

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

Lina María Salazar Peláez¹, Luis Fernando Patiño Hoyos² y Elkin Bustamante Rojas³

RESUMEN

La Sigatoka Negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, es considerada la enfermedad de mayor importancia económica para los cultivos de musáceas alimenticias. Su control, se fundamenta en la aplicación de fungicidas sintéticos, cuyo modo de acción viene siendo vulnerado por poblaciones del hongo. La presente investigación, ha explorado la posibilidad de desarrollar una estrategia de regulación biológica, basada en el estudio y manipulación de algunos de los factores bióticos y abióticos que interactúan en la filosfera de banano, con el objetivo de incrementar las poblaciones epífitas naturales de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas, las cuales pueden afectar negativamente la germinación del patógeno. Con base en una fase previa a este estudio, en la cual se realizó una caracterización químico-microbiológica parcial de la filosfera de plantas de banano y plátano bajo condiciones del Urabá antioqueño (Colombia), se evaluaron 14 sustratos foliares, compuestos por quitina coloidal (QC) [4 %], harina de cebada (HC) [2,5 %] y urea (U) [1 %], solas ó en combinación, los cuales siempre estuvieron acompañados de una solución mineral base y una solución adherente-dispersante. Aquellos sustratos a base de HC y U, produjeron los mayores incrementos en las poblaciones de bacterias líticas epífitas, con recuentos superiores a las 10.000 veces, con respecto a sus poblaciones iniciales sobre hojas de banano del cultivar Gran Enano, y de hasta 8,6 y 15 veces mayores para las bacterias quitinolíticas y glucanolíticas respectivamente, con relación a la población en el tratamiento sin sustratos foliares. Se discute la influencia de la precipitación sobre las poblaciones de dichas bacterias líticas y la necesidad de ajustar una formulación que mejore las posibilidades de control sobre la sigatoka negra.

Palabras clave: Filosfera, *Mycosphaerella fijiensis*, sigatoka negra, biorregulación.

¹ Bacterióloga. Instituto Colombiano de Medicina Tropical – CES. Carrera 43A # 525-99. Sabaneta, Colombia. <lmsalazar@ces.edu.co>

² Profesor. Politécnico Colombiano "Jaime Isaza Cadavid". A.A. 4932, Medellín, Colombia. <luisferph@gmail.com>

³ Consultor en Manejo Integrado de Plagas. CATIE. Apartado Postal. 7170 Turrialba, Costa Rica <elkinbustamante@hotmail.com>

Recibido: Agosto 2 de 2005; aceptado: Mayo 19 de 2006.

Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín. Vol.59,No.2. p.3449-3465. 2006.

ABSTRACT

FOLIAR SUBSTRATES FOR INCREASING CHITINOLYTIC AND GLUCANOLYTIC BACTERIA ON PHYLLOSHERE OF BANANA

*Black Sigatoka, caused by the fungus **Mycosphaerella fijiensis** Morelet, is considered the economically most important disease of banana and plantain crops. Its control has been based on the use of synthetic fungicides, whose mode of action becomes overcome by the fungus populations. This research explored the possibility of developing a biological regulation strategy based on the study and manipulation of certain biotic and abiotic factors that interact in the phyllosphere of the banana, with the objective of increase the natural populations of chitinolytic and glucanolytic bacteria, which could negatively affect the germination process of **M. fijiensis**. On the basis of a previous phase of this study in which a partial chemical and microbiological characterization in the phyllosphere of banana and plantain crops under conditions of Uraba-Antioquia (Colombia), was conducted here 14 foliar substrates were evaluated that consisted of colloidal chitin (CC) [4%], barley flour (BF) [2,5%] and urea (U) [1%], individually or in a combination, always with a mineral base and attachment-dispersant solutions. Those substrates that had a combination of BF and U yielded higher increases in the epiphytic lytic bacterial populations, with counts exceeding 10.000 fold with respect to their their initial populations on banana leaves of the 'Grande naine' variety and 8,6 y 15 fold higher in populations of chitinolytic and glucanolytic bacteria, respectively, with respect to the population without foliar substrate treatments. The effect of rainfall on bacteria populations and the necessity of adjusting a formulation that improves the possibilities of foliar substrates for black sigatoka control are discussed.*

Key Words: Phyllosphere, *Mycosphaerella fijiensis*, Black Sigatoka, biological control.

La Sigatoka Negra, causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, se ha constituido en la enfermedad de mayor impacto económico para la industria de banano de exportación en el mundo, en Colombia los costos del control químico de la enfermedad varían entre US\$700 y 900/hectárea al año; cifra que representa el 46 % del valor global de los agroquímicos y cerca del 14 % de los costos totales de producción de la fruta (Chica *et al.* 2004). La enfermedad produce una rápida destrucción del área foliar de la planta, la cual reduce el área fotosintética y produce un efecto detrimental sobre la calidad de la fruta, con una reducción de hasta un 60 % en el peso del racimo, cuando no se implementa una medida química de

control (Belálcazar 1991, citado por Chica *et al.* 2004). Adicionalmente, se presenta una maduración prematura de los racimos, lo cual es la principal causa de pérdidas ocasionadas por la enfermedad (Marín y Romero 1992).

Básicamente, la enfermedad se ha controlado mediante la aplicación de fungicidas sintéticos, cuyo costo varía en Colombia entre 700 y 900 dólares/hectárea al año, cifra que representa el 13,8 % de los costos totales de producción del banano y el 46 % del valor total de los agroquímicos (Chica *et al.* 2004). Sin embargo, la efectividad de esta medida de control ha disminuido debido a múltiples factores, entre ellos: cambios en la incidencia y severidad de la enfermedad, condiciones particulares

en cada una de las fincas que favorecen el establecimiento y diseminación del patógeno, y principalmente al incremento de las poblaciones del hongo con menor sensibilidad a los fungicidas sistémicos empleados (Patiño 2003, Chica *et al.* 2004). Situación agravada por el número reducido de grupos químicos disponibles actualmente para controlar la enfermedad y la no disponibilidad a corto y mediano plazo de moléculas fungicidas con novedosos modos de acción sobre el patógeno.

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

Dentro de la regulación biológica de fitopatógenos, una de las estrategias consiste en el uso de microorganismos antagonistas productores de sustancias antibióticas y/o enzimas líticas que actúan sobre sus esporas o tubos ger-

minativos -en su fase epifita 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 ascomietos ha demostrado ser de utilidad, pues la pared celular de dichos hongos está constituida principalmente por microfibrillas de quitina y β -glucanos, hecho que los hace sensibles al ataque de estas enzimas, especialmente a nivel de la hifa (Sahai y Manocha 1993, Alexopoulos, Mims, y Blackwell 1996, Mahadevan y Crawford 1997, Cohen-Kupiec y Chet 1998). Esta bioregulación mediante el uso de bacterias líticas antagonistas, ha sido estudiada con diversos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora fragariae* var. *rubi*, *Phytophthora capsici*, *Sclerotium rolfsii*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*, *Bipolaris sorokiniana* y *Pseudomonas syringae* pv. *tomate*, entre otros (Chernin *et al.* 1995, Valois *et al.* 1996, Ordentlich, Elad and Chet 1998, Sing *et al.* 1999, Zhang y Yuen 2000, Parra y Ramírez 2002, Ji y Wilson 2003, Sid Ahmed *et al.* 2003).

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

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

Por otro lado, se ha demostrado que las poblaciones del microorganismo antagonista pueden ser incrementadas mediante la aplicación de sustratos foliares que las favorezcan nutricionalmente, aumentando consecuentemente su actividad biorreguladora (Davis *et al.* 2002, Fokkema *et al.* 1979, Ploper, Backman y Rodriguez-Kabana 1992, Stadler y Mueller 1996), en lugar de la aplicación directa y masiva de los agentes biológicos de control, evitando los riesgos potenciales asociados a este tipo de aplicación en campo. La quitina ha sido aplicada como sustrato junto con la bacteria *Bacillus cereus* cepa 304 para el control de la mancha foliar en maní causada por *Cercospora arachidicola*, incrementándose el tamaño poblacional de la bacteria sobre las hojas

y resultando en un control significativo de la enfermedad (Kokalis-Burelle *et al.* 1992). Los aminoácidos también han sido utilizados como sustratos para incrementar el tamaño poblacional de cepas de bacterias antagonistas no patogénicas sobre frutas de manzana, logrando un control mejorado del moho azul que afecta esta fruta (Janisiewicz, Usall y Bors 1992). Se ha reportado también que la aplicación de metionina incrementó el tamaño poblacional del agente de control biológico *Pseudomonas putida* AP-1 en el suelo, donde la supresión de la marchitez por *Fusarium* en tomate fue mayor cuando la bacteria fue aplicada con el aminoácido en relación a su aplicación individual (Yamada y Ogiso 1997).

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

En el caso de las estrategias de regulación biológica para *M. fijiensis*,

se han realizado algunas investigaciones basadas en la aplicación de bacterias antagonistas productoras de quitinasas y/o β -glucanasas -aisladas de la filosfera de banano y plátano-, solas ó en combinación con sustratos foliares de diversas características nutricionales - compuestas por quitina coloidal, leche y melaza, entre otros- (González *et al.* 1996, Ruíz-Silvera *et al.* 1997, Arango 2000); no obstante, es necesario dirigir la aplicación de estas sustratos con base en una caracterización previa de la filosfera de banano, al menos en sus componentes químico nutricional (minerales, carbohidratos y proteínas) y de poblaciones nativas de bacterias con potencial lítico sobre el hongo causante de la Sigatoka Negra. Con base en lo anterior, el objetivo del presente trabajo consistió en evaluar diversos sustratos foliares -a base de quitina coloidal y harina de cebada, como fuentes de quitina y β -(1,3) glucanos, respectivamente-, a partir de una caracterización química y microbiológica de la filosfera de banano, para favorecer nutricionalmente, y de manera selectiva, a las poblaciones epifitas de bacterias quitinolíticas y/o glucanolíticas nativas de la filosfera de banano, como punto de partida para formular sustratos foliares con potencial de control sobre la Sigatoka Negra.

MATERIALES Y MÉTODOS

Composición de los sustratos. Se evaluaron catorce tratamientos y seis testigos, elaborados a partir de los siguientes compuestos:

- Solución mineral base (SMB), compuesta de: 1 g/l de K_2HPO_4 (Mallinckrodt),

0,5 g/l de $MgSO_4$ (JT Baker), 1 g/l de NaCl (Carlo Erba) y 1g/l de $Ca(NO_3)_2$ (Protokimica) -los cuales aportan minerales a las poblaciones microbianas epifitas, adicionales a los ya presentes en el filoplano (Salazar 2005). Una sal de calcio fue incluida en la solución, debido a que se ha reportado que este catión puede afectar negativamente la germinación de las esporas e inhibir enzimas fundamentales involucradas en el proceso infectivo de hongos fitopatógenos; así como, producir un reforzamiento de la pared celular vegetal (Conway *et al.* 1991, Wisniewski *et al.* 1995, Biggs *et al.* 1997 y Chardonnet *et al.* 2000, citados por Patiño 2002).

- Solución dispersante, adherente y reveladora (SDAR), compuesta de: 0,4 g/l de Ag-RHO DEP-775 (Rhodia North American Chemicals), 0,4 ml/L de Tween 80 (Merck-Schuchardt), 0,2 ml/l de aceite vegetal (Oleocali) y 0,4 g/L de rojo congo (Amresco). En esta solución, los tres primeros componentes actúan como agentes surfactantes; mientras que el rojo congo, permite evidenciar la cobertura de la hoja tratada luego de la aspersión del sustrato.

- Quitina coloidal (QC), a una concentración de 40 ml/l, de acuerdo a Arango 2002.

- Harina de cebada (HC), a una concentración de 25 g/l. La cebada, constituye uno de los cereales con mayor contenido de β -glucanos -en términos de porcentaje de peso seco- (Michniewicz, Kołodziejczyk y Obuchowski 2003) y la harina que de ella se obtiene, contiene casi la misma proporción de β - glucanos que el grano entero (Holmes 1991).

Razón por la cual, fue escogida como la fuente primaria de β -(1,3) glucanos.

- Urea de uso agropecuario (U) (46%) en concentración de 21,7 g/l.

Tanto la quitina coloidal como la harina de cebada y la urea, se evaluaron solas o en combinación entre ellas. Los dos primeros compuestos, actúan como fuentes de carbono selectivas para las

poblaciones de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas respectivamente; mientras que la urea, además de servir como una fuente de nitrógeno, podría actuar también inhibiendo el desarrollo de los pseudotecios y la producción de ascosporas de *M. fijiensis*, con base en el estudio de Mondal y Timmer (2003) sobre *Mycosphaerella citri*. La descripción de todos los tratamientos se indica en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición de los sustratos foliares, elaborados para incrementar poblaciones de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas sobre hojas de banano.

Tratamiento	Composición
T1	SMB + SDAR + QC
T2	SMB + SDAR + QC + SB
T3	SMB + SDAR + HC
T4	SMB + SDAR + HC + SB
T5	SMB + SDAR + U
T6	SMB + SDAR + U + SB
T7	SMB + SDAR + QC + HC
T8	SMB + SDAR + QC + HC + SB
T9	SMB + SDAR + QC + U
T10	SMB + SDAR + QC + U + SB
T11	SMB + SDAR + HC + U
T12	SMB + SDAR + HC + U + SB
T13	SMB + SDAR + QC + HC + U
T14	SMB + SDAR + QC + HC + U + SB
T15	Testigo agua
T16	Testigo control convencional
T17	Testigo SMB
T18	Testigo SMB + SDAR
T19	Testigo SMB + SB
T20	Testigo SMB + SDAR + SB

SMB: Solución mineral base,

SDAR: Solución dispersante, adherente y reveladora,

QC: Quitina coloidal,

HC: Harina de cebada,

U: Úrea,

SB: Suspensión bacteriana

En los números pares de los tratamientos, se incluyó una suspensión bacteriana (SB) preparada a partir de un bacilo gram negativo, aislado de la filosfera de una planta de banano variedad Gran Enano -aislado Q3-. Dicho aislado, evidenció -en ensayos *in vitro*-

actividad quitinolítica y glucanolítica antes de las 24 horas de incubación. Para la obtención de la suspensión bacteriana, una colonia pura del aislado fue incubada en medio líquido durante 16 horas, a 25 °C y en agitación constante a 100 rpm. La composición del medio,

fue la siguiente: 1 g/l de K_2HPO_4 (Mallinckrodt), 0,5 g/l de $MgSO_4$ (JT Baker), 1 g/l de NaCl (Carlo Erba), 3,5 g/L de extracto de levadura (Merck) y 20ml/l de quitina coloidal. La concentración final de la suspensión en los sustratos que la contenían, fue de 5×10^8 a 5×10^9 UFC/ml.

La inclusión de una suspensión bacteriana dentro de los tratamientos, se realizó para verificar si la aplicación foliar del inóculo bacteriano lograba un incremento superior en la población epifita de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas, comparado con aquellos tratamientos que no contenían la suspensión bacteriana.

Se evaluaron seis testigos, los cuales no contenían los compuestos quitina coloidal, harina de cebada o urea; e incluían la solución mineral base, la solución dispersante y adherente y la suspensión bacteriana (T17-T20); más otros dos tratamientos, uno a base de agua (T15) y otro que consistió en un sistema estándar de control químico (T16), basado en un programa convencional de control de la enfermedad (Tabla 1).

La totalidad de los tratamientos, a excepción de los testigos 15 y 16, fueron llevados a un pH final de 7,5; esto con el objetivo de favorecer el crecimiento de la población bacteriana epifita y limitar el crecimiento de hongos. Los sustratos fueron preparados dos días antes de su aplicación y fueron almacenados a 4°C, homogenizando la mezcla 15 minutos antes de su aplicación final sobre las hojas de banano. Todos los tratamientos fueron aplicados semanalmente durante 17

semanas consecutivas -entre el 26 de enero y el 21 de mayo de 2004-, periodo que incluyó dos épocas climáticas, una seca comprendida entre las semanas uno a la ocho; y otra lluviosa, la cual inició en la semana nueve y prosiguió hasta la última semana de evaluación. Las aplicaciones se realizaron mediante un atomizador manual sobre el envés de la primera hoja y las subsiguientes hojas que emergieron después de su iniciación.

Ubicación geográfica. El experimento se llevó a cabo en un lote experimental del Centro de Investigaciones del Banano, Cenibanano, ubicado en el Municipio de Carepa (Antioquia, Colombia), a una altura de 27 msnm, con una temperatura promedio de 28 °C, una precipitación promedio anual de 3.500 mm y una humedad relativa promedio del 88 %.

Diseño experimental, variables evaluadas y análisis estadístico. Se empleó un diseño completamente al azar, con 20 tratamientos -14 tratamientos y 6 testigos- y 7 repeticiones, para un total de 140 unidades experimentales -las unidades experimentales estuvieron representadas por plántulas de banano variedad Gran Enano, altamente susceptible a la Sigatoka Negra, procedentes de cultivo *in vitro*, de cinco meses de edad y con una altura aproximada de 80 a 90 cm.

Para la evaluación de la dinámica de crecimiento de las bacterias quitinolíticas y glucanolíticas epifitas, en cada tiempo de evaluación se seleccionaron aleatoriamente dos de las siete repeticiones, haciendo recuentos de las

bacterias en la semana de inicio del ensayo -antes de la aplicación de los sustratos, para determinar el número inicial de bacterias líticas epifitas- y posteriormente a la primera, cuarta, sexta, novena y catorceava semanas después de comenzar con las aplicaciones de los tratamientos.

El procedimiento relacionado con el conteo de las bacterias de interés, fue el siguiente: se realizaron diluciones seriadas de las muestras, previo paso de homogeneización, hasta la dilución de 10^{-3} . A partir de dicha dilución se tomaron 20 μ l, los cuales fueron sembrados por triplicado -mediante la técnica de siembra en superficie- en los medios agar nutritivo quitina y agar cebada, para determinar las poblaciones de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas, respectivamente. El agar nutritivo quitina, estuvo compuesto por 20 ml/L de quitina coloidal y 15g/L de agar nutritivo (Difco - Becton Dickinson) -pH final de 7,2; mientras que el agar cebada, estuvo compuesto por 1 g/l de K_2HPO_4 (Mallinckrodt), 0,5 g/l de $MgSO_4$ (JT Baker), 1g/l de NaCl (Carlo Erba), 5 g/l de harina de cebada, 1 g/l de NH_4NO_3 (Merck) y 15 g/l de agar agar (Bacto™ Becton Dickinson) -pH final de 7,2-. El proceso de incubación, se realizó a 25 °C durante 48 horas. En ambos medios, la capacidad para utilizar la quitina coloidal y/o la harina de cebada como fuentes de carbono, era evidenciada por la formación de un halo de consumo alrededor de la colonia (González 1996, y Talavera *et al.* 1998). Los recuentos, fueron expresados en términos de unidades formadoras de colonia por mililitro de muestra -UFC/ml-.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bajo condiciones físicas favorables para el crecimiento bacteriano, la diversidad y concentraciones de las fuentes de carbono disponibles en la superficie de la hoja constituyen el determinante principal de los tamaños de las poblaciones de bacterias epifitas (Wilson y Lindow 1994, Mercier y Lindow 2000, Ji y Wilson 2003). De tal manera que, dichas poblaciones pueden ser manipuladas por cambios en el estatus de tales nutrientes (Mercier y Lindow 2000). Ésta, constituyó la premisa a partir de la cual se diseñó la estrategia para potenciar la regulación biológica contemplada en esta investigación. Tal estrategia, consistió en emplear fuentes de carbono específicas -quitina coloidal y harina de cebada, como fuentes de quitina y β -(1,3) glucanos, respectivamente; como constituyentes principales de los sustratos foliares-, para el incremento selectivo de las poblaciones de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas epifitas de plántulas de banano.

El efecto de los sustratos foliares sobre la dinámica de crecimiento de dichas poblaciones, se describe a continuación: El incremento de las poblaciones de bacterias líticas epifitas, empezó a hacerse visible a partir de la cuarta semana de iniciado el ensayo; incremento que llegó a alcanzar su pico máximo hacia la sexta semana (Tabla 2). Después de dicho pico, los recuentos de la población comenzaron a descender hasta alcanzar los niveles encontrados antes del inicio del ensayo, del orden de $< 0,05$ UFC/ml, los cuales comenzaron a observarse nuevamente en la semana nueve de evaluación y continuaron hasta el final de las aplicaciones.

Tabla 2. Población de bacterias quitinolíticas y glucanolíticas, seis semanas después de la aplicación de sustratos foliares.

Tratamiento	Composición	Población de bacterias (UFC x 10 ⁴ /ml)	
		Quitinolíticas	Glucanolíticas
T1	SMB + SDAR + QC	75,8 defghi	90,0 efg
T2	SMB + SDAR + QC + SB	9,0 jk	36,5 g
T3	SMB + SDAR + HC	138,0 cd	255,0 bc
T4	SMB + SDAR + HC + SB	221,0 b	330,0 b
T5	SMB + SDAR + U	88,5 defgh	129,0 def
T6	SMB + SDAR + U + SB	133,0 cde	245,0 c
T7	SMB + SDAR + QC + HC	70,0 efghij	263,0 bc
T8	SMB + SDAR + QC + HC + SB	230,0 b	190,0 cd
T9	SMB + SDAR + QC + U	32,0 ghijk	30,0 g
T10	SMB + SDAR + QC + U + SB	195,0 bc	155,0 de
T11	SMB + SDAR + HC + U	220,0 b	100,0 efg
T12	SMB + SDAR + HC + U + SB	540,0 a	504,0 a
T13	SMB + SDAR + QC + HC + U	25,0 hijk	80,0 efg
T14	SMB + SDAR + QC + HC + U + SB	99,5 def	128,0 def
T15	Testigo agua	62,5 fghijk	33,5 g
T16	Testigo control convencional	27,5 ghijk	76,5 efg
T17	Testigo SMB	1,75 k	80,0 efg
T18	Testigo SMB + SDAR	92,0 defg	65,0 fg
T19	Testigo SMB + SB	22,5 ijk	25,0 g
T20	Testigo SMB + SDAR + SB	2,5 k	60,0 fg

Valores seguidos con letras iguales no difieren estadísticamente de acuerdo a la prueba de Tukey (P = 0,05).

El inicio de la época lluviosa, ocurrió durante el transcurso de la novena semana. Situación que podría explicar la caída en los recuentos allí evidenciada, pues las lluvias ejercen un efecto de lavado sobre los sustratos aplicados y sobre la población lítica establecida semanas antes. Al respecto Butterworth y McCartney (1991), demostraron que las precipitaciones constituyen un mecanismo eficiente de remoción bacteriana de la superficie de las hojas. Estos autores, en ensayos de invernadero, determinaron que la proporción de bacterias que se desplaza -por el efecto del golpe de las gotas- está directamente relacionada con el número total de bacterias presentes

en las hojas. Los resultados de esta investigación concluyeron que el efecto de lavado de las lluvias es complejo y que su efectividad en la remoción de bacterias de la superficie foliar depende de la intensidad de la lluvia y de las características físicas de la hoja. Con base en lo anteriormente planteado, es importante que la estrategia de biorregulación se direcciona a alcanzar su máxima capacidad de establecimiento en la época de baja a moderada precipitación, en la cual presenta menos riesgos de remoción de las bacterias antagonistas y mediante formulación sostener estas poblaciones para las épocas de mayor precipitación, las cuales

son también las épocas de mayor presión de la enfermedad (Chica *et al.* 2004).

Para determinar cuáles fueron los tratamientos que más incrementaron las poblaciones de bacterias líticas epifitas, se realizó una comparación entre el recuento en la semana seis y el recuento obtenido antes del inicio del ensayo -cuyo promedio para todos los sustratos fue menor a $0,05 \times 10^4$ UFC/ml-, para así calcular el valor del incremento. También se calculó el incremento en la semana seis de los diferentes tratamientos con respecto al testigo agua para esta misma semana.

Los cuatro sustratos foliares que produjeron los mayores recuentos de bacterias quitinolíticas, correspondieron en orden de mayor importancia a los siguientes tratamientos:

- Tratamiento 12 -compuesto por solución mineral, solución dispersante, harina de cebada, urea y suspensión bacteriana-, que obtuvo un recuento de 540×10^4 UFC/ml en la semana seis; evidenciando un incremento de 10.800 veces, con respecto al recuento realizado antes de comenzar a aplicar los sustratos foliares (recuento inicial). En cuanto al recuento acumulado en la semana seis, este tratamiento alcanzó una población de 8,6 veces la población observada en el testigo agua.
- Tratamiento 8 -solución mineral, solución dispersante, quitina coloidal, harina de cebada y suspensión bacteriana-, que obtuvo 230×10^4 UFC/ml en la semana seis, eviden-

ciando un incremento de 4.600 veces con relación a la población inicial, y un incremento de 3,7 veces con respecto a la población encontrada en el testigo agua.

- Tratamiento 4 -solución mineral, solución dispersante, harina de cebada y suspensión bacteriana-, que obtuvo 221×10^4 UFC/ml en la semana seis, evidenciando un incremento de 4.420 veces la población encontrada antes de comenzar a aplicar los sustratos; mostrando además una población de 3,5 veces con relación al recuento obtenido en el testigo agua.
- Tratamiento 11 -solución mineral, solución dispersante, harina de cebada y urea-, que obtuvo 220×10^4 UFC/ml en la semana seis, evidenciando un incremento de 4.400 veces la población inicial, con un incremento también de 3,5 veces con base al testigo agua.

Estos cuatro tratamientos resultaron estadísticamente superiores a los seis testigos evaluados (T15-T20) (Tabla 2), donde el componente común es la harina de cebada al 2,5%. La harina de cebada, constituye una fuente rica de β -(1,3) glucanos y es carente de quitina (Holmes 1991, Michniewicz Michniewicz, Kołodziejczyk y Obuchowski 2003). A pesar de ello, los β -(1,3) glucanos también pudieron ser utilizados como fuente de carbono por las bacterias quitinolíticas. La anterior situación, no debe ser considerada como irregular, pues en la caracterización microbiológica parcial -realizada durante la primera fase de la investigación- se encontró

que algunas de las bacterias aisladas de la filosfera de musáceas poseían tanto actividad quitinolítica como glucanolítica (Salazar 2005).

Por otro lado, ninguno de los testigos estuvo entre los ocho mejores tratamientos para bacterias quitinolíticas; aunque el testigo compuesto de solución mineral y solución dispersante -T18-, fue el mejor entre todos los testigos -obteniendo un recuento de 92×10^4 UFC/ml, evidenciando un incremento de 1.840 veces con respecto al recuento inicial- y de 1,5 veces con relación al tratamiento agua. El testigo a base de solución mineral -T17-, representó el tratamiento con menor población observada, obteniendo un recuento de $1,75 \times 10^4$ UFC/ml en la semana seis, con un incremento de 35 veces con respecto al recuento base y de tan solo 0,03 veces en la semana seis con respecto a la población encontrada en el testigo agua. El comportamiento del testigo agua presentó poblaciones superiores aunque no significativamente a los demás testigos que incluían solución mineral, lo cual puede estar revelando que los niveles de minerales en la filosfera no son tan determinantes para los incrementos poblacionales como si lo son las fuentes de carbono (Wilson y Lindow 1994, Mercier y Lindow 2000, Ji y Wilson 2003).

Arango 2000, evaluó el efecto de diversos sustratos foliares sobre el crecimiento de la población bacteriana quitinolítica de la filosfera del cultivar Gran Enano, en un ensayo de invernadero con etapa de inoculación natural. Dicho estudio, concluyó que la aplicación de quitina coloidal -sola, ó en combinación

con otras fuentes de carbono y nitrógeno-, logra favorecer el crecimiento de la población de bacterias quitinolíticas epifitas.

La inclusión de la suspensión bacteriana dentro de los sustratos, demuestra que la adición de un inóculo extra de la bacteria a las poblaciones naturales epifitas, la cual es mantenida en el laboratorio en medios selectivos cuya fuente de carbono es la misma que la de los sustratos foliares, puede potencializar su propio incremento y el de las poblaciones naturales con actividad lítica, situación similar ha sido reportado para el caso de *Stenotrophomonas maltophilia* C3 en el control de *Bipolaris sorokiniana*, donde los aislados de la bacteria preinducidos en medio con quitina mostraban un mejor control de la enfermedad (Zhang y Yuen 2000).

En la presente investigación, el incremento de las poblaciones quitinolíticas en respuesta a la aplicación de quitina coloidal es bastante heterogéneo y evidencia las diferencias en la composición de aquellos sustratos que la contenían. Por ejemplo, el tratamiento 1-solución mineral, solución dispersante y quitina coloidal- ocupó el onceavo lugar entre los mejores sustratos; mientras que el tratamiento 2 -solución mineral, solución dispersante, quitina coloidal y suspensión bacteriana-, ocupó el tercer lugar entre los sustratos con más bajas poblaciones de las bacterias. Sin embargo, los dos mejores sustratos para estas poblaciones incluían quitina coloidal como uno de sus componentes. Para obtener resultados más consistentes y representativos, es necesario realizar investigaciones, en

donde se intensifique el sistema de muestreo utilizado y se utilicen técnicas como el desprendimiento de las bacterias epifitas mediante sonicación (Ji y Wilson 2003, Morris, Monier y Jacques 1998), con la cual se pueden recuperar mayores poblaciones de bacterias a las obtenidas con el sistema de lavado con solución buffer.

Con respecto a las bacterias glucanólíticas, los sustratos que produjeron los mayores recuentos corresponden a los siguientes tratamientos:

- Tratamiento 12 -compuesto por solución mineral, solución dispersante, harina de cebada, urea y suspensión bacteriana-, que obtuvo un recuento de 504×10^4 UFC/ml en la semana seis; evidenciando un incremento de 10.080 veces, con respecto al recuento inicial y de 15 veces con relación a la población correspondiente al testigo agua para esta misma semana.
- Tratamiento 4 -solución mineral, solución dispersante, harina de cebada y suspensión bacteriana-, que obtuvo 330×10^4 UFC/ml en la semana seis, evidenciando un incremento de 6.600 veces a partir de la población inicial; y en forma similar presentó un alto incremento (9,9 veces) con respecto al testigo agua.
- Tratamiento 7 -solución mineral, solución dispersante, quitina coloidal y harina de cebada-, que obtuvo 263×10^4 UFC/ml en la semana seis, evidenciando un incremento de 5.260 veces con respecto a la población inicial y de 7,9 veces para esta misma semana con referencia al testigo agua.

Estos tres tratamientos al igual que en el caso de las bacterias quitinolíticas, presentaron niveles poblacionales estadísticamente superiores, con respecto a los testigos evaluados (T15-T20) (Tabla 2). Ninguno de estos tratamientos testigo hizo parte de los nueve mejores tratamientos para bacterias glucanólíticas; aunque el tratamiento 17 -compuesto de solución mineral, fue el mejor entre todos los testigos obteniendo un recuento de 80×10^4 UFC/ml en la semana seis; evidenciando un incremento de 1.600 veces, con respecto al recuento base y de 2,4 veces con base al testigo agua. El tratamiento 19 -solución mineral y suspensión bacteriana- representó el tratamiento con menor población bacteriana observada, obteniendo un recuento de 25×10^4 UFC/ml en la semana seis, evidenciando un incremento de 500 veces con respecto al recuento base y de tan solo 0,7 veces con respecto al testigo agua en la semana seis; y en forma similar a lo encontrado con los testigos para las poblaciones de bacterias quitinolíticas, nuevamente las fuentes de carbono son más determinantes, ya que estas si produjeron incrementos significativos (Tabla 2) que los que se pueden obtener a partir de las concentraciones de minerales disponibles para la microbiota epifita (T17-T20).

Al comparar los mejores sustratos para ambos tipos de población lítica, es evidente la importancia de los tratamientos 12 y 4, los cuales tienen como componente en común la harina de cebada, cuya aplicación como sustrato foliar para musáceas alimenticias no ha sido reportada con anterioridad, y la suspensión bacteriana preparada a

partir de un aislado de la población nativa de bacterias líticas epifitas. El empleo de la harina de cebada, tiene 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 (González 1996, Arango 2002, Patiño 2002). Se confirma la importancia de una fuente de carbono, en este caso quitina y glucano, como sustratos selectivos para incrementar poblaciones de bacterias capaces de degradar estos carbohidratos (Wilson y Lindow (1994), Ji y Wilson 2003); lo cual plantea un resultado promisorio como base para la elaboración de sustratos foliares diseñados para incrementar poblaciones nativas de microorganismos con potencial antagonista sobre *M. fijiensis*.

CONCLUSION

A partir de este estudio exploratorio, se encontró que los sustratos foliares que produjeron los mayores recuentos de bacterias quitinolíticas epifitas, correspondieron a los tratamientos 12, 8, 4 y 11; cuyo constituyente común, además de la solución mineral base y la solución dispersante, fue la harina de cebada al 2,5%. De igual forma, los sustratos que produjeron los mayores recuentos de bacterias glucanolíticas epifitas, correspondieron a los tratamientos 12, 4 y 7; cuyo constituyente común, también fue la harina de cebada al 2,5%; destacándose el componente urea en algunos de estos sustratos el cual puede complementar el efecto de control sobre el patógeno y la presencia de una suspensión bacteriana cuya preinducción en medio

con quitina puede también ayudar a incrementar actividad de poblaciones líticas epifitas; lo cual proyecta la importancia de profundizar en investigaciones que ayuden a explicar estos resultados. Finalmente se considera que es prioritario dirigir las futuras investigaciones a lograr una formulación que permita maximizar la expresión en condiciones de campo, del potencial biorregulador sobre *M. fijiensis* por acción de la microbiota epifita nativa de la filosfera de banano y plátano, al favorecer su colonización y tamaño poblacional mediante la aplicación de sustratos foliares.

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación se realizó gracias a fondos y apoyo del Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología "Francisco José de Caldas" – COLCIENCIAS, a través del proyecto: Componentes químicos y microbiológicos de la filosfera de musáceas y su aplicación en el manejo de la Sigatoka Negra, código 842-12-11569; así como el apoyo del Centro de Investigaciones del Banano CENIBANANO-AUGURA Colombia y del profesor Pablo Buriticá Céspedes de la Universidad Nacional de Colombia, Sede Medellín.

BIBLIOGRAFIA

Alexopoulos, C. J, Mims, C. W, and Blackwell, M. 1996. Characteristics of fungi. En: Introductory Micology. 4th ed. New York, USA: John Wiley & Sons. p. 26-56.

- Andrews, J. H. 1992. Biological control in the phyllosphere. En: Annual Review of Phytopathology. Vol. 30; p.603-635.
- 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 (15: 2002: Cartagena de Indias, Colombia). Memorias. Medellín: Augura.
- Blakeman, J. P. and Fokkema, N. J. 1982. Potencial for biological control of diseases on the phylloplane. En: Annual Review of Phytopathology. Vol. 20; p.167-192.
- Butterworth, J. and Mc Cartney, H. A. 1991. The dispersal of bacteria from leaf surfaces by water splash. En: Journal of Applied Bacteriology. Vol 71; p. 484-496.
- Chernin, L., Ismailov, Z., Haran, S. and Chet, I. 1995. Chitinolytic *Enterobacter agglomerans* antagonistic to fungal plant pathogens. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol 61, no.5; p.1720-1726.
- Chica, R., Herrera, M., Jiménez, I., Lizcano, S., Montoya, J. A., Patiño, L. F., Rodríguez, P. A. y Ruíz, L. H. 2004. Impacto y manejo de la Sigatoka Negra en el cultivo del banano de exportación en Colombia. p. 53-62. EN. XVI Reunión Internacional Acorbat (16: 2004: Oaxaca, México). Memorias. Oaxaca: Acorbat.
- Cohen-Kupiec, R. and Chet, I. 1998. The molecular biology of chitin digestion. En: Current Biology. Vol. 9; p. 270-277.
- Davis, R. F., Backman, P. A. Rodríguez-Kabana, R. and Kokalis-Burelle, N. 1992. Biological control of apple fruit diseases by *Chaetomium globosum* formulations containing cellulose. En: Biological Control. Vol 2; p.118-123.
- Elad, Y., Richard, R., Bélanger, R. and Jürgen, K. 2002. Biological control of diseases in the phyllosphere. p.66-78. En: I Curso – Taller Internacional Control biológico, componente fundamental del manejo integrado de plagas en una agricultura sostenible. (2002: Bogotá, Colombia). Memorias. Bogotá: CORPOICA.
- Fokkema, N. J., den Houter, J. G., Kosterman, Y. J. C. and Nelis, A. L. 1979. Manipulation of yeasts on field-grown wheat leaves and their antagonistic effect on *Cochliobolus sativus* and *Septoria nodorum*. En: Transactions of the British Mycological Society. Vol 72; p. 19-29.
- 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.
- Holmes, M.G. 1991. Opportunities for research in coarse grains (barley and oats) in the Riverina. Riverina Outlook Conference, Food Processing Workshop. Wagga, Farrer Centre and The Regional Institute Ltd. Disponible en Internet http://www.regional.org.au/au/roc/1991%20food/regional.org.au/au/index.htm#P41_2571food/index.htm#TopOfPage. Consultada: 5 Dic. 2004].

- Janisiewicz, W. J., Usall, J. and Bors, B. 1992. Nutritional enhancement of biological control of blue mold on apples. En: *Phytopathology*. Vol 82; p. 1364–1370.
- _____ and Bors, B. 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, no. 9; p. 3261–3267.
- Ji, P. and 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.
- Kokalis-Burelle, N., Backman, P. A., Rodriguez-Kabana, R. and Ploper, L. D. 1992. Potential for biological control of early leafspot of peanut using *Bacillus cereus* and chitin as foliar amendments. En: *Biological Control*. Vol 2; p.321–328.
- Mahadevan, B. and Crawford, D. L. 1997. Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. En: *Enzyme and Microbial Technology*. Vol. 20, no. 7; p. 489-493.
- Marín, D. H. y Romero, C. R. 1992. El combate de la Sigatoka Negra. Costa Rica: Corporación Bananera Nacional, Departamento de Investigaciones. 22p. (Boletín no. 4).
- Marín, D. H., Romero, R. A., Guzmán, M. and Sutton T. B. 2003. Black Sigatoka: An increasing threat to banana cultivation. En: *Plant Disease*. Vol. 87, no. 3; p. 208-223.
- Mercier, J. and 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.
- Michniewicz, J.; Kołodziejczyk, P. and Obuchowski, W. 2003. Beta-glucan enzymatic hydrolysis in cereal grains and cereal products. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 6 (1). Disponible en internet <http://www.ejppau.media.pl/series/volume6/issue1/food/art03.html>. [Consultada: 5 Dic. 2004].
- Mondal, S. N. and Timmer, L. W. 2003. Effect of urea, CaCO₃, and dolomite on pseudothecial development and ascospore production of *Mycosphaerella citri*. En: *Plant Disease*. Vol 87, no.5; p. 478-482.
- Morris, C. E., Monier, J. M. and Jacques, M. A. 1998. A technique to quantify the population size and composition of the biofilm component in communities of bacteria in the phyllosphere. En: *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 64, no. 12; p. 4789-4795.
- Ordentlich, A., Elad, Y. and 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.
- Parra, Y. y Ramírez, R. A. 2002. Efecto de diferentes derivados de la quitina sobre el crecimiento *in vitro* del hongo *Rhizoctonia solani* Kuhn. En: 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 (15: 2002: Cartagena de Indias, Colombia). Memorias. Medellín: AUGURA.
- _____. 2003. La resistencia a fungicidas, una continua amenaza al control de Sigatoka Negra. En: Boletín Técnico de Cenibanano. No. 4; p. 5-2.
- Ploper, L. D., Backman, P. A. and Rodriguez-Kabana, R.. 1992. Enhanced natural biological control of apple fruit diseases by applications of biopolymers. En: Biological Control Tests. Vol 7; p. 3.
- Ruiz-Silvera, C., Bustamante, E., Jiménez, F., Saunders, J., Okumoto, S. y González, R. 1997. Sustratos y bacterias antagonistas para el manejo de *Mycosphaerella fijiensis* en banano. En: Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). No. 45; p. 9-17.
- Sahai, A. S. and Manocha, M. S. 1993. Chitinases of fungi and plants: their involvement in morphogenesis and host-parasite interaction. En: FEMS Microbiology Reviews. Vol. 11, no. 4; p. 317-338.
- Salazar, L. M. 2005. Estudio de la filofera de musáceas alimenticias en el Urabá antioqueño. Medellín. 103 h. Tesis Magíster en Biotecnología. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias.
- Sid Ahmed, A., Ezziyani, M., Pérez Sánchez, C. and Candela, M. E. 2003. Effect of chitin on biological control activity of *Bacillus* spp. and *Trichoderma harzianum* against root rot disease in pepper (*Capsicum annum*) plants. En: European Journal of Plant Pathology. Vol. 109; p. 633-637.
- Sing, P. P., Shin, Y. C., Park, C. S. and 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. En: Blakeman, J. P., ed. Microbial ecology of the phylloplane. London Academic Press. p. 369-381.
- Stadler, B., and T. Mueller. 1996. Aphid honeydew and its effect on the phyllosphere microflora of *Picea abies* (L.) Karst. En: Oecologia. Vol 108, no. 44; p. 771-776.
- Talavera, S. M. E., Bustamante, E., González, R. y Sánchez, V. 1998. Selección y evaluación en laboratorio y campo de microorganismos glucanólíticos antagonistas a *Mycosphaerella fijiensis*. En: Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica). No. 47; p. 24-30.

- Valois, D.; Fayad, K.; Barasubiye, T.; Garon, M.; Dery, C.; Brzezinski, R. and 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.
- Wilson, M., and Lindow, S. E. 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.
- _____ and S. E. Lindow. 1995. Enhanced epiphytic coexistence of near-isogenic salicylate-catabolizing and non-salicylate-catabolizing *Pseudomonas putida* strains after exogenous salicylate application. En: Applied and Environmental Microbiology. Vol 61; p. 1073-1076.
- Wilson, M., Savka, M. A. Hwang, I. Farrand, S. K. and Lindow, S. E. 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.
- Yamada, M. and Ogiso, M. 1997. Control of soil-borne diseases using antagonistic microorganisms. Part IV. Study on the available substrates for antagonistic bacterial strains to control Fusarium wilt of tomatoes. En: Research Bulletin of the Aichi-ken Agricultural Research Center No. 29; p. 141-144.
- Zhang, Z. and Yuen, G. Y. 2000. Effects of culture fluids and pre-induction of chitinase production on biocontrol of *Bipolaris* leaf spot by *Stenotrophomonas maltophilia* C3. En: Biological Control. Vol 18; p. 277-286.