los rayos solares (Sundin y Jacobs, 1999; Hirano y Upper, 2000).

#### **4.2 Dinámica poblacional de bacterias líticas por acción de sustratos a nivel *in vitro***

Se evaluaron 18 tratamientos a nivel de laboratorio, para determinar cuál de estos permitía un mayor desarrollo bacteriano, entendido como el incremento en el número de unidades formadoras de colonias (ufc), usando las cepas 10Q, 33G, 48G y una mezcla de estas (Mix), las cuales, además de poseer actividad lítica, eran diferentes en cuanto a pigmentación y tinción de Gram, lo que permitía una diferenciación a nivel visual.

Como criterio de selección de los cinco tratamientos que pasaron a la fase bajo cubierta, se optó por aquellos que incrementaron significativamente en mayor nivel las poblaciones líticas de las bacterias evaluadas en mezcla (Mix), dado que bajo cubierta y en parcelas experimentales, se espera estar presente ante una mezcla de poblaciones líticas nativas de la filósfera de banano.

Del análisis estadístico se obtuvo diferencias altamente significativas de la variable respuesta (ufc.mL) de los tratamientos 12 y 13 con respecto al testigo (agua) y los demás tratamientos, al evaluar la mezcla de bacterias líticas (Mix) (Gráfico 1 y Anexo C).

Los sustratos que permitieron en orden un mayor recuento de ufc.mL corresponden a los siguientes tratamientos:

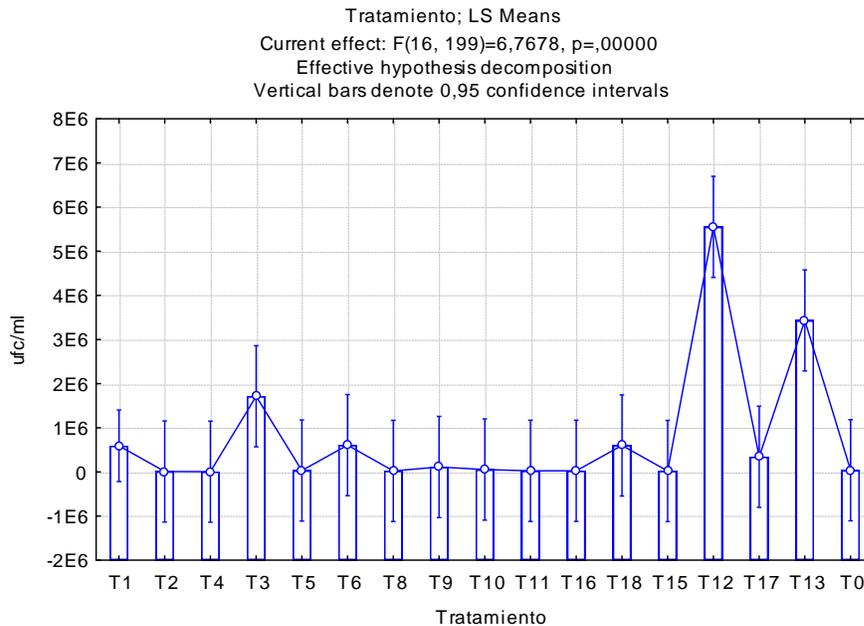
T12: SMB + Q + ÚREA + NEOFAT, que obtuvo un recuento promedio de  $555 \times 10^4$  ufc.mL que corresponde a un incremento de 144 veces por encima del tratamiento testigo (agua) que obtuvo un recuento promedio de  $383 \times 10^2$ .

T13: SMB + HC + ÚREA + NEOFAT, que obtuvo un recuento promedio de  $443 \times 10^4$  ufc.mL, que corresponde a un incremento de 115 veces por encima del tratamiento testigo.

T1: SMB + Q, que obtuvo un recuento promedio de  $250 \times 10^4$  ufc.mL, que corresponde a un incremento de 65 veces por encima del tratamiento testigo.

T3: SMB + ÚREA, que obtuvo un recuento promedio de  $171 \times 10^4$  ufc.mL, que corresponde a un incremento de 44 veces por encima del tratamiento testigo.

Debido a que los mejores tratamientos para la mezcla de cepas incluían harina de cebada, quitina, urea y Neofat se decidió incluir un tratamiento adicional, que contiene todos estos componentes codificado como BF+HC+QC+U+N.



**Gráfico 1: Efecto de los sustratos foliares sobre la dinámica de crecimiento *in vitro* de la mezcla de cepas.**

### 4.3 Dinámica poblacional de bacterias nativas líticas por acción de sustratos aplicados bajo cubierta

Se compararon las medias de las poblaciones de bacterias quitinolíticas y gluconolíticas con el control (sin aplicación).

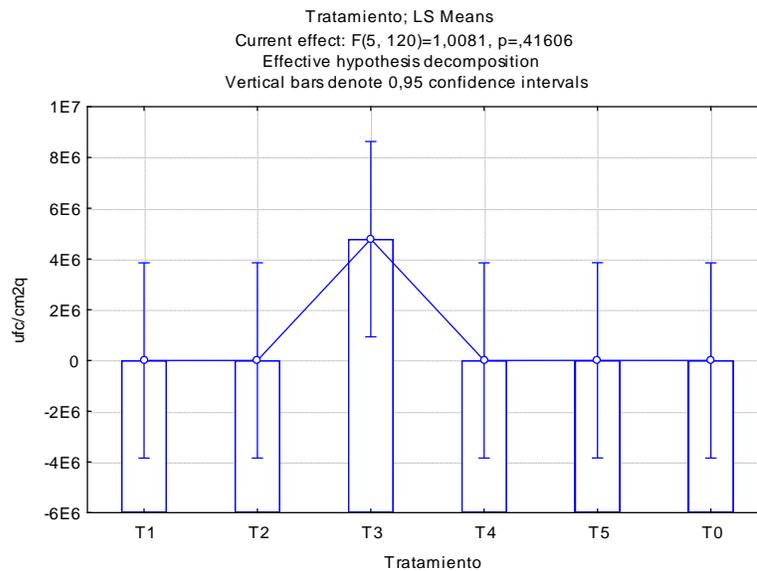
Los sustratos que permitieron un mayor incremento de las poblaciones quitinolíticas en orden corresponden a los tratamientos:

T3: SMB + HC + ÚREA + NEOFAT, con un recuento promedio  $478 \times 10^4$  ufc.cm<sup>2</sup> correspondiente a un incremento de 13602543 veces por encima del tratamiento testigo que obtuvo un recuento promedio de 3,524 ufc.cm<sup>2</sup>.

T5: BUFFER + HC + Q + ÚREA + NEOFAT, con un recuento promedio 3809,857 ufc.cm<sup>2</sup>, correspondiente a un incremento de 1082 veces por encima del tratamiento testigo.

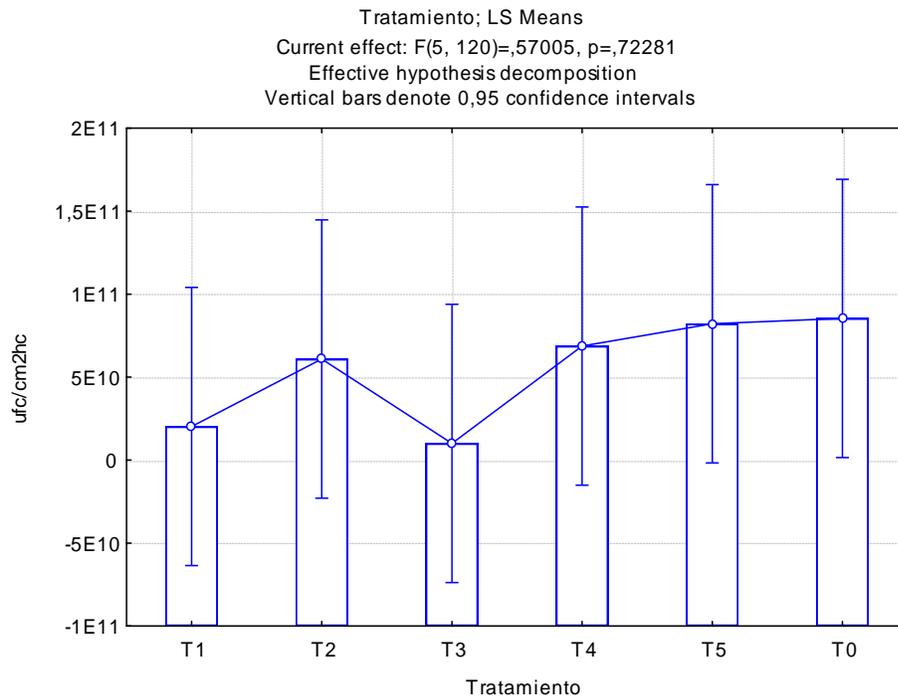
En los resultados anteriores, el hecho de que un sustrato que tuvo como componente la harina de cebada como fuente de glucano, haya promovido la población de bacterias quitinolíticas, no es considerado como irregular. Salazar (2005), en el estudio de la filósfera de las musáceas, encontró también que los glucanos fueron utilizados como fuente de carbono por las bacterias quitinolíticas.

No se presentaron diferencias estadísticas de los tratamientos con respecto al testigo y entre ellos (Gráfico 2). Se seleccionaron aquellos tratamientos que presentaron mayores promedios de recuentos poblacionales de las bacterias de interés, los cuales corresponden al tratamiento T3 y al tratamiento T5 (Anexo D).



**Gráfico 2: Efecto de los sustratos foliares sobre la dinámica de poblacional de bacterias quitinolíticas nativas de la filósfera en plantas bajo cubierta (casa de mallas).**

Con respecto a las bacterias glucanólíticas, se encontró que no hay diferencias entre los tratamientos y el testigo (Gráfico 3). El tratamiento que aumento en promedio la variable ufc/cm<sup>2</sup>, después del testigo fue el tratamiento T5 (recuento promedio de 821 x 10<sup>8</sup> ufc.cm<sup>2</sup>) (Anexo E).



**Gráfico 3: Efecto de los sustratos foliares sobre la dinámica de poblacional de bacterias glucanoliticas nativas de la filósfera en plantas bajo cubierta (casa de mallas).**

Con base en los resultados anteriores se decidió proyectar para la fase de evaluación en parcelas experimentales los tratamientos T3 y T5.

Al proponer los diferentes tratamientos a evaluar en el proyecto, se consideró el uso del coadyuvante convencionalmente utilizado por la cadena de banano (Triton X-100); sin embargo por restricciones posteriores de los importadores de la fruta agrupados en Global Gap, no se permitió a los productores bananeros continuar con el uso de Triton X-100, por lo cual se optó por el coadyuvante Pegal ® actualmente utilizado por la cadena de banano de exportación, al ser un producto aceptado por Global Gap. Sin embargo en trabajo realizado de forma paralela, se encontró que este producto generaba una alta reducción en las poblaciones de las bacterias de interés, mientras que Neofat, un coadyuvante usado en estrategias de control biológico en el país, no generaba este efecto inhibitorio (Correa, 2008).

Los resultados obtenidos mostraron fluctuaciones de la concentración de las poblaciones bacterianas en los diferentes momentos de muestreo, así como diferencias entre plantas sometidas bajo el mismo tratamiento y en un mismo momento, a pesar de realizar los muestreos en un mismo punto de la hoja (tercio apical derecho de la hoja 2). Esto está en concordancia con reportes que indican que las bacterias no se ubican siguiendo un patrón a través de la superficie de la hoja (Leben, 1988 y Weller y Saettler, 1980 citados por Beattie y Lindow, 1999). Sin embargo se indica que estas están localizadas en sitios particulares, como base de tricomas, estomas, uniones de la pared celular de células epidérmicas, especialmente en los surcos a lo largo de las venas, también en depresiones de la cutícula, debajo de la cutícula, cerca de los hidátodos, reportados como sitios donde encuentran mayor protección de las condiciones ambientales y mayor humedad (Beattie y Lindow, 1999), en forma de agregados bacterianos.

Los sustratos fueron aplicados en el haz de la hoja simulando el tipo de aplicación comercial, aunque se ha reportado que muchas bacterias se ubican en el envés, relacionado esto con una mayor densidad de estomas o tricomas o una capa cuticular más delgada, aunque en el haz también se encuentran estos sitios de protección (Beattie y Lindow, 1999). Por su parte, las esporas de *M. fijiensis* germinan sobre el envés de las hojas y la aparición y desarrollo de estrías tiene lugar en el haz (Meredith y Lawrence, 1969 citado por Osorio, 2003).

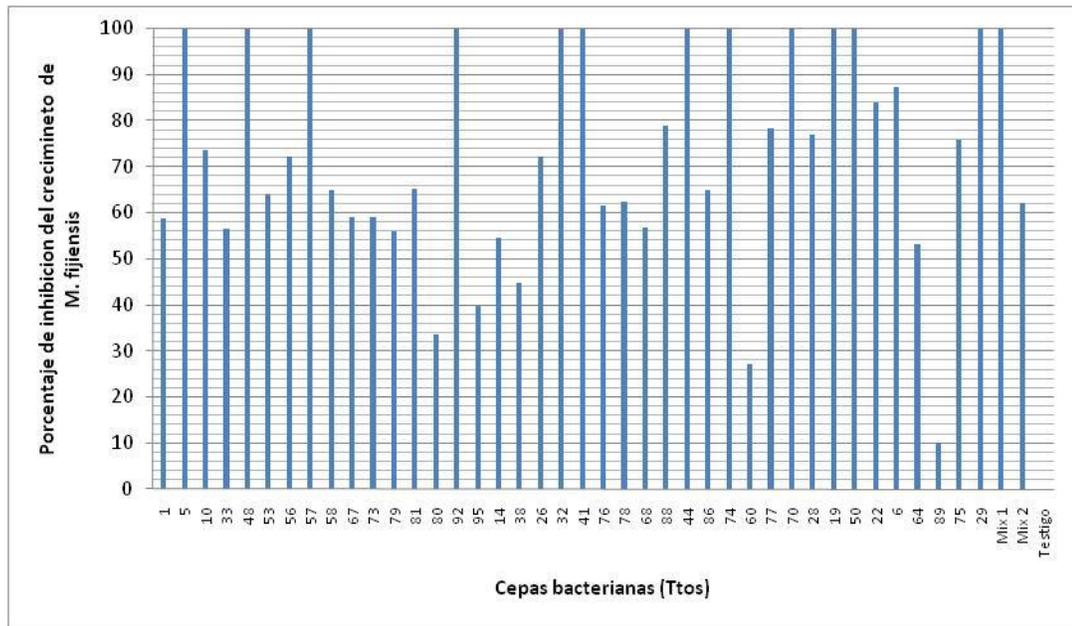
Las diferencias cuantitativas en abundancia de bacterias en sitios muy próximos, puede ser importante. Andrews (1991), notó que poblaciones bacterianas variaban en más de 100 veces, en segmentos pequeños ( $9 \text{ mm}^2$ ) de hoja de papa y que la variación entre los segmentos eran mejor descritos por una distribución log-normal (Hirano *et al.* 1982), así como la variación en el tamaño poblacional bacteriano a pequeña escala. Es por esto que los datos se analizaron y graficaron siguiendo esta distribución.

#### **4.4 Antagonismo y compatibilidad de *Mycosphaerella fijiensis* con las bacterias líticas**

##### **4.4.1 Antagonismo**

Los aislados 1, 10, 14, 19, 22, 26, 28, 29, 32, 33, 38, 41, 44, 48, 5, 50, 53, 56, 57, 58, 6, 60, 64, 67, 68, 70, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 86, 88, 89, 92 y 95 y las mezclas de ellos (Mix 1: 5,10,33 y 48 y Mix 2: 38, 68, 74 y 56 ) evaluados en medios sólidos, afectaron en algún grado la germinación de *M. fijiensis*, con porcentajes que van desde 33% de inhibición hasta el 100%. Se encontró que 13 de los 40 aislados presentaron una inhibición de la germinación del 100% (Gráfico 4), al igual que Osorio (2003), que encontró cepas que afectaron en un 100% las ascosporas, ya sea inhibiendo la germinación o causando deformación de los tubos germinativos.

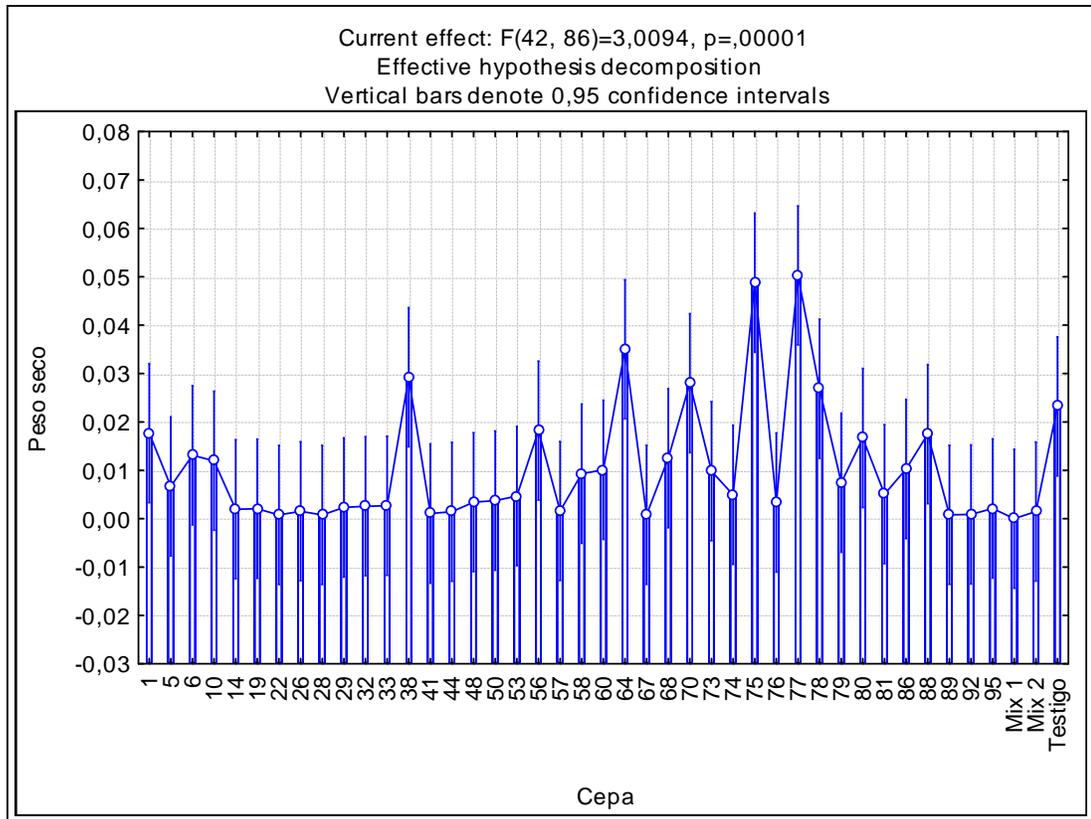
Los aislados que presentaron el mayor porcentaje de inhibición (100%) fueron los codificados como: 5, 48, 57, 92, 32, 41, 44, 70, 74, 19, 50, 29 y el Mix 1 (5, 10, 33 y 48).



**Gráfico 4: Efecto de las bacterias líticas sobre el porcentaje de inhibición de *Mycosphaerella fijiensis*.**

En cuanto al crecimiento de *M. fijiensis* bajo la acción de las bacterias líticas en medios líquidos se obtuvo que algunos aislados favorecieron al hongo (peso seco) debido a que mostraron valores mas altos que el testigo, quién no estaba influenciado por ningun aislado (Gráfico 5). Dichos aislados son los codificados como 75, 77, 64 y 38. Los demás aislados no favorecieron al hongo y por el contrario disminuyeron su crecimiento y en mezcla ejercieron un efecto antifúngico bajo las condiciones evaluadas.

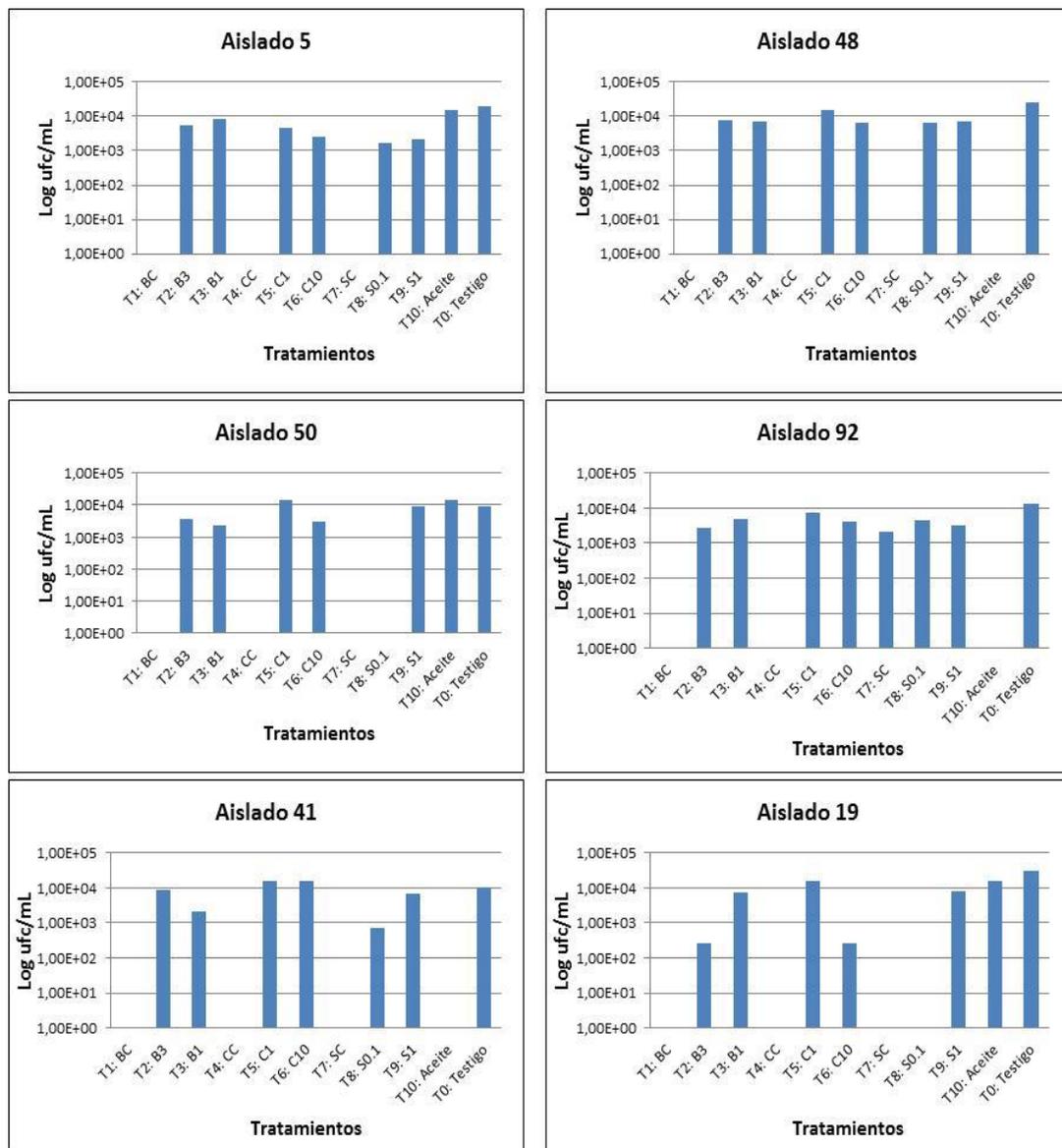
Los aislados que presentaron un efecto antagónico bajo las dos metodologías utilizadas corresponden en su mayoría al género *Bacillus* (ciertas cepas están involucradas en la inducción de resistencia natural de las plantas), dos al género *Microbacterium*, y tres restantes a los géneros *Streptomyces* (algunas especies se caracterizan por la producción de antibióticos de amplio espectro, que las bacterias producen naturalmente para eliminar o inhibir el crecimiento de otros microorganismos), *Flavobacterium* y *Staphylococcus*.



**Gráfico 5: Efecto de las bacterias líticas sobre el peso seco (g) de *Mycosphaerella fijiensis*.**

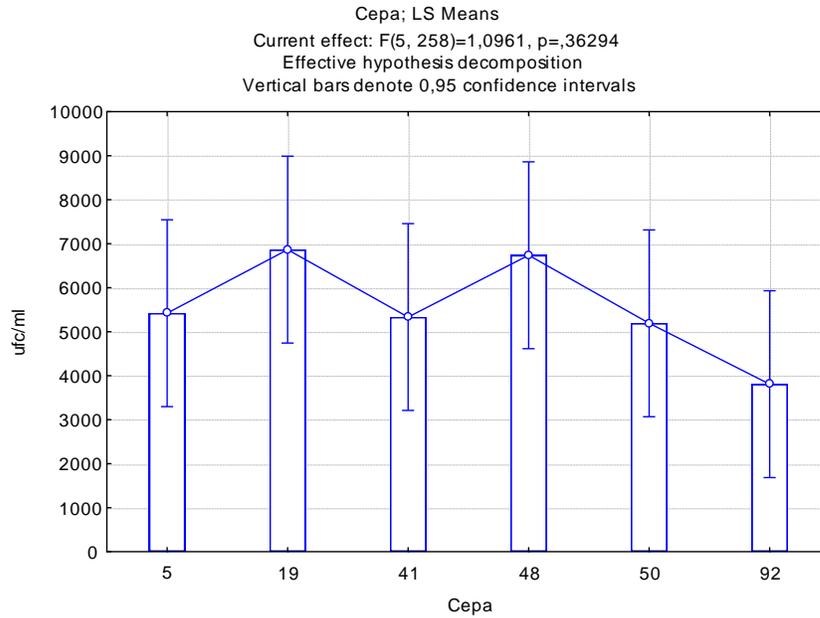
#### 4.4.2 Compatibilidad

La compatibilidad fue evaluada a nivel *in vitro* con los aislados bacterianos 5, 19, 48, 41, 50 y 92; seleccionados por obtener el mejor comportamiento en las pruebas de antagonismo, además de ser diferentes por morfología y sitio de aislamiento. Para este caso es claro que las bacterias no crecen a concentraciones comerciales de los diferentes productos. A concentraciones experimentales con las cuales algunos laboratorios llevan a cabo monitoreos de sensibilidad, entre otras pruebas, las bacterias líticas si crecen pero mostrando valores similares o inferiores al tratamiento testigo sin diferencia estadística (Gráfico 6 y 7).



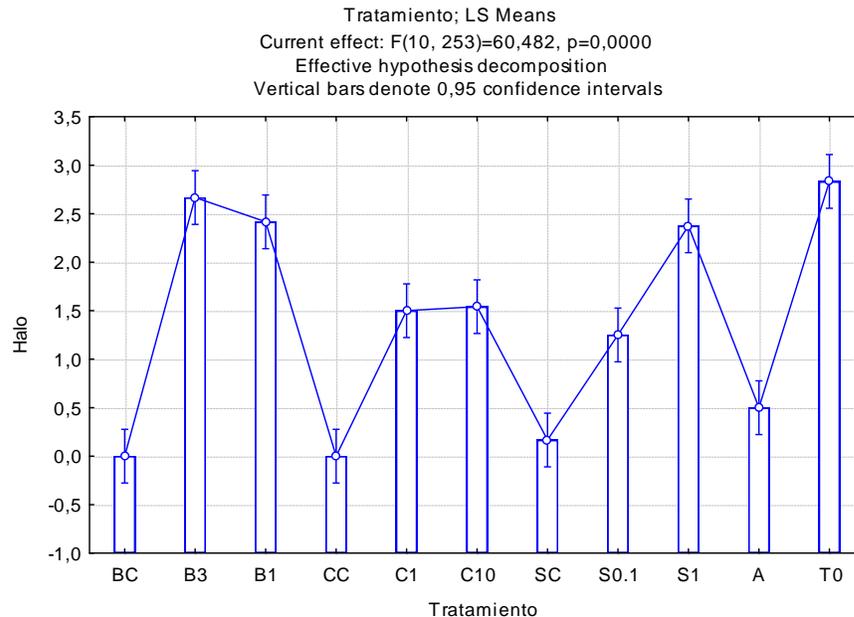
**Gráfico 6: Compatibilidad de los aislados bacterianos líticos 5, 48, 50, 92, 41 y 19 con la mezcla fungicida y el aceite mineral.**

El aislado codificado como 19, perteneciente al género *Bacillus*, es el que muestra mayor recuento de bacterias (6864 ufc.mL) bajo la acción de los diferentes fungicidas y el aceite. Dicho aislamiento puede encontrarse adaptado a las condiciones de la hoja y entre ellas a la aplicación constante de fungicidas lo que concuerda con Blakeman y Fokkema (1982) que sugieren que en la hoja se presenta un aumento de bacterias nativas con alto grado de resistencia a los fungicidas. Los resultados concuerdan con Osorio (2003) y González (2005) quienes encontraron compatibilidad de cepas bacterianas con los diferentes productos que hacen parte de la mezcla de fungicidas.



**Gráfico 7: Efecto de la mezcla fungicida y aceite mineral sobre la variable ufc.mL de los aislados bacterianos líticos 5, 48, 50, 92, 41 y 19.**

Para la variable presencia o no de halo de formación de consumo sobre los medios de cultivo de las bacterias líticas, bajo el efecto de los fungicidas y el aceite mineral, se obtuvo que el tratamiento que favoreció en mayor medida tal variable después del testigo, sin diferencia estadística fue T2 (Bravonil 3 ppm(B3)) (Gráfico 8).



**Gráfico 8: Efecto de la mezcla fungicida y aceite mineral sobre la variable halo de los aislados bacterianos líticos.**

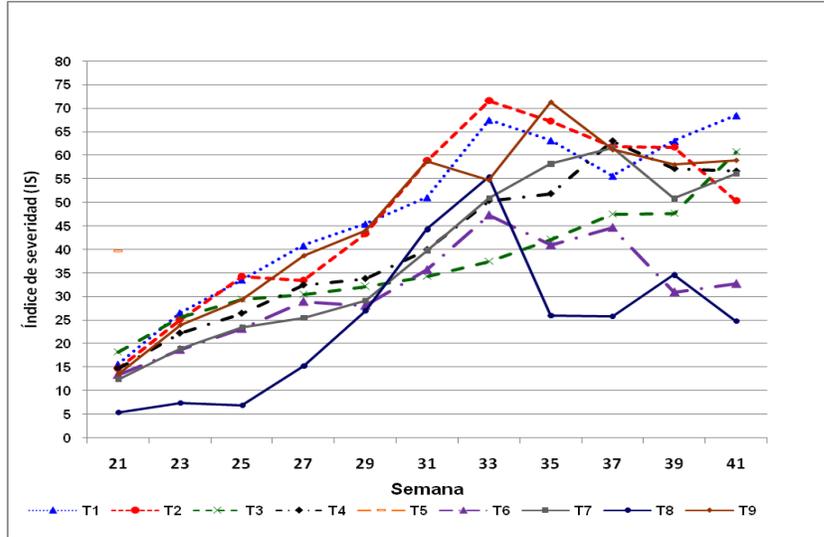
#### 4.5 Relación de la dinámica poblacional de bacterias líticas con la severidad de la enfermedad en parcelas experimentales

Los tratamientos propuestos para esta actividad fueron evaluados por su estabilidad en mezcla, la cual se mantuvo por un tiempo mínimo de 1 hora, parámetro utilizado convencionalmente por las compañías encargadas del control aéreo de Sigatoka Negra, dado que se considera que la mezcla convencional debe tener una estabilidad de, al menos 1 hora, ya que este es el tiempo máximo estimado entre el despegue de la avioneta y su aplicación en las fincas comerciales.

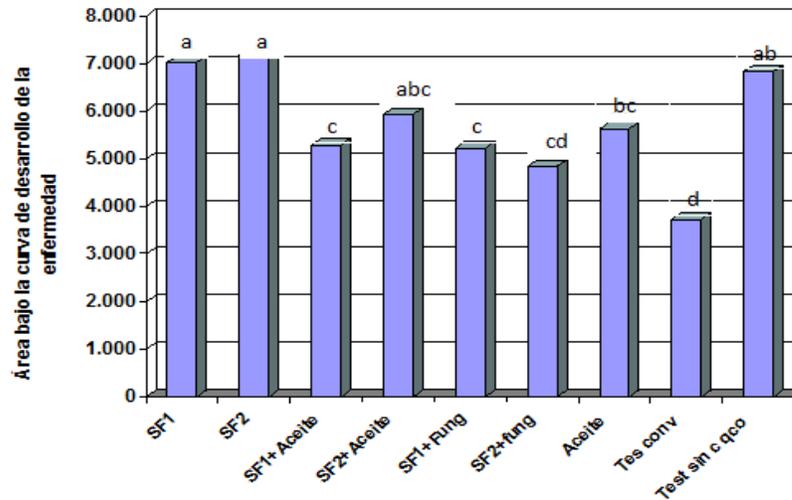
La compatibilidad de los dos sustratos (T1: SF1 (SMB + HC + ÚREA + NEOFAT) y T2: SF2 (BUFFER + HC + Q + ÚREA + NEOFAT)) seleccionados de la evaluación bajo casa de mallas con aceite mineral y mezcla fungicida, luego de conocer la estabilidad de mezcla necesaria en el control convencional, se confrontó aplicando los tratamientos en las plantas de banano para conocer su efecto sobre el desarrollo de la planta y no se encontró en condiciones de campo problemas de fitotoxicidad.

**4.5.1 Efecto de los sustratos foliares sobre el desarrollo de la Sigatoka negra.**

En cuanto al nivel de control de enfermedad ambos sustratos solos presentan un nivel de enfermedad sin diferencia significativa al testigo sin control químico (Gráficos 9 y 10), lo que indica que los sustratos para tener mejor respuesta deben ir en mezcla o rotación con otros compuestos o medidas de control. Los tratamientos que redujeron en forma significativa la enfermedad fueron aquellos que se encontraban en mezcla con fungicidas y el tratamiento que contenía el SF1 en mezcla con aceite, este último mostró una respuesta de reducción de enfermedad del 22,6%.



**Gráfico 9: Índice de severidad para la evaluación de los sustratos foliares en parcelas lineales (condiciones de campo).**



**Gráfico 10: Área bajo la curva de desarrollo de la Sigatoka negra para el efecto de los sustratos foliares, en condiciones de campo. Tratamientos con letras diferentes indican diferencia significativa, según la prueba de Tukey (P < 0,05).**

El uso de sustratos foliares para el control de patógenos foliares, debe ser una alternativa que se integre con otras estrategias de control como el uso de fungicidas de síntesis química.

En los países latinoamericanos, algunos agricultores tienen la costumbre de aplicar soluciones de leche al follaje para disminuir la presencia de infección por virus. En Japón, también se usa esta práctica para evitar la dispersión en los invernaderos de esporas de hongos como *Botrytis* spp. y *Cladosporium* spp (Okumoto y Bustamante, 1993). En la década de los noventa se inicia la publicación de investigaciones sobre las aplicaciones a la filósfera de bacterias y sustratos con base en leche, quitina, con el fin de controlar patógenos foliares en maní y tomate (Kokalis- Burelle *et al.* 1992; Okumoto y Bustamante, 1993).

En condiciones de campo, Arango (2002) encontró, en plantaciones experimentales de banano en Costa Rica, que sustratos compuestos de leche, melaza y quitina, y de glucano, melaza y nitrato de calcio, alternados con fungicidas convencionales, permitieron reducir en un 40% el número de aplicaciones de estos. Esta investigación constituyó uno de los primeros reportes sobre la eficacia y viabilidad económica de la aplicación de sustratos foliares alternados con fungicidas sintéticos para el manejo de la Sigatoka negra.

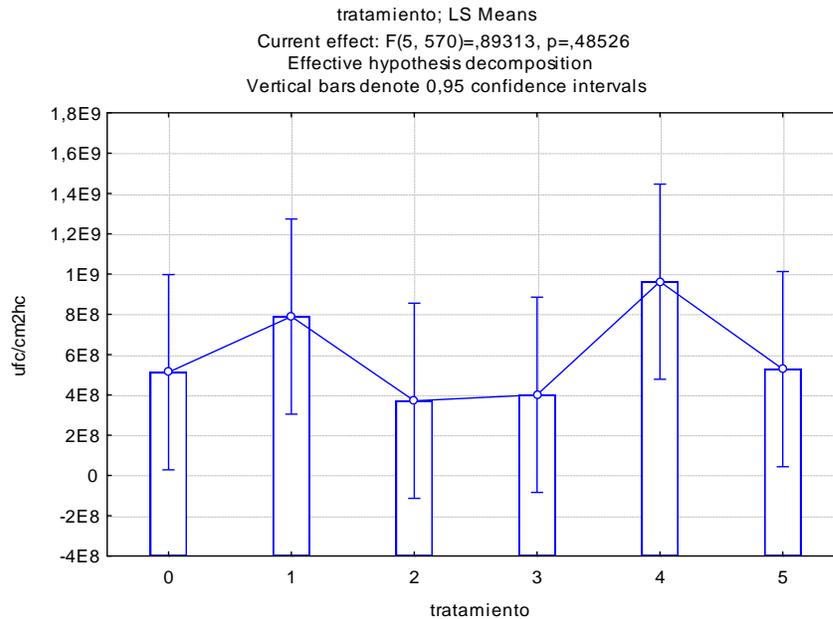
El empleo de la harina de cebada como fuente de glucanos, presentó como ventajas adicionales su bajo costo económico y fácil obtención, con respecto a los altos costos y laboriosa preparación de la quitina coloidal, empleada en estudios previos (Arango, 2001; Salazar *et al.* 2006; Patiño *et al.* 2006). No obstante, ajustes al proceso de obtención de quitina a partir de conchas de crustáceos, como son los camarones, pueden hacer más económica la disponibilidad de este compuesto.

Con los resultados anteriores llevados a las condiciones de campo, la aplicación de sustratos foliares con base en quitina coloidal, harina de cebada como fuente de glucano, urea y una solución mineral base, mostraron una reducción entre un 43 y 46% en el número de ciclos de fungicidas convencionales, al ser aplicados en rotación con estos últimos, con relación al sistema convencional basado en la aplicación de fungicidas (Patiño *et al.* 2006).

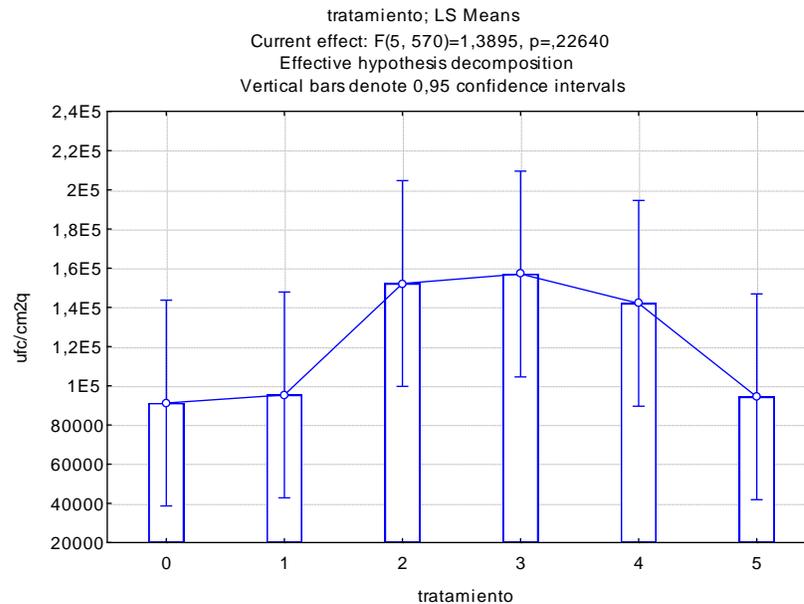
#### **4.5.2 Relación de la Sigatoka negra con la dinámica poblacional de bacterias líticas**

En los gráficos 11 y 12, se observa que la dinámica poblacional de bacterias glucanolíticas y quitinolíticas no se ve afectada significativamente por ninguno de los tratamientos al compararse entre ellos y el testigo (T0). Al observar datos promedios, se refleja que cuando hay más control de la enfermedad, en este caso, por la acción de la mezcla fungicida, los niveles poblacionales de bacterias líticas se ven afectados

notoriamente, como lo es el caso del T5 (Gráficos 13 y 14). Con respecto a lo anterior el tratamiento T4 es el que combina niveles poblacionales de bacterias líticas menos alterados en número con un buen control de la enfermedad sin llegar a afectar la salud de la planta como si se podría hacer si se optara por no realizar control con ninguna estrategia o con los sustratos solos para las condiciones evaluadas.



**Gráfico 11: Dinámica poblacional de bacterias glucanólíticas con el desarrollo de Sigatoka negra por acción de sustratos foliares solos y en mezcla con aceite y fungicidas.**



**Gráfico 12: Dinámica poblacional de bacterias quitinolíticas con el desarrollo de Sigatoka negra por acción de sustratos foliares solos y en mezcla con aceite y fungicidas.**

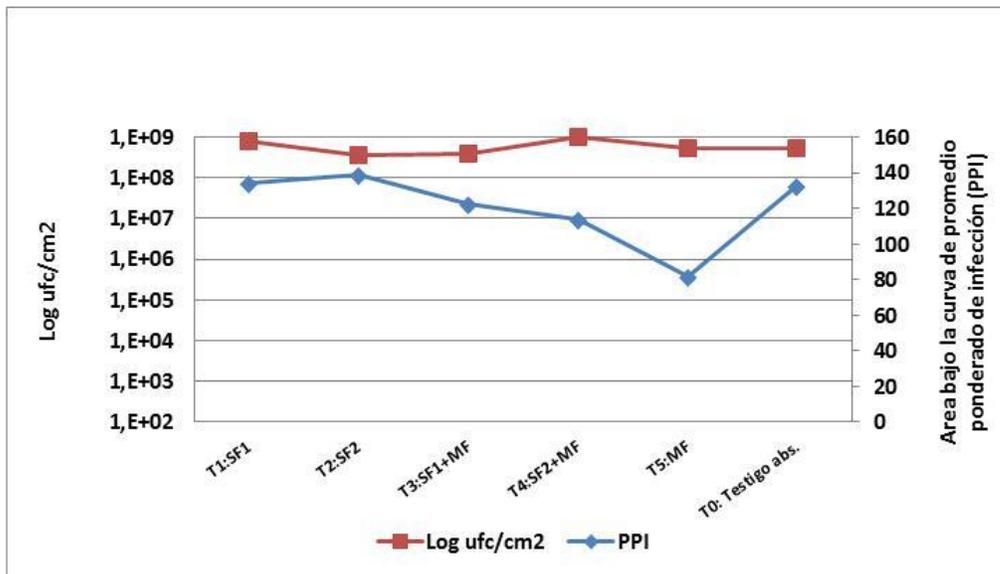


Gráfico 13: Relación de la dinámica poblacional de bacterias glucanolíticas con el desarrollo de Sigatoka negra por acción de sustratos foliares solos y en mezcla con aceite y fungicidas

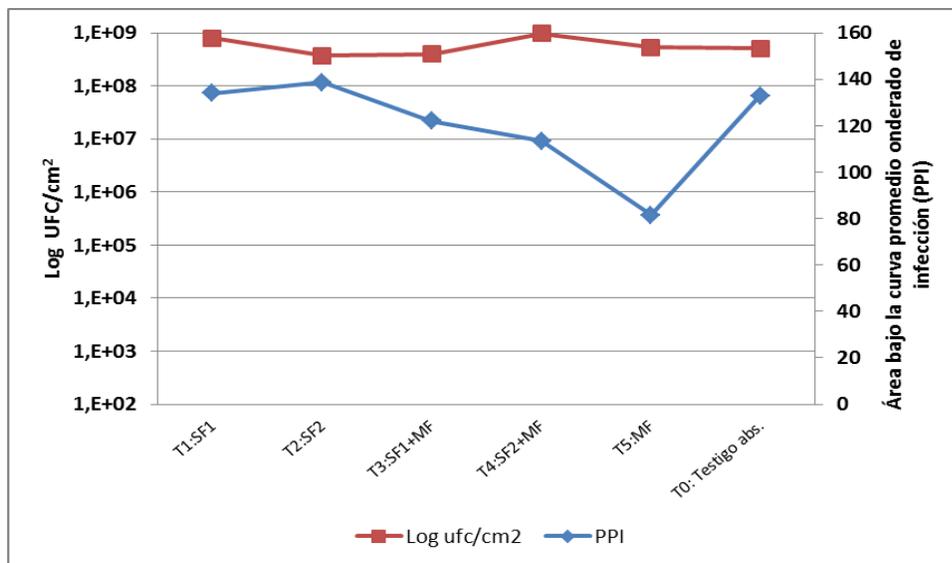


Gráfico 14: Relación de la dinámica poblacional de bacterias quitinolíticas con el desarrollo de Sigatoka negra por acción de sustratos foliares solos y en mezcla con aceite y fungicidas

Chet (1987), demostró en plantas de centeno que el uso de benomil causaba la pérdida de más del 85% de la microflora de la hoja. El uso de fungicidas en café es otro ejemplo claro del impacto de estos agroquímicos sobre las poblaciones de la microflora de la

superficie foliar. La enfermedad de este cultivo, conocida como “coffee berry disease” (CBD) (*Colletotrichum kahawae* Waller & Bridge) se presenta después de la aplicación de fungicidas cúpricos debido a la destrucción de la microflora en hojas tallo y cerezas (Furtado, 1969). Otro caso lo registra Kairu *et al.* (1984) quienes presentan el efecto iatrogénico de la aplicación de captafol, usado para el control de CBD, el cual exacerbó el tizón bacterial del cultivo causado por *Pseudomonas syringae* pv. *garcae* (Amaral *et al.* 1956; Young *et al.* 1978).

Las poblaciones nativas de microorganismos de la filósfera pueden verse afectados por la aplicación continua de productos químicos, por las condiciones de la planta y por otros microorganismos aplicados de forma controlada, entre otros factores. Es por ello que los sustratos foliares permiten favorecer microorganismos con actividades metabólicas particulares, por ejemplo, las poblaciones principales de la filósfera de algunos pinos son más eficientes en la utilización de azúcares y alcoholes como fuente de carbono que la poblaciones bacterianas que viven en las capas del mantillo y que presentan una mayor actividad lipolítica y proteolítica (Atlas y Bartha, 2002).

Aunque muchos microorganismos se utilizan en control biológico de fitopatógenos, *Bacillus* spp., *Trichoderma* spp. y *Pseudomonas* spp., son los que más investigación y desarrollo han recibido. En la actualidad se dispone comercialmente de varios biofungicidas para controlar enfermedades foliares, dentro de los cuales se cuenta con una formulación basada en la cepa de *B. subtilis* QST 713; sin embargo, investigaciones sobre la ecología de los epífitos de la hoja y las posibilidades de mezclas, buscan la estabilidad de los biocontroladores (Guetsky *et al.*, 2001). Adicionalmente se estudia la integración con otras prácticas culturales del cultivo y fungicidas de síntesis (Arango, 2001; Buck, 2004; Jacobsen *et al.*, 2004).

#### **4.6 Dinámica poblacional de bacterias líticas por efecto de inductores de resistencia.**

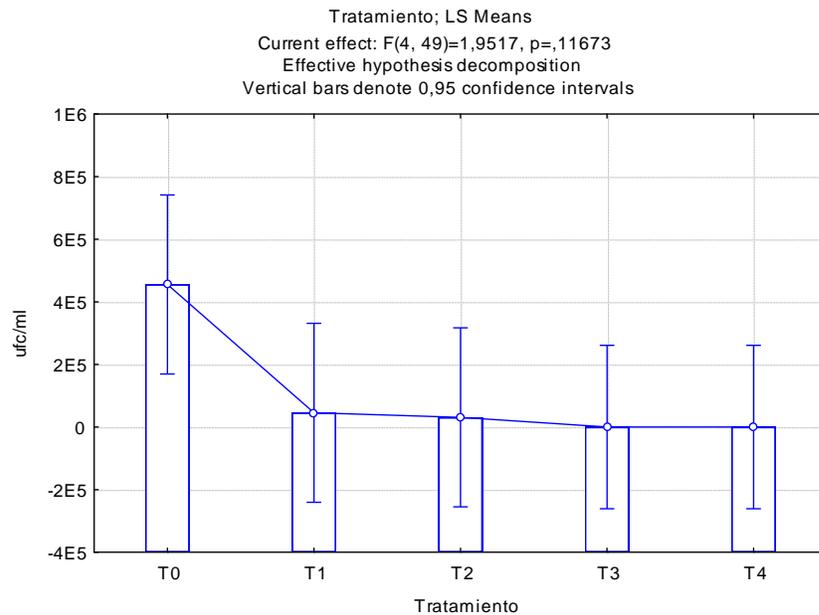
##### **4.6.1 *In vitro***

Se evaluó el potencial lítico de una mezcla de 3 aislados bacterianos de la colección (10Q, 33G, 48G) previamente tipificados como líticos, sobre medios de cultivo con harina de cebada y quitina coloidal y concentraciones de Ácido Salicílico (AS) (2000 y 4000 ppm) y Acibenzolar-S Metil (ASM) (2000 y 4000 ppm).

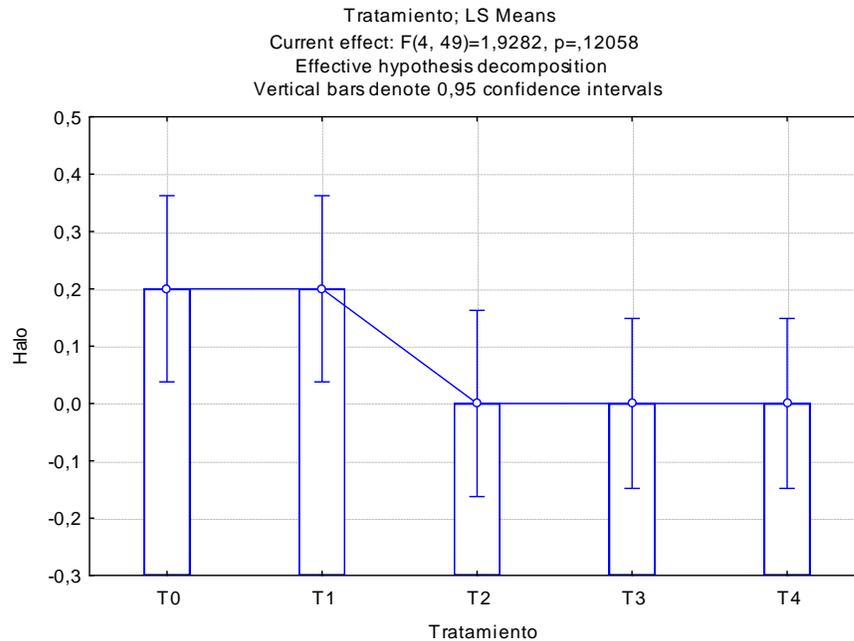
En la evaluación no se observaron diferencias significativas entre tratamientos. En cuanto a los valores promedio, se obtuvo que para AS en sus dos concentraciones, hubo una inhibición del crecimiento de las bacterias sembradas, que representan en el gráfico valores negativos (Gráfico 15).

Para el caso de ASM, en ambas concentraciones, se observó un crecimiento menor al tratamiento sin inductor para los tratamientos T1 y T2, y a pesar de que los tratamientos T3 y T4, presentaron una media de 0, posiblemente la alta varianza de estos tratamientos no permitió detectar significancia con respecto al tratamiento testigo; no obstante la

expresión de halo de consumo solo fue evidente en la concentración de 2000 ppm; mientras que en la concentración de 4000 ppm (Gráfico 16), la coloración del medio debida a la mayor concentración del producto cuya apariencia es amarilla viscosa, impidió observar bajo la metodología planteada la formación de halo de consumo, planteando dos posibilidades: i) que la concentración de ASM inhibe la capacidad lítica o ii) que si hay actividad lítica pero no fue detectable con la metodología propuesta. Sin embargo, existen otras metodologías para detectar la actividad lítica en medios con esta concentración de ASM, para tener en cuenta en futuras investigaciones.



**Gráfico 15: Evaluación *in vitro* del efecto de inductores de resistencia sobre la variable ufc.mL de la mezcla de aislados bacterianos.**

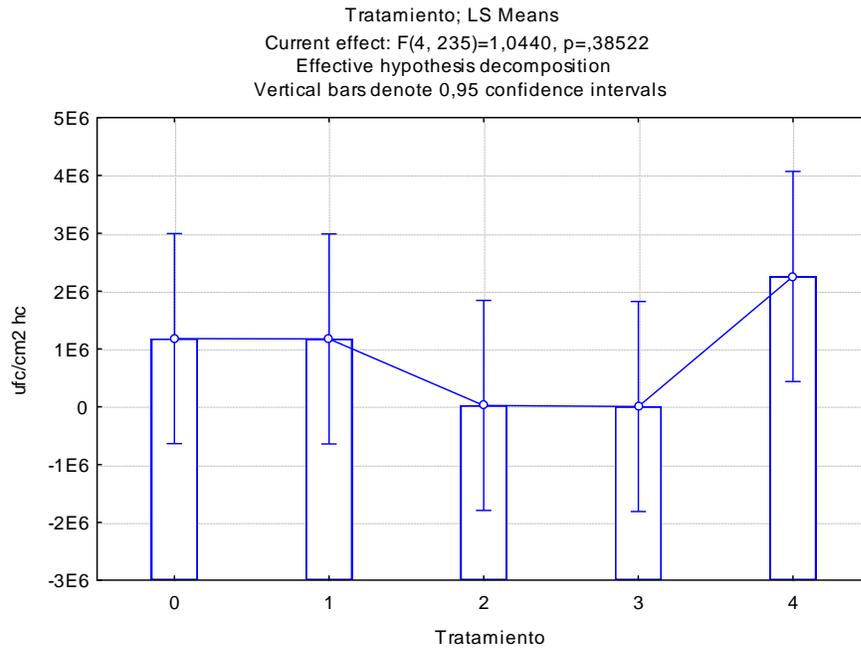


**Gráfico 16: Evaluación *in vitro* del efecto de inductores de resistencia sobre el halo de consumo de aislados bacterianos.**

#### 4.6.2 Bajo cubierta

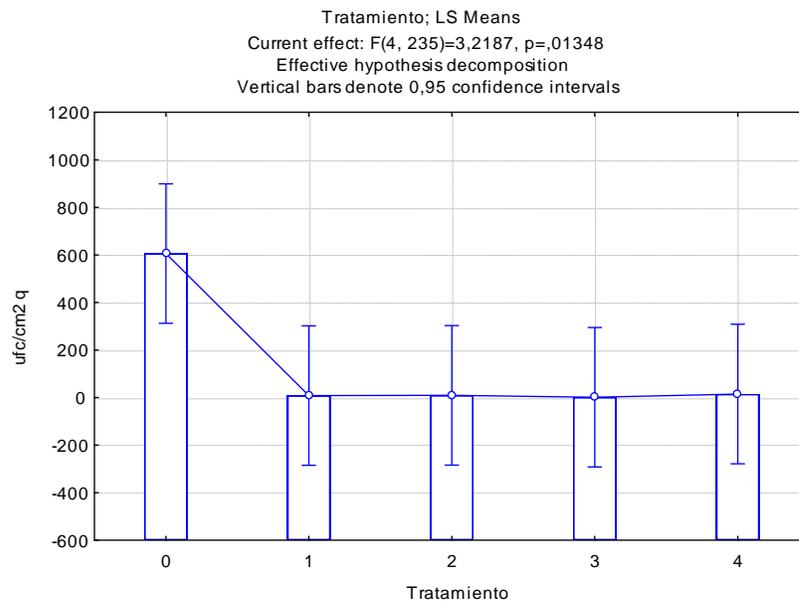
En cuanto a la evaluación de la relación de dinámica poblacional de bacterias líticas nativas aisladas de hojas de banano tratadas con los inductores de resistencia, se tiene lo siguiente:

En los valores promedio de los muestreos, las bacterias glucanólíticas fueron favorecidas por el tratamiento T4 (91% de aumento en el crecimiento comparado con el testigo), sin presentarse diferencia estadística entre tratamientos y el testigo (Gráfico 17).



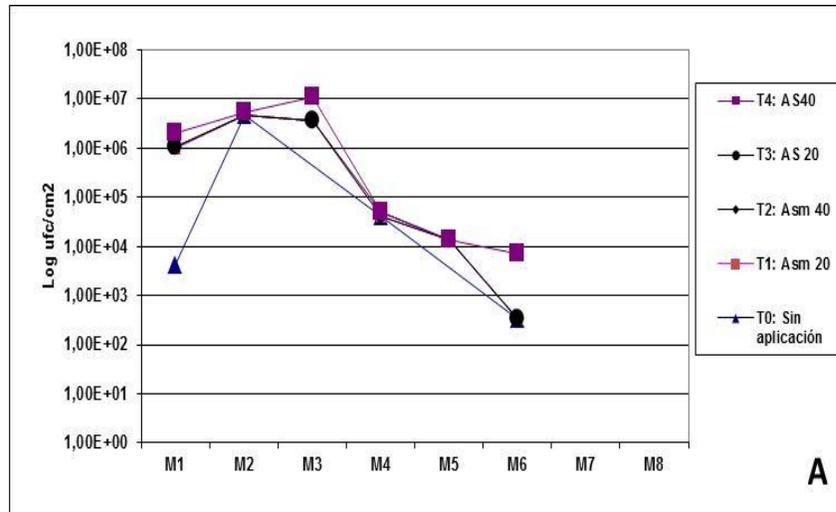
**Gráfico 17: Efecto de inductores de resistencia sobre la variable ufc/cm<sup>2</sup> de bacterias glucanolíticas.**

Bajo la acción de los inductores las bacterias quitinolíticas mostraron niveles poblacionales con valores significativos por debajo del testigo. Todos los tratamientos mostraron reducciones entre el 97% y el 99% en la variable ufc/cm<sup>2</sup> (Gráfico 18).



**Gráfico 18: Efecto de inductores de resistencia sobre la variable ufc/cm<sup>2</sup> de bacterias quitinolíticas.**

En el tiempo, se observa un incremento poblacional en las plantas tratadas con AS a 4000 ppm (T4), con una tendencia a la disminución a partir del muestreo 4 con respecto al testigo. Los demás tratamientos presentaron recuentos poblacionales con valores similares al testigo (Gráfico 19).



**Gráfico 19: Efecto de los inductores de resistencia sobre la variable ufc/cm<sup>2</sup> en plantas bajo cubierta. Valores poblacionales en muestreos en el tiempo (A).**

Para la variable halo no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con respecto al testigo sin inductor.

De forma general se indica que los inductores de resistencia no tienen un efecto antimicrobial directo, sin embargo hay algunos ejemplos de actividad antimicrobial documentada cuando los elicitores son aplicados en altas concentraciones (Vallad y Goodman, 2004).

Keniskern, Traw y Bergelson (2006), determinaron que la inducción de resistencia vía AS redujo el crecimiento y diversidad de bacterias en el interior de la hoja de *Arabidopsis thaliana*, mientras que la inducción vía ácido jasmónico (JA), no presentó efecto sobre las bacterias en el interior de la hoja, pero incremento la diversidad de bacterias en el exterior de la misma.

En estudios realizados por Zuluaga *et al.* (2007) se mostró que los tratamientos que incluyeron inductores de resistencia en mezcla con bacterias quitinolíticas fueron estadísticamente iguales al control convencional de Sigatoka negra.

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que las bacterias aplicadas al follaje no fueron afectadas por la aplicación previa del AS al follaje, destacando entonces el AS como una alternativa conjunta en el control de enfermedades por su efectividad en el control (reportado previamente), por su bajo costo comparado con el ASM y porque no tiene un efecto antimicrobial significativ

## 5. Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

Se cuenta con una colección de 102 bacterias con actividad lítica caracterizados desde el punto de vista morfológico y de características tintoriales, e identificados por lo menos a nivel de género 80 de los aislamientos y el 94% de estos a nivel de especie. Esta información es de gran utilidad para conocer la diversidad en el filoplano de banano y poder proyectar trabajos relacionados.

Los aislados bacterianos de la colección que afectaron en un 100% la germinación de *M. fijiensis* bajo las condiciones evaluadas fueron los codificados como 5, 48, 57, 92, 32, 41, 44, 74, 70, 19, 50, 29 y la mezcla de los aislados 5, 10, 33 y 48.

Los tratamientos que redujeron en forma significativa la enfermedad fueron aquellos que se encontraban en mezcla con fungicidas y el tratamiento que contenía el SF1 en mezcla con aceite, mostró una respuesta de reducción de enfermedad del 22,6%.

No se encontró evidencia clara de que los sustratos foliares solos tuviesen efecto alguno sobre el desarrollo de la enfermedad causada por *M. fijiensis*.

El tratamiento T4 (SF1 + mezcla fungicida) es el que combina un buen control de la enfermedad con niveles poblacionales de bacterias líticas poco alterados cuando fue evaluado en condiciones de campo (parcelas experimentales).

El ácido salicílico utilizado como inductor de resistencia, presentó una inhibición del crecimiento de bacterias líticas al ser evaluado a nivel *in vitro*, mientras que en plantas de banano bajo cubierta favoreció las poblaciones de bacterias glucanólíticas, pero sin presentar diferencia estadística con los otros tratamientos y el testigo (sin inductor), puede considerarse como un producto que se puede utilizar como alternativa para controlar o activar mecanismos de defensa en las plantas sin afectar las poblaciones bacterianas habitantes del filoplano.

## 5.2. Recomendaciones

Para las pruebas de antagonismo y compatibilidad se recomienda evaluar diferentes épocas lluviosas, muestras del hongo de diferentes zonas y con diferente presión de la enfermedad y conservar las cepas o aislados bacterianos en su cultivo inicial para evitar la pérdida de características que dichos microorganismos traen de su hábitat. Además de la prueba *in vitro* una prueba bajo cubierta, en invernadero o en campo. Todo ello con el fin de obtener resultados objetivos que contribuyan en el futuro a la formulación de un producto que favorezca el control de patógenos foliares y que se adapte a los cambios.

Se recomienda una caracterización a nivel de especie de los aislados que por una alta homología entre especies y por la limitación de la metodología utilizada no pudo llegar a tal nivel, esto con el fin de saber con certeza que microorganismos habitan la filósfera del cultivo del banano y como potencializarlos.

## 6. Bibliografía

ALEXOPOULOS, C.J, MIMS, C.W, y BLACKWELL, M. 1996. Characteristics of fungi. En: Introductory micology (4th edition). USA: John Wiley & Sons. p. 26-56.

AGROCADENAS. 2006. La cadena del banano en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Documento de trabajo No. 101.51 p. <http://www.agrocadenas.gov.co> Consultada 20 de febrero de 2007.

ANDREWS, J. H., HIRANO, S. S. eds. 1991. Microbial Ecology of Leaves. New York: Springer-Verlag.

ANDREWS, J.H. 1992. Biological control in the phyllosphere. En: Annual Review of Phytopathology. Vol. 30; p.603-635.

ANFOKA G. H., 2000. Benzo-(1,2,3)-thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester induces systemic resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*. Mill cv. Vollendung) to Cucumber mosaic virus. En: Crop Protection 19, 401-405.

ARANGO, M.E. 2001. Manejo de sustratos para el control biológico de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en el cultivo del banano (*Musa* AAA). Tesis de maestría. Centro Agronómico Tropical de investigación y Enseñanza, CATIE. Turrialba. Costa Rica. 102p.

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

ARIAS Renée S., SAGARDOY Marcelo A, VAN VUURDE Jim W. L. 1999. Spatio-temporal distribution of naturally occurring *Bacillus* spp. and other bacteria on the phylloplane of soybean under field conditions. En: J. Basic Microbiol. Vol. 39; p. 283-292.

ATLAS R. y BARTHA R. 2002. Ecología microbiana y microbiología ambiental. Pearson Educación S.A. Madrid. 677p

AUGURA, 2009. Informe de Gestión, 2009. Gestión de Investigación. Medellín. 93p.

BELALCÁZAR, S. 1991. Manejo Integrado de Plagas. En: El Cultivo del plátano en el trópico. Inibap, ICA, CIID, Comité Departamental de Cafeteros del Quindío. 376 p.

BENEDUZI A., COSTA P. B., PARMA M., MELO I. S., BODANESE-ZANETTINI M. H., y PASSAGLIA L. M. P. 2010. *Paenibacillus riograndensis* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from the rhizosphere of *Triticum aestivum*. En: International Journal Of Systematic And Evolutionary Microbiology. 60: 128.

BEATTIE, Gwyn A. y LINDOW, Steven E. 1999. Mini-Review Bacterial Colonization of Leaves: A Spectrum of Strategies. En: Phytopatology. Volume 89, Number 5 Pages 353-359

- BLAKEMAN, J. P. y FOKKEMA, N. J. 1982. Potencial for biological control of diseases on the phylloplane. En: Annual Review of Phytopathology. Vol. 20; p.167-192.
- BUENSANTEAI, N., YUEN, G y PRATHUANGWONG, S. 2009. Priming, signaling, and protein production associated with induced resistance by *Bacillus amyloliquefaciens* KPS46. En: World J Microbiol Biotechnol. 25:1275–1286.
- BUCK, J.W. 2004. Combination of fungicides with phylloplane yeasts for improved control of *Botrytis cinerea* on geranium seedlings. Phytopathol. 94, 196-202.
- CEBALLOS, I.C. 2009. Selección de bacterias aeróbicas formadoras de endospora aisladas de la filósfera de cultivares de musa en el Urabá antioqueño, con potencial antagonico contra *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Bogotá. 135p. Tesis Master en Microbiología. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.
- CHERNIN, L., ISMAILOV, Z., HARAN, S. y CHET, I. 1995. Chitinolytic Enterobacter agglomerans antagonistic to fungal plant pathogens. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol 61, no.5; p.1720-1726.
- CHET, I. 1987. Fungal antagonist. En: Innovative approaches to plant disease control. pp. 107-134. John Wiley & Sons. New York.
- CHICA, R., M. HERRERA, I. JIMÉNEZ, S. LIZCANO, J.A. MONTOYA, L.F. PATIÑO, P.A. RODRÍGUEZ y L.H. RUIZ, 2004. Impacto y manejo de la Sigatoka negra en el cultivo de banano de exportación en Colombia. P. 53-62. En. XVI Reunión Internacional Acobat (16: 2004: Oaxaca, México). Memorias. Oaxaca: Acobat.
- COHAN FM. 2002. What are bacterial species? Annu. Rev. Microbiol. 56: 457-487.
- COHEN-KUPIEC, R. y CHET, I. 1998. The molecular biology of chitin digestion. En: Current Biology. Vol. 9; p. 270-277.
- CORRALES, O., KNIGHT, S. y MADRIGAL, A. 2002. Manejo de Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) y el nematodo barrenador (*Radopholus similis* Cobb) en banano, usando el activador de resistencia boost 50 SC dentro de un programa de fitoprotección basado en menos uso de agroquímicos. p. 143 – 147. En: XV Reunión Internacional ACORBAT (2002, Cartagena de Indias, Colombia). Memorias. Medellín: Augura.
- CORREA J.D., L.E. VÁSQUEZ y L.F. PATIÑO 2008. Compatibilidad de bacterias líticas con los coadyuvantes Pegal® y Neofat®, para el control biológico de la Sigatoka negra. pp. 86-91. En: Sexto encuentro nacional e internacional de investigadores. Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid. Noviembre de 2008. Medellín-Colombia.
- DAVIS, R. F., P. A. BACKMAN, R. RODRIGUEZ-KABANA, y N. KOKALIS-BURELLE.1992. Biological control of apple fruit diseases by *Chaetomium globosum* formulations containing cellulose. En: Biological Control. Vol 2; p.118–123.
- DAY, J.G y STACEY, G. Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols, Second Edition, 2007. Vol 38. pag 73 -98.

DOWNES, F y ITO, K. 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. Fourth Edition. Cap. 3. p 27-28.

ELAD, Y., RICHARD, R., BÉLANGER, R. y JÜRGEN, K. 2002. Biological control of diseases in the phyllosphere. p.66-78. En: I Curso – Taller Internacional (2ª ed): Control biológico, componente fundamental del manejo integrado de plagas en una agricultura sostenible. ( Bogotá, Colombia). Memorias. Bogotá: Corpoica.

ESPINOSA, PD. 2004. Caracterización de la producción ecológica en Colombia. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura-IICA. 39 p.

FERNÁNDEZ-LARREA, O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. En: Manejo Integrado de Plagas No 62:96-100, Costa Rica.

FOKKEMA, N. J., J. G. DEN HOUTER, Y. J. C. KOSTERMAN, y A. L. NELIS. 1979. Manipulation of yeasts on field-grown wheat leaves and their antagonistic effect on *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum*. En: Trans. Br. Mycol. Soc. Vol 72; p.19–29.

FRIDLENDER, M., INBAR, J. y CHET, I. 1999. Biological control of soil-borne pathogens by a  $\beta$ - 1,3 glucanase-producing *Pseudomonas cepacia*. Soil Biology and Biochemistry 25, 1211-1221.

FURTADO, J. 1969. Effect of copper fungicide on the occurrence of the pathogenic form of *Colletotrichum coffeanum*. Trans. Brit. Mycol. Soc. 53, 325-328.

GALKIEWICZ JP, KELLOGG CA. 2008. Cross-Kingdom Amplification Using Bacterial-Specific Primers: Complications for Coral Microbial Ecology. En: Applied and environmental microbiology. 74(24): 7828-31.

GAUHL, F. 1989. Epidemiología y ecología de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*, Morelet) en plátano (*Musa sp*) en Costa Rica. Ciudad de Panamá: UPEB. 114 p.

GILBERTSON, R.L., M.R. ROJAS, D. RUSSELL y D.P. MAXWELL. 1991. The use of the asymmetric polymerase chain reaction and DNA sequencing to determinate genetic variability among isolates of bean golden mosaic geminivirus in the Dominican Republic. En: J. Gen. Virol. 72: 2843-2848.

GODARD, J.F., ZIADI, S., MONOT, C., LE CORRE, D. and SILUÉ, D. 1999. Benzothiadiazole (BTH) induces resistance in cauliflower (*Brassica oleracea* var botrytis) to downy mildew of crucifers caused by *Peronospora parasitica*. En: Crop Protection. Vol. 18; p.397-405.

GONZÁLEZ, R., BUSTAMANTE, E., SHANNON, E.P., OKUMOTO, P.S. y LEANDRO. G. 1996. Evaluación de microorganismos quitinolíticos antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis* en casa de mallas y en campo. En: Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). No. 40; p.12-16.

GORLACH, J., VOLRATH, S., KNAUFBEITER, G., HENGY, G., BECKHOVE, U., KOGEL, K.H., OOSTENDORP, M., STAUB, T., WARD, E., KESSMANN, H. y RYALS, J. 1996. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance,

activates gene expression and disease resistance in wheat. En: Plant Cell. Vol. 8; p.629-643.

GRIESBACH, E., EISBEIN, K., KRÄMER, I., RAMM, M., MÜLLER, J., y VÖLKSCH, B. 2000. Induction of resistance to bacterial pathogens in the pathosystem tomato/*Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis* II. Characterization of the resistance inductor. En: Journal of Plant Diseases and Protection. Vol. 107, No.5; p.464-483.

GUETSKY, R., D. SHTIENBERG, Y. ELAD y A. DINOOR. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. En: Phytopathol. 91, 621-627.

GUZMÁN, M. 2006. Estado actual y perspectivas futuras del manejo de la Sigatoka Negra en América Latina. P. 83-91. En: XVII Reunión Internacional ACORBAT (2006, Joinville, Brasil). Memorias. Joinville: Acorbat/Acafruta.

HAEST, C. 2000. European market potencial for organic produce p. 95-109. En: Organic banana 2000: Towards an organic banana initiative in the Caribbean Report of the International workshop on the production and marketing of organic bananas by smallholder farmers. M. Holderness, S. Sharrock, E. Frison and M. Kairo, editors. INIBAP

HELGASON, E., OKSTAD, O.A., CAUGANT, D., JOHANSEN, H., FOUET, A., MOCK, M., HEGNA, I. y KOLSTO, A. 2000. *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* One Species on the Basis of Genetic Evidence. En: Applied and Environmental Microbiology. 66(6); p. 2627–2630

HENAO, J. 2007. Evaluación del P.P.C (preparación para cosecha) y sus efectos en la reducción del inóculo de la Sigatoka negra en la zona bananera en el departamento del Magdalena. Informe de práctica para optar al título de Ingeniero Agropecuario. Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid. Medellín.

HINCAPIÉ, A. 2003. Efecto del ácido salicílico y acibenzolar-s-metil como inductores de resistencia a Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banano. Medellín. 65 h. Trabajo de grado Ingeniera Agrónoma. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias.

HIRANO Susan S., NORDHEIM Erik V., ARNY Deane C. y UPPER Christen D.1982. Lognormal Distribution of Epiphytic Bacterial Populations on Leaf Surfaces. En: Applied And Environmental Microbiology, Sept. 1982, P. 695-700.

HIRANO, S. S. y UPPER, C. D. 2000. Bacteria in the leaf ecosystem with emphasis on *Pseudomonas syringae* a pathogen, ice Nucleus, and epiphyte. En: Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64(3):624-653.

JACOBSEN, B.F., N.K. ZIDACK y B.J. LARSON. 2004. The role of *Bacillus*-based biological control agents in integrated pest management systems: plant diseases. En: Phytopathol. 94, 1272-1275.

JANISIEWICZ, W. J., J. USALL, y B. BORS. 1992. Nutritional enhancement of biological control of blue mold on apples. En: Phytopathology. Vol 82; p.1364–1370.

JANISIEWICZ, W. J., y B. BORS. 1995. Development of a microbial community of bacterial and yeast antagonists to control wound-invading postharvest pathogens of fruits. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol 61; p.3261–3267.

Jl, P. y WILSON, M. 2003. Enhancement of population size of a biological control agent and efficacy in control of bacteria speck of tomato through salicylate and ammonium sulfate amendments. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol 69, No.2; p.1290-1294.

KENISKERN, J., M.B. TRAW and J. BERGELSON. 2006. The effects of Salicylic acid and jasmonic acid mediated defense on the natural bacterial community of *Arabidopsis thaliana*. En: Phytopathol. 96(12):1417-1440.

KESSMANN, H., STAUB, T., HOFMAN, C., MAETZKE, T., HERZOG, J., WARD, E., UKNES, S. y RYALS, J. 1994. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals. En: Annual Review of Phytopathology. Vol. 32; p.439-459.

KLOPPER, J. W., CHOONG-MIN, R. y ZHANG, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. En: Phytopathology 94: 1260-1266.

KOKALIS-BURELLE, N., P. A. BACKMAN, R. RODRIGUEZ-KABANA, y L. D. PLOPER. 1992. Potential for biological control of early leafspot of peanut using *Bacillus cereus* and chitin as foliar amendments. En: Biological Control. Vol 2; p.321–328.

LINDOW, S.E y M.T. BRANDL. 2003. Microbiology of the phyllosphere. En: Appl. and Environ. Microbiol. 69 (4), 1875-1883.

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

MADRIGAL, A., RUESS, W. y STAEHLE-CSECH, U. 1998. CGA 245704, a new plant activator to improve natural resistance of banana against Black Sigatoka (*Mycosphaerella fijiensis*). En: XIII Reunión Internacional ACORBAT (1998, Quito, Ecuador). Memorias. Quito: Acorbat. p.266-274

MAJEWSKI J, COHAN FM. 1999. Adapt globally, act locally: the effect of selective sweeps on bacterial sequence diversity. En: Genetics 152: 1459-1474.

MAŁOLEPSZA, U. 2006. Induction of disease resistance by acibenzolar-S-methyl and o-hydroxyethylorutin against *Botrytis cinerea* in tomato plants. En: Crop Protection. Vol. 25, No. 9; p.956-962.

MARIN, V.D. y ROMERO, C.R. 1992. El combate de la sigatoka negra en banano. Corporación Bananera Nacional. Costa Rica. Boletín No. 4. 22 p.

MARIN, D.H., ROMERO, R.A., GUZMÁN, M. y SUTTON T.B. 2003. Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. En: Plant Disease. Vol. 87; p.208-223.

- MCSPADDEN, B. 2004. Ecology of *Bacillus* and *Paenibacillus* spp. in Agricultural Systems. En: *Phytopathology* 94(11):1252-1258.
- MERCIER, J. y LINDOW, S. E. 2000. Role of leaf surface sugars in colonization of plants by bacterial epiphytes. En: *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 66, No.1; p.369-374.
- OCHMAN H, LAWRENCE JG, GROISMAN EA. 2000. Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation. En: *Nature* 405: 299-304.
- OKOMUTO, S. y E. BUSTAMANTE. 1993. Efecto de enmiendas foliares sobre el desarrollo del tizón temprano causado por *Alternaria solani* y sobre la población bacterial en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). En: *Manejo Integrado de Plagas*. 28, 1-6.
- ORDENTLICH, A., ELAD, Y. y CHET, H. 1998. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. En: *Phytopathology*. Vol 78, No.1; p. 84-88.
- OSORIO, I., PATIÑO, L.F., BUSTAMANTE, E. y RODRÍGUEZ. P. 2004. Selección y evaluación de bacterias quitinolíticas provenientes de la zona de Urabá, para el control de la Sigatoka Negra. En: *Boletín Técnico de Cenibanano*. No.6; p.8-13.
- PAPPU, H.R., A.S. CSINOS, R.M. MCPHERSON, D.C. JONES y M.G. STEPHENSON, 2000. Effect of Acibenzolar-S-Methyl and imidacloprid on suppression of tomato spotted wilt Tosspovirus in flue-cured tobacco. En: *Crop Protection*. 19, 349-354.
- PARRA Y. y RAMÍREZ RA. 2002. Efecto de diferentes derivados de la quitina sobre el crecimiento *in Vitro* del hongo *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Cultivos Tropicales*. Vol 23, No. 2; p. 73-75.
- PATIÑO, L.F. 2002. Efecto de una fuente de energía, tres inductores de resistencia y un sustrato foliar sobre Sigatoka Negra en banano. p. 135-142. En: XV Reunión Internacional ACORBAT (2002, Cartagena de Indias, Colombia). Memorias. Medellín: Augura.
- PATIÑO, L.F. 2003. La resistencia a fungicidas, una continua amenaza al control de Sigatoka Negra. En: *Boletín Técnico de Cenibanano*. No. 4; p.5-2.
- PATIÑO, L.F., SALAZAR, L., COLLAZOS, P., PIEDRAHITA, R. y BUSTAMANTE, E. 2006. Bacterias líticas y sustratos en la filosfera de banano y plátano para el control de Sigatoka Negra. P.133-140. En: XVII Reunión Internacional ACORBAT (2006, Joinville, Brasil). Memorias. Joinville: Acorbat/Acafruta.
- PÉREZ, L., RODRÍGUEZ, M.E., RODRÍGUEZ, F. y ROSON, C. 2003. Efficacy of Acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance against tobacco blue mould caused by *Peronospora hyoscyami* f.sp. tabacina. En: *Crop Protection*. Vol. 22; p.405-413.
- PIETERSE, C. M. J., VAN WEES, S. C. M., HOFFLAND, E., VAN PELT, J. A. y VAN LOON L. C. 1996. Systemic resistance in *Arabidopsis* induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. *The Plant Cell* 8: 1225-1237.

PLOPER, L. D., P. A. BACKMAN, y R. RODRIGUEZ-KABANA. 1992. Enhanced natural biological control of apple fruit diseases by applications of biopolymers. En: Biological Control Tests. Vol 7; p. 3.

RADWAN HH., PLATTNER HJ., MENGE U., y DIEKMANN H. 1994. The 92-kDa chitinase from *Streptomyces olivaceoviridis* contains a lysine-C endoproteinase at its N-terminus. En: FEMS Microbiol Lett. Jul 1;120(1-2):31–35.

RAHMAN, M. S.; T. ANO; M. SHODA. 2006. Second Stage Production of Iturin A by Induced Germination of *Bacillus subtilis* RB14. En: Journal of Biotechnology 18:226-229

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.

Ren Y. y C.A. West. 1992. Elicitation of diterpene biosynthesis in rice (*Oryza sativa* L.) by chitin. Plant Physiol. 99, 1169-1178.

Rizzo, A.N.N., Ferreira, M. y Braz, L.T. 2003. Ação de acibenzolar-s-methyl (BTH) isolado e em combinação com fungicidas no controle do cancro da haste em melão rendilhado. Em: Horticultura Brasileira. Vol. 21, No.2; p.1-7.

Romero, A.M., Kousik, C.S. y Ritchie, D.F. 2001. Resistance to bacterial spot in bell pepper induced by acibenzolar-s-methyl. En: Plant Disease. Vol. 85; p. 189-194.

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

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

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

SAUKA, Diego H. y BENINTENDE, Graciela B. 2008. *Bacillus thuringiensis*: generalidades: Un acercamiento a su empleo en el biocontrol de insectos lepidópteros que son plagas agrícolas. Rev. argent. microbiol. [online]. vol.40, n.2 pp. 124-140.

SID AHMED, A., EZZIYYANI, M., PÉREZ SÁNCHEZ, C. y M.E. CANDELA, ME. 2003. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus spp.* and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annuum*) plants. En: European Journal of Plant Pathology. Vol 109; p. 633–637.

SINGH, P.P., SHIN, Y.C., PARK, C.S. y CHUNG, Y.R. 1999. Biological control of *Fusarium* wilt of cucumber by chitinolytic bacteria. En: Phytopathology. Vol 89, No.1; p. 92-99.

- SPURR, H.W. 1981. Experiments on foliar disease control using bacterial antagonists. In: Blakeman, J. P. Microbial ecology of the phylloplane. London: Academia Press. p.369-381.
- STADLER, B., y T. MUELLER. 1996. Aphid honeydew and its effect on the phyllosphere microflora of *Picea abies* (L.) Karst. En: Oecologia. Vol 108; p.771–776.
- STICHER L., MAUCH-MANI B. y MÉTRAUX J.P. 1997. Systemic acquired resistance. Annu. Rev. Phytopathol. 35: 235 - 270
- SUNDIN, G. W. y JACOBS, J. L. 1999. Ultraviolet radiation (UVR) sensitivity analysis and UVR survival strategies of a bacterial community from the phyllosphere of field-grown peanut (*Arachis hypogaeae* L.).En: Microb. Ecol. 38:27-38.
- TORRES, J. y ANGEL, F. 2010. Identificación molecular por adn ribosomal 16s de aislados bacterianos de filosfera de banano (*Musa* sp.). Informe de resultados. Unidad de Biotecnología Vegetal UNALMED-CIB. Corporación para Investigaciones Biológicas – CIB. Medellín. Agosto de 2010.
- UKNES S., MAUCH-MANI B., MOYER M., POTTER S., WILLIAMS S. y DINCHER S. Acquired resistance in *Arabidopsis*. Plant Cell 1992; 4:645–56.
- VALLAD, G.E. y GOODMAN, R.M. 2004. Systemic acquired resistance and induced systemic resistance in conventional agriculture. En: Crop Science. Vol 44; p.1920-1934.
- VALOIS, D., FAYAD, K., BARASUBIYE, T., GARON, M., DERY, C., BRZEZINSKI, R. y BEAULIEU, C. 1996. Glucanolytic actinomycetes antagonistic to *Phytophthora fragariae* var. rubi, the agent causal of raspberry root rot. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol 62, No. 5; p.1630-1635.
- VAWDRY, L.L, y K. GRICE. 2005. Field evaluation of strobilurins, triazoles and acibenzolar to control Sigatoka disease in Australia. En: Infomusa 14(2), 11-15.
- VERHAGEN BW, TROTEL-AZIZ P., COUDERCHET M., HOFTE M. y AZIZ A. 2010. *Pseudomonas* spp.-induced systemic resistance to *Botrytis cinerea* is associated with induction and priming of defence responses in grapevine. En: Journal of Experimental Botany 61, 249–260.
- WILSON, M., y S. E. LINDOW. 1994. Ecological similarity and coexistence of epiphytic ice-nucleating (Ice+) *Pseudomonas syringae* strains and a non-icenucleating (Ice-) biological control agent. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol 60; p.3128–3137.
- WILSON, M., M. A. SAVKA, I. HWANG, S. K. FARRAND, y S. E. LINDOW. 1995. Altered epiphytic colonization of mannityl opine-producing transgenic tobacco plants by a mannityl opine-catabolizing strain of *Pseudomonas syringae*. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol 61; p.2151–2158.
- WREN, B.W. y TABAQCHALI, S. 1987. Restriction Endonuclease DNA Analysis of *Clostridium difficile*, J Clin Microbiol. 25:2402-2404.

YAMADA, M., y M. OGISO. 1997. Control of soil-borne diseases using antagonistic microorganisms. IV. Study on the available substrates for antagonistic bacterial strains to control *Fusarium* wilt of tomatoes. Res. Bull. Aichi-Ken Agric. Res. Cent. 29:141–144.

ZHANG, Z. y YUEN, G.Y. 2000. Effects of culture fluids and preinduction of chitinase production on biocontrol of *Bipolaris* leaf spot by *Stenotrophomonas maltophilia* C3. En: Biological Control. Vol 18; p.277-286.

ZULUAGA, C., L.F. PATIÑO y J.C. COLLAZOS. 2007. Integración de inducción de resistencia con bacterias quitinolíticas en el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en banano. Rev. Fac.Nal.Agr. Medellín.60(2): 3891-3905.

## 8. Anexos

### Anexo A: Procedencia y descripción morfológica y tintorial de los aislados bacterianos.

Consecutivo		Procedencia	Actividad Lítica		Gram	Endosporas	DESCRIPCIÓN (AN)						
			Quitinolítica	Glucanolítica			Forma	Borde	Elevación	Superficie	Consistencia	Caract. Óptica	Color AN(Carta color Pantone)
1	PJIC	Urabá	1		Cocos -		circular	irregular	si	lisa	cremosa	opaca	1205
4	PJIC	Urabá		1	Cocos -		irregular	liso	no	lisa	cremosa	brillante	468
5	PJIC	Bello	1	1	Cocos +		irregular	irregular	no	lisa	cremosa	brillante	cool gray 1C
6	PJIC	Bello		1	Bacilos +		irregular	irregular	si	lisa	cremosa	brillante	607
7	PJIC	Bello		1	Bacilos +		circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	cool gray 1C
8	PJIC	Bello		1	Bacilos +	si	irregular	irregular	si	lisa	cremosa	opaca	468
9	PJIC	Urabá		1	Bacilos +		circular	irregular	si	lisa	cremosa	brillante	7401
10	PJIC	Urabá	1	1	Filamentos +		circular	irregular	si	rugosa	granular	opaca	cool gray 1C
13	PJIC	Urabá		1	Cocos -		irregular	irregular	no	lisa	cremosa	opaca	cool gray 1C
14	PJIC	Urabá		1	Bacilos +		circular	irregular	no	lisa	cremosa	opaca	7401
15	PJIC	Urabá-Santillana		1	Bacilos +		irregular	irregular	si	lisa	cremosa	brillante	cool gray 1C
16	PJIC	Urabá-Santillana		1	Bacilos -		irregular	irregular	no	lisa	cremosa	brillante	cool gray 1C
17	PJIC	Urabá-Santillana		1	Bacilos -	si	circular	liso	si	lisa	cremosa	opaca	468
18	PJIC	Urabá-Santillana		1	Bacilos -		circular	liso	no	lisa	cremosa	brillante	7401
19	PJIC	Urabá-Santillana		1	Bacilos +	si	circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	607
20	PJIC	Urabá-Santillana		1	Bacilos +		circular	liso	no	lisa	cremosa	brillante	600
21	PJIC	Urabá-Santillana		1	Bacilos +		circular	liso	si	rugosa	granular	brillante	607
22	PJIC	Magdalena-Juliana 1		1	Cocos -		circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	7499

23	PJIC	Magdalena-Juliana1		1	Bacilos -	si	circular	liso	no	rugosa	granular	brillante	cool gray 1C
24	PJIC	Magdalena-Juliana1		1	Bacilos -		circular	liso	si	lisa	gelatinosa	brillante	1205
25	PJIC	Magdalena-Juliana1		1	Cocos -		circular	liso	si	lisa	gelatinosa	brillante	cool gray 1C
26	PJIC	Magdalena-Juliana1		1	Bacilos -	si	circular	liso	no	lisa	cremosa	brillante	127
27	PJIC	Urabá-Montecristo1		1	Cocos -		circular	liso	si	lisa	gelatinosa	brillante	cool gray 1C
28	PJIC	Urabá-Montecristo1		1	Cocos +		circular	liso	no	lisa	cremosa	opaca	cool gray 1C
29	PJIC	Urabá-Montecristo1		1	Cocos +		irregular	liso	no	lisa	cremosa	opaca	cool gray 1C
30	PJIC	Urabá-Montecristo1		1	Cocos -		irregular	irregular	no	lisa	cremosa	opaca	cool gray 1C
31	PJIC	Urabá-Montecristo1		1	Bacilos +	si	irregular	irregular	no	lisa	cremosa	opaca	607
32	PJIC	Urabá-Montecristo1		1	Bacilos +		circular	irregular	no	lisa	cremosa	opaca	607
33	PJIC	Urabá-Montecristo2		1	Cocos -		circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	cool gray 1C
34	PJIC	Urabá-Montecristo2		1	Bacilos -	si	irregular	irregular	si	lisa	gelatinosa	brillante	7401
35	PJIC	Urabá-Montecristo2		1	Cocos -		circular	liso	si	lisa	gelatinosa	brillante	cool gray 1C
36	PJIC	Urabá-Montecristo2		1	Bacilos +		irregular	liso	no	lisa	cremosa	brillante	cool gray 1C
37	PJIC	Urabá-Montecristo2		1	Bacilos +	si	circular	liso	no	lisa	cremosa	opaca	600
38	PJIC	Urabá-Montecristo2	1	1	Cocos -		circular	liso	no	lisa	gelatinosa	brillante	7401
39	PJIC	Urabá-Montecristo2		1	Bacilos +		circular	liso	no	lisa	cremosa	opaca	607
40	PJIC	Urabá-Montecristo2		1	Filamentos +		irregular	irregular	no	lisa	cremosa	opaca	607
41	PJIC	Urabá-Montecristo2		1	Cocos +		irregular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	cool gray 1C
42	PJIC	Urabá-Zumbadora		1	Bacilos -		circular	liso	si	lisa	cremosa	opaca	607
43	PJIC	Urabá-Zumbadora		1	Bacilos -		irregular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	607
44	PJIC	Urabá-Zumbadora		1	Bacilos +	si	circular	liso	si	lisa	cremosa	opaca	cool gray 1C
45	PJIC	Urabá-Zumbadora		1	Cocos -		circular	liso	si	lisa	cremosa	opaca	cool gray 1C
46	PJIC	Urabá-Zumbadora		1	Bacilos +	si	circular	liso	no	lisa	cremosa	opaca	7499
47	PJIC	Urabá-Zumbadora		1	Cocos -		circular	liso	no	lisa	cremosa	brillante	cool gray 1C
48	PJIC	Urabá-Zumbadora		1	Bacilos +		circular	liso	no	lisa	cremosa	brillante	1365
49	PJIC	Urabá-Zumbadora		1	Bacilos +		circular	liso	si	lisa	gelatinosa	brillante	719

50	PJIC	Urabá- Cibeles		1	Bacilos +	si	irregular	irregular	si	lisa	cremosa	opaca	cool gray 1C
51	PJIC	Urabá-Montecristo2		1	Bacilos -		circular	liso	no	lisa	cremosa	opaca	148
52	PJIC	Uraba- Politécnico		1	Bacilos +	si	circular	liso	si	rugosa	cremosa	opaca	cool gray 1C
53	PJIC	Uraba- Politécnico		1	Bacilos +		irregular	liso	no	rugosa	cremosa	opaca	468
54	PJIC	Uraba- Politécnico		1	Cocos -		circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	454
55	PJIC	Uraba- Politécnico		1	Cocos -		circular	irregular	no	lisa	cremosa	brillante	cool gray 1C
56	PJIC	Uraba- Politécnico		1	Cocos -		circular	irregular	no	rugosa	cremosa	brillante	cool gray 1C
57	PJIC	Uraba- Politécnico		1	Cocos -		circular	irregular	si	rugosa	cremosa	opaca	468
58	PJIC	Uraba- Politécnico		1	Bacilos -		circular	liso	si	rugosa	gelatinosa	opaca	454
59	PJIC	Uraba- Politécnico		1	Cocos -		circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	468
60	PJIC	Uraba- Cortijo		1	Cocos -		circular	liso	no	lisa	cremosa	brillante	459
61	PJIC	Uraba- Cortijo	1	1	Cocos -		circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	468
62	PJIC	Uraba- Cortijo	1	1	Cocos -		circular	liso	si	rugosa	granular	opaca	cool gray 1C
64	PJIC	Uraba- Politécnico		1	Cocos -		irregular	irregular	no	rugosa	cremosa	brillante	454
67	PJIC	Uraba- Politécnico		1	Cocos +		circular	irregular	no	lisa	cremosa	brillante	454
68	PJIC	Uraba- Politécnico		1	Bacilos -	si	circular	liso	no	lisa	cremosa	brillante	172
69	PJIC	Uraba- Politécnico	1	1	Cocos -		circular	liso	no	lisa	cremosa	brillante	1205
70	PJIC	Uraba- Politécnico		1	Bacilos -	si	circular	liso	no	lisa	cremosa	brillante	cool gray 1C
71	PJIC	Uraba- Politécnico		1	Cocos -		circular	liso	si	lisa	granular	brillante	148
72	PJIC	Uraba- Politécnico	1	1	Filamentos +		circular	liso	si	rugosa	granular	opaca	cool gray 1C
73	PJIC	Uraba- Politécnico		1	Cocos -		circular	liso	si	rugosa	granular	opaca	cool gray 1C
74	PJIC	Uraba- Politécnico	1	1	Cocos -		circular	liso	no	lisa	cremosa	brillante	141
75	PJIC	Uraba- Politécnico		1	Cocos +		circular	liso	no	lisa	cremosa	brillante	136
76	PJIC	Uraba- Politécnico		1	Cocos -		circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	121
77	PJIC	Uraba- Politécnico	1	1	Cocos -		circular	liso	no	lisa	gelatinosa	brillante	148
78	PJIC	Uraba- Politécnico		1	Bacilos +	si	circular	liso	no	lisa	cremosa	brillante	136

79	PJIC	Uraba-Augura		1	Bacilos +	si	circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	148
80	PJIC	Uraba-Augura		1	Bacilos -		circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	148
81	PJIC	Uraba-Augura		1	Bacilos +		circular	irregular	no	lisa	cremosa	brillante	155
82	PJIC	Uraba-Augura		1	Cocos -		circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	155
83	PJIC	Uraba-Augura		1	Cocos -		circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	141
84	PJIC	Uraba-Augura		1	Bacilos -	si	circular	liso	no	lisa	cremosa	brillante	155
85	PJIC	Uraba-Augura		1	Cocos +		circular	liso	no	lisa	cremosa	brillante	121
86	PJIC	Uraba-Augura		1	Bacilos -	si	circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	136
87	PJIC	Uraba-Augura		1	Bacilos +		circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	120
88	PJIC	Uraba-Augura		1	Cocos -		circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	136
89	PJIC	Uraba-Augura		1	Cocos -		circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	120
90	PJIC	Uraba-Augura		1	Bacilos -	si	circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	121
91	PJIC	Uraba-Augura		1	Bacilos +		irregular	liso	no	lisa	cremosa	brillante	1205
92	PJIC	Uraba-Augura		1	Bacilos -		circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	1205
93	PJIC	Uraba-Augura		1	Bacilos -	si	circular	irregular	no	lisa	cremosa	brillante	1205
94	PJIC	Uraba-Augura		1	Bacilos -	si	circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	136
95	PJIC	Uraba-Augura		1	Bacilos +	si	irregular	irregular	no	rugosa	granular	opaca	cool gray 1C
96	PJIC	Magdalena- Burdeos		1	Cocos +		irregular	liso	no	lisa	gelatinosa	opaca	cool gray 1C
97	PJIC	Magdalena- Burdeos		1	Bacilos -	si	circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	148
98	PJIC	Magdalena- Burdeos		1	Bacilos -		circular	irregular	si	lisa	gelatinosa	brillante	155
99	PJIC	Magdalena- Burdeos		1	Bacilos -	si	circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	148
100	PJIC	Magdalena- Burdeos		1	Bacilos -	si	irregular	irregular	no	rugosa	granular	opaca	155
101	PJIC	Magdalena- Burdeos		1	Bacilos +		circular	liso	si	lisa	granular	opaca	cool gray 1C
102	PJIC	Magdalena- Burdeos		1	Cocos +		circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	141
103	PJIC	Magdalena- Burdeos		1	Cocos +		circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	136
104	PJIC	Magdalena- Burdeos		1	Cocos +		circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	141

---

105	PJIC	Magdalena- Burdeos		1	Cocos +		circular	liso	si	lisa	cremosa	opaca	
106	PJIC	Magdalena- Burdeos		1	Bacilos +	si	circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	148
107	PJIC	Magdalena- Burdeos		1	Cocos +		circular	liso	si	lisa	gelatinosa	brillante	141
108	PJIC	Magdalena- Burdeos		1	Bacilos -		circular	liso	si	lisa	gelatinosa	brillante	1205
109	PJIC	Magdalena- Burdeos		1	Bacilos -	si	circular	liso	si	lisa	cremosa	brillante	148

**Anexo B: Homologías obtenidas para las secuencias de ADN ribosomal 16S de cada uno de los aislados bacterianos.**

<b>Aislado</b>	<b>Accesiones</b>	<b>% Similaridad</b>	<b>Organismo</b>
1	gb GU966673.1	99.9%	Cellulomonas sp. CELLU-TOLU2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GU966665.1	99.9%	Cellulomonas sp. CELLU-TOLU3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GU012422.1	99.9%	Cellulosimicrobium cellulans strain YB-43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EU439413.1	99.9%	Cellulomonas sp. DB-18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
5	gb FJ418177.1	98.3%	Microbacterium sp. 1111 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GQ383916.1	98.3%	Microbacterium testaceum strain 4CAJ3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	dbj AB480762.1	98.3%	Microbacterium sp. Acj 118 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence
	gb AY741722.1	98.3%	Microbacterium sp. SKJH-23 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
6	gb FJ237281.1	100.0%	Bacillus subtilis strain XJAS-ZB-15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb FJ237279.1	100.0%	Bacillus subtilis strain XJAS-ZB-42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb FJ237278.1	100.0%	Bacillus subtilis strain XJAS-ZB-43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb FJ237276.1	100.0%	Bacillus subtilis strain XJAS-ZB-6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
10	gb EU741193.1	99.7%	Streptomyces bikiniensis strain 13661V 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	dbj AB184453.2	99.6%	Streptomyces castaneus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 13670
	gb AY999864.1	99.6%	Streptomyces rubiginosohelvolus strain IFO 12912 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	dbj AB184286.1	99.5%	Streptomyces nashvillensis gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: NBRC 13064
14	gb GQ262729.1	100.0%	Bacillus subtilis strain BS-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GQ262726.1	100.0%	Bacillus subtilis strain LC-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	dbj AB558527.1	100.0%	Bacillus sp. NCCP-157 gene for 16S rRNA, partial sequence
	gb GU902972.1	100.0%	Bacillus subtilis strain SU-10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
19	gb EU661712.1	98.8%	Bacillus cereus strain NBRAJATH9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

	gb CP001746.1	98.9%	Bacillus cereus biovar anthracis str. CI, complete genome
	gb EU429660.1	98.9%	Bacillus thuringiensis serovar colmeri 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb DQ286355.1	98.9%	Bacillus thuringiensis serotype H67 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
22	gb EU780103.1	99.9%	Bacillus pumilus strain DT83 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GU191914.1	99.9%	Bacillus pumilus strain SB 3002 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	emb AM913912.1	99.9%	Bacillus sp. LD121 partial 16S rRNA gene, isolate LD121
	gb EU869252.1	99.9%	Bacillus pumilus strain BG-B24 16S ribosomal RNA (rrs) gene, partial sequence
26	gb GQ262729.1	99.9%	Bacillus subtilis strain BS-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GQ262726.1	99.9%	Bacillus subtilis strain LC-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	dbj AB558527.1	99.9%	Bacillus sp. NCCP-157 gene for 16S rRNA, partial sequence
	gb GU902972.1	99.9%	Bacillus subtilis strain SU-10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
28	gb GQ180178.1	95.5%	Bacillus sp. JR14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EF530208.2	95.5%	Bacillus subtilis strain FS321 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GQ262729.1	95.4%	Bacillus subtilis strain BS-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GQ262726.1	95.4%	Bacillus subtilis strain LC-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
29	gb FJ169949.1	99.9%	Bacillus subtilis strain EFB(1B)B16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GQ262729.1	99.9%	Bacillus subtilis strain BS-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GQ262726.1	99.9%	Bacillus subtilis strain LC-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GU471203.1	99.9%	Bacillus sp. Q2CJ5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
33	gb EU857430.1	100.0%	Bacillus cereus strain B1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EU584551.1	100.0%	Bacillus sp. cp-h60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb FJ763650.1	99.9%	Bacillus cereus strain S72 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM152590.1	99.9%	Uncultured Bacillus sp. clone Filt.2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
38	dbj AB198337.1	99.8%	Paenibacillus sp. HC1 gene for 16S rRNA, complete sequence
	gb EU179327.1	99.6%	Paenibacillus taichungensis strain BCRC 17757 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	emb AM906086.1	99.5%	Paenibacillus sp. P33 partial 16S rRNA gene, strain P33

	dbj AB289610.1	99.4%	Paenibacillus sp. Ch380 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence
41	gb GQ262729.1	99.9%	Bacillus subtilis strain BS-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GQ262726.1	99.9%	Bacillus subtilis strain LC-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GU902972.1	99.9%	Bacillus subtilis strain SU-10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GQ870259.1	99.9%	Bacillus subtilis strain O-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
44	gb EU729126.1	99.9%	Bacillus subtilis strain JSU-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM027569.1	99.9%	Bacillus subtilis strain zj2008 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GU980947.1	99.9%	Bacillus subtilis strain CICC 10023 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GU332606.1	99.9%	Bacillus subtilis strain BZ1-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
48	gb EU931556.1	98.0%	Cellulosimicrobium cellulans strain ZFJ-17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	ref NR_029265.1	98.0%	Microbacterium arborescens strain DSM 20754 16S ribosomal RNA, partial sequence
	gb HM045843.1	97.8%	Microbacterium sp. WJ19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EU741114.1	97.7%	Microbacterium arborescens strain 13635B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
50	gb GQ262729.1	100.0%	Bacillus subtilis strain BS-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GQ262726.1	100.0%	Bacillus subtilis strain LC-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GU902972.1	100.0%	Bacillus subtilis strain SU-10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GQ870259.1	100.0%	Bacillus subtilis strain O-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
53	gb GQ375217.1	99.9%	Bacillus amyloliquefaciens strain CICC 20605 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM160161.1	99.9%	Endophytic bacterium MD3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	dbj AB279736.1	99.9%	Bacillus amyloliquefaciens gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence
	gb GU125623.1	99.9%	Bacillus amyloliquefaciens strain IMAU80205 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
56	gb HM003210.1	99.9%	Bacillus cereus strain WYLW1-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb CP001746.1	99.9%	Bacillus cereus biovar anthracis str. CI, complete genome
	gb EU429660.1	99.9%	Bacillus thuringiensis serovar colmeri 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EF210296.1	99.9%	Bacillus mycoides strain BGSC 6A13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
57	gb FJ386541.1	100.0%	Bacillus vallismortis strain ST47 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EU852930.1	99.9%	Bacillus velezensis strain B-42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

	gb FJ654647.1	100.0%	Bacillus amyloliquefaciens strain ABBD 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb FJ009394.1	100.0%	Bacillus vallismortis strain B9 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
58	gb GU250448.1	99.9%	Bacillus amyloliquefaciens strain BFE 5337 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GU250446.1	99.9%	Bacillus amyloliquefaciens strain BFE 5334 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb AY485275.1	99.9%	Bacillus sp. AH-E-1 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
	gb AY881635.1	99.9%	Bacillus subtilis strain CICC10025 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
60	emb FN692034.1	100.0%	Bacillus sp. HY 1.1 partial 16S rRNA gene, strain HY 1.1
	gb GU563349.1	100.0%	Bacillus aryabhatai strain LS15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GU563348.1	100.0%	Bacillus aryabhatai strain LS12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GQ927173.1	100.0%	Bacillus megaterium strain Z3-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
64	gb GQ381280.1	99.9%	Bacillus cereus strain TA2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM045841.1	99.9%	Bacillus sp. WJ17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GU391525.1	99.9%	Bacillus thuringiensis strain NI3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GU391524.1	99.9%	Bacillus thuringiensis strain Pd1T 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
67	gb HM003210.1	99.9%	Bacillus cereus strain WY1W1-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb CP001746.1	99.9%	Bacillus cereus biovar anthracis str. CI, complete genome
	gb EU429660.1	99.9%	Bacillus thuringiensis serovar colmeri 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EF210296.1	99.9%	Bacillus mycoides strain BGSC 6A13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
68	emb FR667172.1	99.9%	Staphylococcus sp. ITO18 partial 16S rRNA gene, strain ITO18
	gb HM187279.1	99.9%	Uncultured bacterium clone HDB_SIPP557 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EU807751.1	99.9%	Staphylococcus sp. VITS-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GQ222399.1	99.9%	Staphylococcus warneri strain FUA 3088 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
70	emb FN997624.1	99.9%	Bacillus pumilus partial 16S rRNA gene, strain MS28
	emb FN997623.1	99.9%	Vibrio parahaemolyticus partial 16S rRNA gene, strain MS27
	gb GU217692.1	99.9%	Bacillus sp. ljh-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb FJ763649.1	99.9%	Bacillus pumilus strain S68 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
72	gb FJ767837.1	99.8%	Streptomyces griseus strain Z-L-22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

	gb EU384259.1	99.8%	Streptomyces sp. A370 Ydz-QZ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EU368802.1	99.8%	Streptomyces sp. A225 Ydz-HN 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EU368801.1	99.8%	Streptomyces sp. A522 Ydz-FQ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
73	gb GQ262729.1	99.8%	Bacillus subtilis strain BS-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GQ262726.1	99.8%	Bacillus subtilis strain LC-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM055602.1	99.8%	Bacillus subtilis strain GD3b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GU216262.1	99.8%	Bacillus licheniformis strain KIBGE-IB5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
74	gb EU373393.1	99.9%	Bacillus subtilis strain TPL16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EF592577.1	99.8%	Flavobacterium oceanosedimentum strain ATCC 31317 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EU741030.1	99.9%	Curtobacterium sp. Fek20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	emb AM411064.1	99.8%	Curtobacterium citreum partial 16S rRNA gene, strain Z10zhy
75	gb EU834245.1	99.6%	Bacillus cereus strain DS16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM152681.1	99.5%	Uncultured Bacillus sp. clone Filt.94 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM152590.1	99.5%	Uncultured Bacillus sp. clone Filt.2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GU826152.1	99.5%	Bacillus thuringiensis strain P22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
76	gb FJ853194.1	99.9%	Cellulosimicrobium sp. DRL399 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	dbj AB116667.1	99.9%	Cellulosimicrobium cellulans gene for 16S rRNA
	gb GQ478418.1	99.9%	Cellulosimicrobium sp. 139-5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb AY114178.1	99.9%	Cellulosimicrobium cellulans strain AS 4.1333 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
77	gb HM245965.1	100.0%	Bacillus sp. G1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM107809.1	100.0%	Bacillus amyloliquefaciens strain 16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM107806.1	100.0%	Bacillus amyloliquefaciens strain 13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM224387.1	100.0%	Bacillus subtilis strain M2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
78	gb HM245965.1	99.9%	Bacillus sp. G1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM107809.1	99.9%	Bacillus amyloliquefaciens strain 16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM107806.1	99.9%	Bacillus amyloliquefaciens strain 13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

	gb HM224387.1	99.9%	Bacillus subtilis strain M2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
79	gb FJ786054.1	99.7%	Massilia sp. III-116-18 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb DQ228653.1	99.5%	Uncultured bacterium clone CH2b153 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb AY445911.1	99.3%	Massilia timonae VA27232_02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb FJ191903.1	99.4%	Uncultured Massilia sp. clone GI3-S-4-F06 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
80	gb AY445912.1	99.8%	Massilia sp. VA23069_03 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EU982460.1	99.3%	Uncultured bacterium clone DYB22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EF205494.1	99.0%	Uncultured bacterium clone YCC86 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EU221406.1	98.7%	Massilia timonae strain H2P8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
81	emb FN667396.1	99.9%	Uncultured compost bacterium partial 16S rRNA gene, clone PS2630
	gb FJ982660.1	99.9%	Bacillus cereus strain JBE0009 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb FJ627944.1	99.9%	Bacillus sp. SC 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	dbj AB295053.1	99.9%	Bacillus thuringiensis gene for 16S rRNA, strain: NK2
86	gb EU741030.1	99.9%	Curtobacterium sp. Fek20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EU373393.1	99.9%	Bacillus subtilis strain TPL16 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	emb AM411064.1	99.9%	Curtobacterium citreum partial 16S rRNA gene, strain Z10zhy
	gb HM045826.1	99.8%	Curtobacterium sp. WJ02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
88	gb EU852930.1	93.5%	Bacillus velezensis strain B-42 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb FJ908753.1	93.5%	Bacillus sp. B121 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb FJ386541.1	93.5%	Bacillus vallismortis strain ST47 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EU365432.1	93.5%	Bacillus sp. 50-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
89	gb GU220063.1	99.8%	Arthrobacter sp. YM-M-25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EU927410.1	99.8%	Arthrobacter sp. 18-N-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EU668003.1	99.6%	Arthrobacter sp. BF-2-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	dbj AB259962.1	99.4%	Arthrobacter sp. PO-08 gene for 16S rRNA, partial sequence
92	emb FN667396.1	100.0%	Uncultured compost bacterium partial 16S rRNA gene, clone PS2630
	gb GU004020.1	100.0%	Uncultured bacterium clone 16SN37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

	gb FJ982660.1	100.0%	Bacillus cereus strain JBE0009 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	dbj AB295053.1	100.0%	Bacillus thuringiensis gene for 16S rRNA, strain: NK2
95	gb GQ262729.1	99.9%	Bacillus subtilis strain BS-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GQ262726.1	99.9%	Bacillus subtilis strain LC-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM055602.1	99.9%	Bacillus subtilis strain GD3b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GU471203.1	99.9%	Bacillus sp. Q2CJ5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
4	gb HM579812.1	100.0%	Bacillus sp. HY21(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM587993.1	100.0%	Bacillus subtilis strain BEC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM347450.1	100.0%	Bacillus subtilis strain 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM214542.1	100.0%	Bacillus subtilis strain NB-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
8	gb HM055608.1	100.0%	Bacillus amyloliquefaciens strain JS 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM055607.1	100.0%	Bacillus amyloliquefaciens strain JX 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM055604.1	100.0%	Bacillus amyloliquefaciens strain GD4b 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GQ213991.1	100.0%	Bacillus subtilis strain bs24 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
13	gb CP001746.1	100.0%	Bacillus cereus biovar anthracis str. CI, complete genome
	gb CP001746.1	100.0%	Bacillus cereus biovar anthracis str. CI, complete genome
	gb EU429660.1	100.0%	Bacillus thuringiensis serovar colmeri 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EF210296.1	100.0%	Bacillus mycoides strain BGSC 6A13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
16	gb HM579802.1	99.8%	Bacillus sp. HY11(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM152725.1	99.8%	Uncultured Bacillus sp. clone Filt.138 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GU568205.1	99.8%	Bacillus pumilus strain GBSC66 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GU568204.1	99.8%	Bacillus pumilus strain GBSW2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
17	gb HM579812.1	100.0%	Bacillus sp. HY21(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM587993.1	100.0%	Bacillus subtilis strain BEC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

	gb HM347450.1	100.0%	Bacillus subtilis strain 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM214542.1	100.0%	Bacillus subtilis strain NB-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
18	gb HM582688.1	100.0%	Bacillus altitudinis strain AP-MSU 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM543166.1	100.0%	Bacillus pumilus strain B50 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM480272.1	100.0%	Bacillus sp. PFB2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM480271.1	100.0%	Bacillus pumilus strain PFB 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
20	gb HM582688.1	100.0%	Bacillus altitudinis strain AP-MSU 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM543166.1	100.0%	Bacillus pumilus strain B50 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM480272.1	100.0%	Bacillus sp. PFB2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM480271.1	100.0%	Bacillus pumilus strain PFB 1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
21	gb HM579812.1	100.0%	Bacillus sp. HY21(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM587993.1	100.0%	Bacillus subtilis strain BEC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM347450.1	100.0%	Bacillus subtilis strain 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM214542.1	100.0%	Bacillus subtilis strain NB-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
23	gb HM579812.1	100.0%	Bacillus sp. HY21(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM587993.1	100.0%	Bacillus subtilis strain BEC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM347450.1	100.0%	Bacillus subtilis strain 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM214542.1	100.0%	Bacillus subtilis strain NB-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
26	gb HM579812.1	100.0%	Bacillus sp. HY21(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM587993.1	100.0%	Bacillus subtilis strain BEC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM347450.1	100.0%	Bacillus subtilis strain 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM214542.1	100.0%	Bacillus subtilis strain NB-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
32	gb HM579812.1	99.9%	Bacillus sp. HY21(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM587993.1	99.9%	Bacillus subtilis strain BEC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM347450.1	99.9%	Bacillus subtilis strain 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM214542.1	99.9%	Bacillus subtilis strain NB-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
36	gb HM579812.1	100.0%	Bacillus sp. HY21(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

	gb HM587993.1	100.0%	Bacillus subtilis strain BEC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM347450.1	100.0%	Bacillus subtilis strain 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM214542.1	100.0%	Bacillus subtilis strain NB-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
37	gb EF101707.1	100.0%	Bacillus subtilis strain HU48 16S ribosomal RNA ( <i>rrnE</i> ) gene, partial sequence
	gb HM579812.1	100.0%	Bacillus sp. HY21(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM587993.1	100.0%	Bacillus subtilis strain BEC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM347450.1	100.0%	Bacillus subtilis strain 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
40	gb HM579812.1	100.0%	Bacillus sp. HY21(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM587993.1	100.0%	Bacillus subtilis strain BEC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM347450.1	100.0%	Bacillus subtilis strain 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM214542.1	100.0%	Bacillus subtilis strain NB-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
45	gb HM579812.1	100.0%	Bacillus sp. HY21(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM587993.1	100.0%	Bacillus subtilis strain BEC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM347450.1	100.0%	Bacillus subtilis strain 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM214542.1	100.0%	Bacillus subtilis strain NB-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
46	gb HM579812.1	100.0%	Bacillus sp. HY21(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM587993.1	100.0%	Bacillus subtilis strain BEC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM347450.1	100.0%	Bacillus subtilis strain 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM214542.1	100.0%	Bacillus subtilis strain NB-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
51	gb AY236959.1	100.0%	Pseudomonas sp. PCL1171 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb FJ483527.1	99.9%	Pseudomonas sp. ICMP 11284 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb FJ483526.1	99.9%	Pseudomonas sp. ICMP 11283 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb AY014807.1	99.8%	Pseudomonas sp. NZ031 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
52	gb HM371418.1	100.0%	Bacillus pumilus strain UW-02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM103340.1	100.0%	Bacillus pumilus strain ZH20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GU904681.1	100.0%	Bacillus pumilus strain B313 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GU201861.1	100.0%	Bacillus safensis strain Zw-22-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

54	gb HM579812.1	100.0%	Bacillus sp. HY21(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM587993.1	100.0%	Bacillus subtilis strain BEC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM347450.1	100.0%	Bacillus subtilis strain 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM214542.1	100.0%	Bacillus subtilis strain NB-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
55	gb HM770098.1	99.9%	Bacillus thuringiensis strain ODPY 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	emb FN667396.1	99.9%	Uncultured compost bacterium partial 16S rRNA gene, clone PS2630
	gb FJ982662.1	99.9%	Bacillus cereus strain JB0013 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EU924505.1	99.9%	Bacillus mycoides strain BM-Y8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
59	gb HM459842.1	100.0%	Enterobacter sp. enrichment culture clone CL-h4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb FJ999766.1	100.0%	Enterobacter hormaechei strain SP-A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb FJ025770.1	100.0%	Enterobacter sp. 12-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EF059890.1	100.0%	Enterobacter hormaechei strain E904 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
71	gb EU977762.1	99.8%	Curtobacterium flaccumfaciens strain 2P04PE 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb FJ876396.1	99.8%	Curtobacterium sp. 3490BRRJ 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	ref NR_025467.1	99.8%	Curtobacterium flaccumfaciens pv. flaccumfaciens strain LMG 3645 16S ribosomal RNA
	gb EF411134.1	99.8%	Curtobacterium sp. C01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
82	gb HM579812.1	100.0%	Bacillus sp. HY21(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM587993.1	100.0%	Bacillus subtilis strain BEC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM347450.1	100.0%	Bacillus subtilis strain 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM214542.1	100.0%	Bacillus subtilis strain NB-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
84	gb HM579812.1	100.0%	Bacillus sp. HY21(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM587993.1	100.0%	Bacillus subtilis strain BEC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM347450.1	100.0%	Bacillus subtilis strain 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM214542.1	100.0%	Bacillus subtilis strain NB-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
90	gb GU220063.1	99.8%	Arthrobacter sp. YM-M-25 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

	gb EU927410.1	99.8%	Arthrobacter sp. 18-N-12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EU668003.1	99.7%	Arthrobacter sp. BF-2-2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	dbj AB259962.1	99.6%	Arthrobacter sp. PO-08 gene for 16S rRNA, partial sequence
93	gb HM579812.1	100.0%	Bacillus sp. HY21(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM587993.1	100.0%	Bacillus subtilis strain BEC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM347450.1	100.0%	Bacillus subtilis strain 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM214542.1	100.0%	Bacillus subtilis strain NB-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
96	gb HM579812.1	100.0%	Bacillus sp. HY21(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM587993.1	100.0%	Bacillus subtilis strain BEC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM214542.1	100.0%	Bacillus subtilis strain NB-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM165188.1	100.0%	Bacillus sp. PS4 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
97	gb HM579794.1	100.0%	Bacillus sp. HY3(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM061611.1	100.0%	Bacillus megaterium strain SZ-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM103321.1	100.0%	Bacillus megaterium strain ZH1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM104462.1	100.0%	Bacillus sp. B2(2010b) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
98	gb HM579812.1	100.0%	Bacillus sp. HY21(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM587993.1	100.0%	Bacillus subtilis strain BEC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM347450.1	100.0%	Bacillus subtilis strain 5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM214542.1	100.0%	Bacillus subtilis strain NB-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
99	gb EU835733.1	89.0%	Bacillus megaterium strain DS8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb AY372926.1	89.0%	Bacillus sp. PC1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM027880.1	89.0%	Bacillus megaterium strain RKJ 600 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GU377101.1	89.0%	Bacillus sp. sptzw10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
100	gb HM579812.1	100.0%	Bacillus sp. HY21(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM587993.1	100.0%	Bacillus subtilis strain BEC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM214542.1	100.0%	Bacillus subtilis strain NB-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM165188.1	100.0%	Bacillus sp. PS4 16S ribosomal RNA gene, complete sequence

101	gb HM579812.1	100.0%	Bacillus sp. HY21(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM587993.1	100.0%	Bacillus subtilis strain BEC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM214542.1	100.0%	Bacillus subtilis strain NB-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM165188.1	100.0%	Bacillus sp. PS4 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
102	gb EU741027.1	100.0%	Curtobacterium sp. Fek11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb EU741014.1	100.0%	Curtobacterium sp. AeL09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	emb AM410690.1	100.0%	Curtobacterium citreum partial 16S rRNA gene, type strain DSM 20528
	gb AY273210.1	100.0%	Curtobacterium flaccumfaciens pv. basellae 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
103	gb HM770098.1	98.2%	Bacillus thuringiensis strain ODPY 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	emb FN667396.1	98.2%	Uncultured compost bacterium partial 16S rRNA gene, clone PS2630
	gb GU004020.1	98.2%	Uncultured bacterium clone 16SN37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb FJ982662.1	98.2%	Bacillus cereus strain JB0013 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
104	dbj AB558527.1	99.6%	Bacillus sp. NCCP-157 gene for 16S rRNA, partial sequence
	gb GU322372.1	99.6%	Bacillus sp. hdly0220 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GQ861470.1	99.6%	Bacillus subtilis strain LZHC11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GQ861469.1	99.6%	Bacillus subtilis strain LZHC10 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
105	gb HM770098.1	99.9%	Bacillus thuringiensis strain ODPY 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	emb FN667396.1	99.9%	Uncultured compost bacterium partial 16S rRNA gene, clone PS2630
	gb GU004020.1	99.9%	Uncultured bacterium clone 16SN37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb FJ982662.1	99.9%	Bacillus cereus strain JB0013 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
106	gb DQ981829.1	99.9%	Uncultured bacterium clone 9-gw2-su5-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM579812.1	99.9%	Bacillus sp. HY21(2010) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM587993.1	99.9%	Bacillus subtilis strain BEC-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb HM214542.1	99.9%	Bacillus subtilis strain NB-01 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
107	ref NR_028634.1	99.8%	Sphingomonas yabuuchiae strain A1-18 16S ribosomal RNA, partial sequence
	dbj AB193921.1	99.6%	Uncultured bacterium gene for 16S rRNA, partial sequence
	gb EF550155.1	99.5%	Sphingomonas sp. GW5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

	gb EU741025.1	99.5%	Sphingomonas sp. Fek09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
108	gb GQ157160.1	94.5%	Uncultured bacterium clone 16slp101-1g08.p1k 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	emb FM213382.2	94.5%	Stenotrophomonas maltophilia partial 16S rRNA gene, strain MN6
	emb FM213378.2	94.5%	Stenotrophomonas maltophilia partial 16S rRNA gene, strain KJPB14
	gb FJ493144.1	94.5%	Stenotrophomonas sp. bmh-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
109	gb HM027569.1	99.9%	Bacillus subtilis strain zj2008 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GU980947.1	99.9%	Bacillus subtilis strain CICC 10023 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GU332606.1	99.9%	Bacillus subtilis strain BZ1-11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
	gb GU250454.1	99.9%	Bacillus subtilis strain BFE 5320 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

**Anexo C: Resultado del análisis estadístico del efecto de los sustratos foliares sobre la mezcla de bacterias líticas para la variable ufc.mL a nivel *in vitro***

Tratamiento; Unweighted Means (In Vitro) Current effect: F(16, 199)=6,7678, p=,00000 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Tratamiento	ufc/ml Mean	ufc/ml Std.Err.	ufc/ml -95,00%	ufc/ml +95,00%	N
1	T1	59170	41089	-21855	140197	24
2	T2	1003	581089	-113584	115591	12
3	T4	583	581089	-114004	115171	12
4	T3	171333	581089	56745	285921	12
5	T5	3250	581089	-111338	117838	12
6	T6	60750	581089	-53838	175338	12
7	T8	2335	581089	-112253	116923	12
8	T9	11170	581089	-103418	125758	12
9	T10	5333	581089	-109254	119921	12
10	T11	2500	581089	-112088	117088	12
11	T16	2500	581089	-112088	117088	12
12	T18	59916	581089	-54671	174504	12
13	T15	2166	581089	-112421	116754	12
14	T12	555166	581089	440578	669754	12
15	T17	34333	581089	-80254	148921	12
16	T13	343336	581089	228748	457924	12
17	T0	3833	581089	-110754	118421	12

Univariate Tests of Significance for ufc/ml (In Vitro) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	1,264672E+1	1	1,264672E+1	31,21125	0,000000
Tratamiento	4,387660E+1	16	2,742287E+1	6,76778	0,000000
Error	8,063429E+1	199	4,051974E+1		

**Anexo D: Resultado del análisis estadístico del efecto de los sustratos foliares sobre las bacterias quitinolíticas para la variable ufc.cm<sup>2</sup> bajo cubierta (casa de mallas).**

Tratamiento; Unweighted Means (Spreadsheet1)						
Current effect: F(5, 120)=1,0081, p=,41606						
Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Tratamiento	ufc/cm2q Mean	ufc/cm2q Std.Err.	ufc/cm2q -95,00%	ufc/cm2q +95,00%	N
1	T1	1	194366	-384832	384832	21
2	T2	201	194366	-384812	384852	21
3	T3	478095	194366	93262	862927	21
4	T4	63	194366	-384826	384838	21
5	T5	3810	194366	-384451	385213	21
6	TC	4	194366	-384832	384832	21

Univariate Tests of Significance for ufc/cm2q (Spreadsheet)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	8,013783E+1	1	8,013783E+1	1,01012	0,31689
Tratamiento	3,998702E+1	5	7,997405E+1	1,00805	0,41606
Error	9,520158E+1	120	7,933465E+1		

**Anexo E: Resultado del análisis estadístico del efecto de los sustratos foliares sobre las bacterias glucanólíticas para la variable ufc.cm<sup>2</sup> bajo cubierta (casa de mallas).**

Tratamiento; Unweighted Means (Cubierta) Current effect: F(5, 120)=,57005, p=,72281 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Tratamiento	ufc/cm2hc Mean	ufc/cm2hc Std.Err.	ufc/cm2hc -95,00%	ufc/cm2hc +95,00%	N
1	T1	2,024219E+1	4,234464E+1	-6,359725E+1	1,040816E+1	21
2	T2	6,089913E+1	4,234464E+1	-2,294030E+1	1,447386E+1	21
3	T3	1,002493E+1	4,234464E+1	-7,381451E+1	9,386437E+1	21
4	T4	6,870042E+1	4,234464E+1	-1,513902E+1	1,525399E+1	21
5	T5	8,215503E+1	4,234464E+1	-1,684406E+0	1,659945E+1	21
6	T0	8,534869E+1	4,234464E+1	1,509253E+0	1,691881E+1	21

Univariate Tests of Significance for ufc/cm2hc (Cubierta) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	3,750998E+2	1	3,750998E+2	9,961636	0,002027
Tratamiento	1,073237E+2	5	2,146473E+2	0,570045	0,722805
Error	4,518533E+2	120	3,765444E+2		

**Anexo F:**  
**Resultado del análisis estadístico del antagonismo de las bacterias líticas sobre *M. fijiensis*. Peso seco**

Cepa; Unweighted Means (Spreadsheet: Current effect: F(42, 86)=3,0094, p=,000 Effective hypothesis decomposition				
Cell No.	Cepa	Peso seco Mean	Peso seco Std.Err.	Peso seco -95,00%
1	1	0,01766	0,00723	0,0032
2	5	0,00666	0,00723	-0,0077
3	6	0,01310	0,00723	-0,0012
4	10	0,01196	0,00723	-0,0024
5	14	0,00193	0,00723	-0,0124
6	19	0,00206	0,00723	-0,0123
7	22	0,00076	0,00723	-0,0136
8	26	0,00153	0,00723	-0,0128
9	28	0,00076	0,00723	-0,0136
10	29	0,00233	0,00723	-0,0120
11	32	0,00256	0,00723	-0,0118
12	33	0,00266	0,00723	-0,0117
13	38	0,02923	0,00723	0,0148
14	41	0,00106	0,00723	-0,0133
15	44	0,00143	0,00723	-0,0129
16	48	0,00340	0,00723	-0,0109
17	50	0,00373	0,00723	-0,0106
18	53	0,00466	0,00723	-0,0097
19	56	0,01820	0,00723	0,0038
20	57	0,00156	0,00723	-0,0128
21	58	0,00930	0,00723	-0,0050
22	60	0,01010	0,00723	-0,0042
23	64	0,03500	0,00723	0,0206
24	67	0,00080	0,00723	-0,0135
25	68	0,01250	0,00723	-0,0018
26	70	0,02800	0,00723	0,0136
27	73	0,00980	0,00723	-0,0045
28	74	0,00493	0,00723	-0,0094
29	75	0,04876	0,00723	0,0343
30	76	0,00333	0,00723	-0,0110
31	77	0,05026	0,00723	0,0358
32	78	0,02683	0,00723	0,0124
33	79	0,00743	0,00723	-0,0069
34	80	0,01666	0,00723	0,0022
35	81	0,00506	0,00723	-0,0093
36	86	0,01026	0,00723	-0,0041
37	88	0,01746	0,00723	0,0030
38	89	0,00080	0,00723	-0,0135
39	92	0,00086	0,00723	-0,0135
40	95	0,00210	0,00723	-0,0122
41	Mix 1	0,00000	0,00723	-0,0143
42	Mix 2	0,00146	0,00723	-0,0129
43	Testigo	0,02320	0,00723	0,0088

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet4 in Workbook) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
GENERAL Effect	Degr. of Freedom	Peso seco SS	Peso seco MS	Peso seco F	Peso seco p
Intercept	1	0,014273	0,014273	90,97941	0,000000
Cepa	42	0,019828	0,000472	3,00936	0,000008
Error	86	0,013492	0,000157		
Total	128	0,033320			

**Anexo G: Resultado del análisis estadístico de la compatibilidad de las bacterias líticas con fungicidas y aceite para la variable ufc.mL**

Tratamiento; Unweighted Means (compat) Current effect: F(10, 253)=27,812, p=0,0000 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Tratamiento	ufc/ml Mean	ufc/ml Std.Err.	ufc/ml -95,00%	ufc/ml +95,00%	N
1	BC	0,00	1028,12	-2024,7	2024,7	24
2	B3	4758,3	1028,12	2733,5	6783,1	24
3	B1	5354,1	1028,12	3329,4	7378,9	24
4	CC	0,00	1028,12	-2024,7	2024,7	24
5	C1	11975,0	1028,12	9950,2	13999,7	24
6	C10	5268,7	1028,12	3243,9	7293,5	24
7	SC	337,5	1028,12	-1687,2	2362,2	24
8	S0.1	2239,5	1028,12	214,8	4264,3	24
9	S1	5989,5	1028,12	3964,8	8014,3	24
10	A	7500,0	1028,12	5475,2	9524,7	24
11	TC	17725,0	1028,12	15700,2	19749,7	24

Univariate Results for Each DV (compat) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
GENERAL Effect	Degr. of Freedom	ufc/ml SS	ufc/ml MS	ufc/ml F	ufc/ml p
Intercept	1	8,157966E+0	8,157966E+0	321,5742	0,00
Tratamiento	10	7,055624E+0	7,055624E+0	27,8122	0,00
Error	253	6,418318E+0	2,536885E+0		
Total	263	1,347394E+1			

**Anexo H: Resultado del análisis estadístico de la compatibilidad de las bacterias líticas con fungicidas y aceite para la variable halo.**

Tratamiento; Unweighted Means (compat) Current effect: F(10, 253)=60,482, p=0,0000 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Tratamiento	Halo Mean	Halo Std.Err.	Halo -95,00%	Halo +95,00%	N
1	BC	0,00000	0,14053	-0,27676	0,27676	24
2	B3	2,66666	0,14053	2,38990	2,94342	24
3	B1	2,41666	0,14053	2,13990	2,69342	24
4	CC	0,00000	0,14053	-0,27676	0,27676	24
5	C1	1,50000	0,14053	1,22323	1,77676	24
6	C10	1,54166	0,14053	1,26490	1,81842	24
7	SC	0,16666	0,14053	-0,11009	0,44342	24
8	S0.1	1,25000	0,14053	0,97323	1,52676	24
9	S1	2,37500	0,14053	2,09823	2,65176	24
10	A	0,50000	0,14053	0,22323	0,77676	24
11	TC	2,83333	0,14053	2,55657	3,11009	24

Univariate Results for Each DV (compat) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
GENERAL Effect	Degr. of Freedom	Halo SS	Halo MS	Halo F	Halo p
Intercept	1	507,409	507,409	1070,53	0,00
Tratamiento	10	286,674	28,667	60,482	0,00
Error	253	119,916	0,474		
Total	263	406,590			

**Anexo I: Resultado del análisis estadístico del efecto de los sustratos foliares solos y en mezcla con fungicida y aceite mineral sobre la Sigatoka negra.**

Tratamiento; Unweighted Means (Spreadsheet1) Current effect: F(8, 108)=13,454, p=,00000 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Tratamiento	PPI Mean	PPI Std.Err.	PPI -95,00%	PPI +95,00%	N
1	1	116,024	3,48965	109,107	122,942	14
2	2	119,401	3,48965	112,484	126,318	14
3	3	102,948	3,37132	96,265	109,630	15
4	4	108,853	3,37132	102,170	115,536	15
5	5	104,008	3,62138	96,830	111,186	13
6	6	96,276	3,62138	89,098	103,454	13
7	7	102,870	4,12901	94,685	111,054	10
8	8	72,475	3,93686	64,671	80,278	11
9	9	113,067	3,76925	105,595	120,538	12

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
GENERAL Effect	Degr. of Freedom	PPI SS	PPI MS	PPI F	PPI p
Intercept	1	124376	124376	7295,31	0,00000
Tratamiento	8	1835	229	13,45	0,00000
Error	108	1841	170		
Total	116	3676			

Tratamiento; Unweighted Means (Enfermedad) Current effect: F(8, 108)=10,324, p=,00000 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Tratamiento	IS Mean	IS Std.Err.	IS -95,00%	IS +95,00%	N
1	1	4310,63	187,099	3939,77	4681,50	14
2	2	4484,14	187,099	4113,27	4855,00	14
3	3	3177,44	180,754	2819,16	3535,73	15
4	4	3431,19	180,754	3072,90	3789,48	15
5	5	3377,82	194,161	2992,95	3762,68	13
6	6	3119,62	194,161	2734,76	3504,49	13
7	7	3208,95	221,378	2770,14	3647,76	10
8	8	2632,16	211,076	2213,77	3050,55	11
9	9	4175,75	202,090	3775,17	4576,33	12

Univariate Results for Each DV (Enfermedad)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
GENERAL Effect	Degr. of Freedom	IS SS	IS MS	IS F	IS p
Intercept	1	1,446504E+0	1,446504E+0	2951,54	0,000000
Tratamiento	8	4,047756E+0	5,059695E+0	10,32	0,000000
Error	108	5,292912E+0	4,900845E+0		
Total	116	9,340668E+0			

**Anexo J: Resultado del análisis estadístico del efecto de sustratos foliares solos y en mezcla con fungicida para la variable ufc.cm<sup>2</sup> de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas en parcelas experimentales.**

tratamiento; Unweighted Means (Spreadsheet1)						
Current effect: F(5, 570)=,89313, p=,48526						
Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	tratamiento	ufc/cm2hc Mean	ufc/cm2hc Std.Err.	ufc/cm2hc -95,00%	ufc/cm2hc +95,00%	N
1	0	51253437	24666051	28059939	9,970088E+0	96
2	1	78885658	24666051	30438214	1,273331E+0	96
3	2	37059687	24666051	-11387756	8,550713E+0	96
4	3	40049329	24666051	-8398114	8,849677E+0	96
5	4	96193383	24666051	47745939	1,446408E+0	96
6	5	52796137	24666051	43486939	1,012436E+0	96

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
GENERAL Effect	Degr. of Freedom	ufc/cm2hc SS	ufc/cm2hc MS	ufc/cm2hc F	ufc/cm2hc p
Intercept	1	2,030484E+2	2,030484E+2	34,7639	0,000000
tratamiento	5	2,608277E+1	5,216554E+1	0,89313	0,48526
Error	570	3,329242E+2	5,840775E+1		
Total	575	3,355325E+2			

tratamiento; Unweighted Means (Spreadsheet1) Current effect: F(5, 570)=1,3895, p=,22640 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	tratamiento	ufc/cm2q Mean	ufc/cm2q Std.Err.	ufc/cm2q -95,00%	ufc/cm2q +95,00%	N
1	0	91203,4	26726,2	38709,4	143697,4	96
2	1	95339,4	26726,2	42845,4	147833,4	96
3	2	152175,4	26726,2	99681,4	204669,4	96
4	3	157027,4	26726,2	104533,4	209521,4	96
5	4	142067,4	26726,2	89573,4	194561,4	96
6	5	94377,4	26726,2	41883,4	146871,4	96

Univariate Results for Each DV (Spreadsheet1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
GENERAL Effect	Degr. of Freedom	ufc/cm2q SS	ufc/cm2q MS	ufc/cm2q F	ufc/cm2q p
Intercept	1	8,577644E+1	8,577644E+1	125,089	0,00000
tratamiento	5	4,763919E+1	9,527837E+1	1,3895	0,22639
Error	570	3,908608E+1	6,857207E+1		
Total	576	3,956247E+1			

**Anexo K: Resultado del análisis estadístico del efecto de los inductores de resistencia sobre la mezcla de bacterias líticas para la variable ufc.mL y halo *in vitro***

Tratamiento; Unweighted Means (Spreadsheet1) Current effect: F(4, 49)=1,9517, p=,11673 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Tratamiento	ufc/ml Mean	ufc/ml Std.Err.	ufc/ml -95,00%	ufc/ml +95,00%	N
1	T0	45550,0	14230,5	16952,0	74147,3	10
2	T1	45550,0	14230,5	-24042,0	331523,0	10
3	T2	31000,0	14230,5	-25497,0	316973,0	10
4	T3	0,0	12990,6	-26105,0	261057,0	12
5	T4	0,0	12990,6	-26105,0	261057,0	12

Univariate Tests of Significance for ufc/ml (Spreadsheet1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	6,065940E+1	1	6,065940E+1	2,99539	0,08979
Tratamiento	1,580943E+1	4	3,952359E+1	1,95169	0,11672
Error	9,922926E+1	49	2,025087E+1		

Tratamiento; Unweighted Means (Spreadsheet1) Current effect: F(4, 49)=1,9282, p=,12058 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Tratamiento	Halo Mean	Halo Std.Err.	Halo -95,00%	Halo +95,00%	N
1	T0	0,200000	0,080812	0,037602	0,362398	1
2	T1	0,200000	0,080812	0,037602	0,362398	1
3	T2	0,000000	0,080812	-0,162398	0,162398	1
4	T3	0,000000	0,073771	-0,148249	0,148249	1
5	T4	0,000000	0,073771	-0,148249	0,148249	1

Univariate Tests of Significance for Halo (Spreadsheet1) Sigma-restricted parameterization Effective hypothesis decomposition					
Effect	SS	Degr. of Freedom	MS	F	p
Intercept	0,342857	1	0,342857	5,250000	0,026285
Tratamiento	0,503704	4	0,125926	1,928247	0,120580
Error	3,200000	49	0,065306		

**Anexo L: Resultado del análisis estadístico del efecto de los inductores de resistencia sobre las bacterias quitinolíticas y glucanolíticas para la variable ufc.cm<sup>2</sup> bajo cubierta.**

Tratamiento; Unweighted Means (Inductores B Datos) Current effect: F(4, 235)=1,0440, p=,38522 Effective hypothesis decomposition						
Cell No.	Tratamiento	ufc/cm2 hc Mean	ufc/cm2 hc Std.Err.	ufc/cm2 hc -95,00%	ufc/cm2 hc +95,00%	N
1	0	1177675	922177,9	-639117	2994467	48
2	1	1172642	922177,9	-644150	2989434	48
3	2	226500	922177,9	-1794142	1839442	48
4	3	333300	922177,9	-1813459	1820125	48
5	4	2252508	922177,9	435716	4069300	48

Univariate Results for Each DV (Inductores B Datos)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
GENERAL Effect	Degr. of Freedom	ufc/cm2 hc SS	ufc/cm2 hc MS	ufc/cm2 hc F	ufc/cm2 hc p
Intercept	1	2,056883E+1	2,056883E+1	5,038938	0,025715
Tratamiento	4	1,704553E+1	4,261382E+1	1,043950	0,385216
Error	235	9,592648E+1	4,081978E+1		
Total	239	9,763103E+1			

Tratamiento; Unweighted Means (Inductores B Datos)				
Current effect: F(4, 235)=3,2187, p=,0134				
Effective hypothesis decomposition				
Cell No.	Tratamiento	ufc/cm2 q Mean	ufc/cm2 q Std.Err.	ufc/cm2 q -95% CI
1	0	605,8333	148,9275	311,9783
2	1	8,3333	148,9275	-28,6209
3	2	9,4167	148,9275	-28,1941
4	3	1,3333	148,9275	-29,2608
5	4	14,8333	148,9275	-27,6009

Univariate Results for Each DV (Inductores B Datos)					
Sigma-restricted parameterization					
Effective hypothesis decomposition					
GENERAL Effect	Degr. of Freedom	ufc/cm2 q SS	ufc/cm2 q MS	ufc/cm2 q F	ufc/cm2 q p
Intercept	1	392908	392908	3,69063	0,05592
Tratamiento	4	1370678	342669	3,21873	0,01347
Error	235	25018347	106461		
Total	239	26389025			

### Anexo M: Costo del sustrato foliar (precios 2010)

Componentes del sustrato	Cantidad L-1 de sustrato	Cantidad. Ha-1	Valor comercial de c/producto	Valor en litro de sustrato	Valor. Ha-1 (pesos)	Valor US. Ha-1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (gr)	1	18,927	8352/kilo	8,35	158,04	0,0834374
MgSO <sub>4</sub> (gr)	0,5	9,4635	1050/kilo	0,52	9,84204	0,0051961
NaCl (gr)	1	18,927	850/kilo	0,85	16,088	0,0084936
CaNO <sub>3</sub> (gr)	1	18,927	2436/kilo	2,44	46,1819	0,0243817
Harina de cebada (gr)	25	473,175	2000 /kilo	50	946,35	0,4996252
Urea (gr)	40	757,08	1300/kilo	52	984,204	0,5196102
Neofat (mL)	1	18,927	18500 /litro	18,5	350,15	0,1848613
<b>Costo Total</b>					2510,86	1,3256055