

CAPÍTULO II

Efecto de biocarbón y microorganismos benéficos sobre el crecimiento de plantas y microcormos de banano *Gros Michel* (AAA) y su respuesta a *Fusarium oxysporum* f. *sp cubense*

Jorge Orlando Acosta Buitrago ^{ab}, Miguel Angel Dita^c, Gabriela Soto^d, Luis Pocasangre^e
Fernando Casanoves^f, Francisco Estrada^g

^{afg} Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Costa Rica

^b Seattle Biochar Working Group, EEUU

^c Embrapa, Brasil

^d Universidad Nacional, Costa Rica

^e Universidad Earth, Costa Rica

Resumen

Se evaluó el efecto en el crecimiento en plantas y microcormos de banano de *Gros Michel* AAA de la aplicación de tres fuentes de biocarbón (BC) solo o combinado con microorganismos benéficos (microorganismos de montaña (MM) y microorganismos endófitos (ME) en condiciones de invernadero, así como el efecto por biocontrol ante *Fusarium oxysporum* f. s. *cubense* raza 1 (*Foc*). Los tres tipos de BC fueron fabricados con distintas tecnologías y partir de: 1) bagazo de caña de azúcar, 2) *Gmelina arborea* y 3) arboles maderables (>20 especies). Se utilizó un diseño en bloques completamente al azar con ocho bloques y 15 tratamientos por bloque. Las combinaciones de tratamientos se constituyeron de BC con y sin microorganismos, todos a excepción del tratamiento testigo y el tratamiento de fertilizante químico (15 g de 10-30-10) recibieron fertilización orgánica (FO) con salvado de arroz (100 g/planta) y roca fosfórica (100 g/planta). La infección de plantas con *Foc* se realizó a los 7 meses y se hizo con el protocolo de *Bioversity*, aplicando granos de maíz infectados con *Foc* alrededor de la planta y adicionado 100 ml de una suspensión conidial (1×10^9 conidias/ml) del patógeno por planta. Se encontraron diferencias significativas en el crecimiento cuando se les comparó con el testigo, especialmente con el BCEF (biocarbón de la Estufa Finca) combinado con ME y con el BCGA (biocarbón de *Gmelina*) combinado con MM y ME. En los tratamientos con MM presentaron indicios de infección temprana de *Foc* (en el segundo mes de experimento) pero se reestablecieron hacia el quinto mes. El BC de EF más MM resultó significativamente afectado al registrar 37.5% de sobrevivencia. Después de nueve meses los tratamientos que resistieron con mayor éxito a *Foc* con mayor sanidad fueron los que recibieron las tres fuentes de biocarbón acompañadas de microorganismos endófitos (1,4 y 1,5 en escala de severidad de 1 a 5), los tratamientos más enfermos resultaron ser el testigo y el químico (2,5 y 3,5 de severidad en escala de 1 a 5). Los mayores pesos en los microcormos fueron registrados con el BC de la EF combinado con ME y MM (141g +/- 7.1g), los pesos más bajos se registraron con el T químico (81.3g +/- 7.1g) y el testigo (54.1g +/- 6.2g)

Palabras clave: *Fusarium*, biocarbón, endófitos, microorganismos indígenas, banana Gros Michel, crecimiento, sanidad.

Abstract

Plant growth with the addition of three sources of biochar (BC) was evaluated alone and combined with beneficial microorganisms (indigenous microorganisms (MM) and endophytic microorganisms (ME)), in plants and corms of banana *Gros Michel* AAA in greenhouse conditions. As well as the biocontrol effect over *Fusarium oxysporum* fs *cubense* race 1 (*Foc*). The three types of BC were manufactured with different technologies: 1) sugar cane bagasse, 2) *Gmelina arborea* and 3) timber trees (>20sp). The experimental design was a randomized complete block with eight blocks (repetitions) and 15 treatments per block, all except the control treatment and treatment of chemical fertilizer (15g of 10-30-10) received organic fertilization (FO), made of rice bran (100g/plant) and phosphoric stone flour (100g/plant). Plants were infected with *Foc* 7 months after planting, following the *Bioversity* protocol, using maize grains infected with *Foc* around the plant, as well was added 100ml of a conidial suspension (1×10^9 conidias/ml) of plant pathogen. Significant differences in growth were found when compared with the control, especially with the combined BCEF with ME and the BC *Gmelina* combined with MM and ME. In treatments with MM presented a possible early infection of *Foc* (in the second month of the experiment) but plant health recovered at the fifth month, the BC EF with MM resulted more significantly affected with 37.5% of live plants. After nine months, the treatments with three sources of biochar and endophyte microorganisms (1.4 and 1.5 on a scale of severity from one to five) had lower incidence of *Foc*. The control and chemical treatment showed the higher incidence (2.5 and 3.5 of severity scale of one to five). In microcormos higher weights were obtained with the BC EF combined with ME and MM (141g +/- 7.1g), the lower weights were obtained by the chemical (81.3g +/- 7.1g) and the control (54.1g +/- 6.2g)

Keywords: *Fusarium*, biochar, endophytes, indigenous microorganisms, Gros Michel banana, growth plant, health plant.

1. Introducción

El cultivar *Gros Michel* (AAA) es un clon originario de Malasia, cuyo cultivo se extendió por los trópicos americanos; tiene dos mutantes bien conocidos: “Highgate” y “cocos”; en Costa Rica se estima que hay 4.358 ha sembradas de banana Gros Michel, el 87% se encuentra sembrado en la zona Caribe en alturas inferiores a los 100 msnm (Ramírez et al. 2011); miles de familias de escasos recursos dependen económicamente de la venta del cultivo y del consumo en casa.

Gros Michel produce racimos grandes y duraderos, sus frutos tienen grosor y color atractivos para el productor por su resistencia a cualquier rigor en el manejo y transporte (Amador 2006,

Robinson y Galán 2011). El bajo porcentaje de pérdidas causadas por magulladuras o manchas al llegar al mercado son la razón principal de que continúe cultivándose, sin embargo, casi ha desaparecido del mercado por ser susceptible a la enfermedad de la marchitez por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*) (CORBANA 2013).

La incidencia de *Foc* en el continente americano ha sido suficientemente detallada, se han generado varios reportes y advertencias sobre la patogenicidad, especialmente para los productores de *Gros Michel* (Pocasangre *et al.* 2010). Algunas investigaciones reconocen el beneficio en prevención cuando se emplean endófitos -como por ejemplo de tipo *Trichoderma*- (Caballero 2011, Yamaguchi *et al.* 1992, Arnold *et al.* 2003, Chaves 2007, Pérez *et al.* 2003). Por el contrario hasta el momento no existen agentes químicos eficaces que sean capaces de controlar a *Foc* cuando ataca a la variedad *Gros Michel*.

El BC ha sido evaluado con resultados positivos en el tema agronómico de la fertilización y aumento de rendimiento de cultivos tropicales (Lehmann y Rondón 2006, Asai *et al.* 2009, Mayor *et al.* 2010). El hecho de experimentar con innovaciones agroecológicas como las que permite el BC son justificadas para encontrar soluciones permanentes, económicas y de fácil adopción para los pequeños agricultores.

El uso de biocarbón (BC) como elemento de manejo de enfermedades de plantas tropicales ha sido un tema activo de investigación en los últimos años (Elmer y Pignatello 2011; Henreaux 2012; Swart y Kim 2012; Jaiswal 2014); sin embargo, pocos estudios -como el realizado por Pérez *et al.* (2013)- han sido enfocados al banano, y menos a uno de sus patógenos más importantes: *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*).

El papel de los microorganismos antagonistas a *Foc* independientemente de si se aplican con enmiendas orgánicas o no, ha sido descrito con distintos niveles de control, (Fravel *et al.* 2003; Lara 2009). Adicionalmente en el campo de los microorganismos benéficos, han sido valorizados por el rol que cumplen como servicios ecosistémicos (Kinkel *et al.* 2011).

Recientemente se demostró que el BC promueve la resistencia sistémica adquirida (Elad *et al.* 2010). Más aún, otras investigaciones han apuntado hacia el reconocimiento de factores clave para encontrar la supresividad de enfermedades por medio de las enmiendas orgánicas (Bonanomi *et al.* 2010) haciendo la salvedad que el BC pertenece al grupo de fuentes de fertilización y enmiendas orgánicas.

Este estudio buscó determinar el efecto de diferentes fuentes de BC con y sin microorganismos benéficos en un suelo ácido y laterítico, para estimar el potencial de biocontrol de *Foc* en condiciones de invernadero en plantas de banano *Gros Michel*.

2. Materiales y Métodos

Este experimento se realizó en un invernadero del CATIE ubicado en Turrialba Costa Rica. Se utilizó un suelo de tipo Ultisol proveniente de la región de Talamanca, a una profundidad de 30 cm (Cuadro 1).

Cuadro 1. Características químicas del suelo Ultisol de la zona de Talamanca, utilizando en este ensayo.

pH (-Log ₁₀ (H ⁺))	Ca	Mg (cmol (+)/l)	K	P	Cu	Zn (mg/l)	Mn	Fe	MO (%)
4.2	0.97	0.57	0.09	5	7,5	1,7	26	276	5

2.1 Fuentes de biocarbón (BC)

Se utilizaron tres fuentes diferentes de BC: BC de la Estufa Finca, BC de *Gmelina* y BC de *Saccharum officinarum* (caña de azúcar) producidos de las siguientes formas:

El BC de la Estufa Finca (BCEF) fue producido en el marco del proyecto Estufa Finca por las comunidades indígenas de Talamanca, que utilizaron cocinas de leña diseñadas para producir BC con diversas maderas encontradas en los bosques de la región (Avilés-López 2014), como especies arbóreas leguminosas y variedades de bambú (SeaChar, 2012). El promedio de temperatura de producción fue entre 200°C y 290°C.

El BC *Gmelina* fue producido en Puerto Jimenez, Costa Rica, en una estación compuesta de tres hornos de 220 litros de volumen, con capacidad productiva de 45-60 kg por día; el proceso de pirolisis de estos hornos empieza a 300°C llegando a temperaturas entre 400-500°C; el proceso dura de una a cinco horas dependiendo del grado de humedad de la madera.

Dos magíster de CATIE y un ingeniero de la Universidad de Costa Rica (UCR) realizaron investigaciones con BC de *Gmelina* (Salas *et al.* 2011; Henreaux 2012) (Hojah 2013). Salas tuvo problemas para lograr la infección de las plántulas con *Foc*; Henreaux reportó en tomate *Lycopersicum esculentum* incrementos del crecimiento, del peso seco, menor cantidad de moscas blancas y menor incidencia de *Ralstonia solanacearum*, Hojah reportó el mejoramiento de la calidad del suelo en variables físicas y químicas.

El BC caña se obtuvo del mercado local de Turrialba, Cartago donde se comercializa debido a las cercanías de los cultivos y centros de procesamiento para la obtención de azúcar y melaza como la hacienda Juan Viñas; el BC de bagazo de caña de azúcar ha sido reportado de alta calidad, generando beneficios económicos (Inyang *et al.* 2010; Quirk y Taylor 2010; Kameyama *et al.* 2012; Soto y Joseph 2012).

Las tres fuentes de BC fueron manipuladas para generar mayor superficie específica de contacto y asegurar la mezcla uniforme con el suelo; se pulverizaron y tamizaron a un tamaño < 2 mm. El BCEF y el BCGmelina se pulverizaron con una moladora de carne eléctrica, de

origen brasilero de 2 caballos de potencia; el BCCA no fue pulverizado debido a que ya tenía tamaño pequeño, pero si fue tamizado.

A las tres fuentes de BC se les realizó análisis de composición química y microbiológica en el Centro de Investigaciones Agronómicas (CIA) de la Universidad de Costa Rica (UCR) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Análisis químicos y microbiológicos de tres fuentes de biocarbón.

Elemento/indicador	BC caña de azúcar	BC Estufa Finca	BC <i>Gmelina arborea</i>
Ca (%)	0.51	1.3	1.06
Mg (%)	0.18	0.15	0.13
K (%)	0.76	1.88	0.66
P (%)	0.26	0.29	0.11
Cu (mg/Kg)	0.35	14	7
Zn (mg/Kg)	0.3	39	42
Mn (mg/Kg)	0.3	44	32
Fe (mg/Kg)	4121	2793	1870
Humedad (%)	79	5.9	13.1
N (%)	0.67	0.53	0.59
C (%)	72.91	61.76	89.2
pH (-Log ₁₀ (H ⁺))	7.9	9.6	8.7
C.I.C (cmol(+)/Kg)	11.04	6.52	11.04
Na (cmol(+)/Kg)	0.99	1.07	0.7
C/N	108.82	116.53	151.19
Bacterias (UFC/g)	310.000	56.000	7'600.000
Actinomicetes (UFC/g)	10'000.000	22000	64.000
Hongos (UFC/g)	970.000	1'200.000	53.000
Levaduras UFC/g	6.500	1.000	1.000
Lactobacilos UFC/g	1'500.000	22.000	85.000
Anaeróbicos UFC/g	8'900.000	4.600	260.000
Aeróbicos UFC/g	13'000.000	22.000	89.0000
Tasa respiración mgCO ₂ /g/día	0.07	0.07	0.04
Biomasa microbiana mgC/Kg	54	103	76

2.2 Cultivo y multiplicación de microorganismos benéficos

Microrganismos Endófitos (ME). Se usaron bacterias de los géneros *Bacillus* y *Burkholderia* y hongos del genero *Trichoderma*. Especies *Bacillus aryabhattai*, *Burkholderia cepacia* y el hongo *Trichoderma Asperellum*, los aislamientos fueron YK037, GN027 GN009 YK024 Y PS027; las bacterias endófitas se cultivaron en Agar Nutritivo al 100% a partir de perlas impregnadas con células de las bacterias de los tubos de conservación en crio banco e incubadas a 24 °C durante 48 horas. Los hongos se cultivaron en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) acidificado e incubados a 27 °C durante cinco días.

Microrganismos de montaña (MM). Los MM fueron obtenidos de un bosque secundario ubicado en el CATIE. Se multiplicaron según las metodologías propuestas por Pacheco (2006, 2009), Alcazar y Acosta Buitrago (2010) y Salas y Araya (2009) en relación a la obtención de un producto sólido y líquido.

El proceso de obtención de los microorganismos de montaña consistió en cinco etapas: a) reproducción de los microorganismos en lugares estratégicos del bosque, en un medio de arroz blanco e integral precocido, b) recolección de las siembras después de siete días c) enriquecimiento en laboratorio con melaza, yogurt con pro bióticos y levadura, d) Inoculación de ingredientes sólidos: se licuaron y se aplicaron a una mezcla sólida de salvado de arroz, granza de arroz, suelo, harina de roca fosfórica y carbón vegetal molido, e) fermentación y madurez: se dejó fermentar en un estañón plástico anaeróbicamente durante 15 días.

2.3 Tratamientos

Se dispusieron quince tratamientos (TTO) en macetas de capacidad de 1.8 litros y área de 0,05m², se usó aproximadamente 9 kilos de suelo y exactamente 150 gramos de BC en cada maceta, equivalentes a 30 ton/ha. La cantidad usada de BC fue la misma utilizada en estudios realizados por la Corporación Bananera Nacional de Costa Rica (CORBANA), en ese estudio se controlaron efectivamente los nematodos fitopatógenos usando plántulas de banano de la variedad Cavendish (Salas y Araya 2009).

En los tratamientos se usaron tres tipos de BC, fueron evaluados con y sin inoculación de MM, con y sin inoculación de ME. La inoculación con MM se hizo en estado sólido (100gr/maceta) y líquido (dos aplicaciones de 100 ml/maceta espaciadas 15 días), la preparación líquida se hizo haciendo un té de MM sólido. Se fermentó 1kg de MM más 1 litro de melaza en 20 litros de agua durante 10 días.

La aplicación de ME se calibró en laboratorio llegando a una concentración de 1×10^6 UFC/g de BC, se usaron: *Burkholderia cepacia*, *Bacillus aryabhatai* y *Trichoderma/ asperellum*; se dejaron establecer en el BC por tiempo de 10 días, antes de mezclarlos con el suelo y entrar en contacto con la planta; una vez mezclados, se realizaron 3 inoculaciones de refuerzo en la zona radical de la planta cada 20 días, y se aplicaron 100 ml/planta de una concentración mínima de 1×10^6 UFC/ml.

En el caso del TTO con fertilización química, se aplicó 15 gramos del fertilizante 10-30-10. Con respecto a la fertilización orgánica, se aplicó 100 gramos de roca fosfórica más 100 gramos de salvado de arroz en cada maceta, sólo el testigo y el tratamiento químico no recibieron fertilización orgánica. Los fertilizantes orgánicos fueron analizados químicamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Caracterización química de fertilizantes orgánicos usados en esta investigación.

Elemento	MM sólido	Salvado de arroz	Roca fosfórica
Ca (%)	1.71	0.07	31.95
Mg (%)	0.22	1.22	0.05
K (%)	1.25	2.11	0.54
P (%)	0.39	2.36	13.96
Cu (mg/kg)	47	24	35
Zn (mg/kg)	72.4	73.0	188
Mn (mg/kg)	29	234	22
Fe (mg/kg)	6116	174	5734
Humedad (%)	34	12	1.4
N (%)	2.34	2.76	0.09
C (%)	40.10	41.73	7.28
C/N	17.16	15.14	80.89
pH (log[H ⁺])	4.7	5.3	6.1
C.I.C. (cmol(+)/kg)	28.01	15.00	5.49

2.4 Material vegetal

Se utilizaron plántulas de banano producidas in vitro del cultivar enano *Gros Michel* AAA, las plántulas se adaptaron en invernadero bajo sombrero durante 11 semanas; todo el proceso se realizó en la unidad de biotecnología del CATIE; en Costa Rica *Gros Michel* es conocido como criollo y es cultivado por su porte bajo, mejor calidad organoléptica, facilidad en su cosecha, sin embargo es totalmente susceptible a *Foc*.

Las plántulas fueron trasplantadas, durante el primer mes, el riego se aplicó a diario durante los primeros 10 días en horas de la tarde, entre los 10 días hasta los dos meses se regó cada cuatro o cinco días, entre el tercer y cuarto mes se regó cada seis o siete días, al octavo mes se regó 10 días consecutivos hasta capacidad de campo para favorecer la reproducción de *Foc*, evaluar la severidad en los microcormos y en la parte aérea de las plantas y culminar el experimento.

2.5 Fuentes de aislamientos de *Foc*, reproducción e infección de plantas

Se utilizaron aislamientos *Foc* 2 raza 1 de *Bioversity Internacional*, se siguió la metodología propuesta por Pocasangre (2010) en la cual perlas de cerámica impregnadas con el patógeno fueron transferidas a cajas Petri con PDA al 100% acidificado; luego se procedió a hacer la multiplicación de los aislamientos extrayéndose discos de PDA de 5 mm de diámetro que contenían micelio, microconidias, macroconidias y clamidosporas.

Los platos sembrados con los aislamientos de *Foc* fueron almacenados a 24°C por dos semanas en una incubadora; la infección de las plantas se hizo de acuerdo a la metodología propuesta por *Bioversity* y se realizó al séptimo mes de haber trasplantado, así mismo se reforzó a los siete y 15 días después de la primer infección, se aplicaron dosis de 100 ml por planta con una concentración de 1×10^9 conidias/ml.

2.6 Variables y recolección de datos

Se evaluaron indicadores de severidad de plantas y microcormos infectados con *Foc*. Para la severidad se clasificó en la parte aérea y en los cormos, de acuerdo a la escala propuesta por *Bioversity*, el tiempo de medición fue en el noveno mes de experimento (Figura 1).

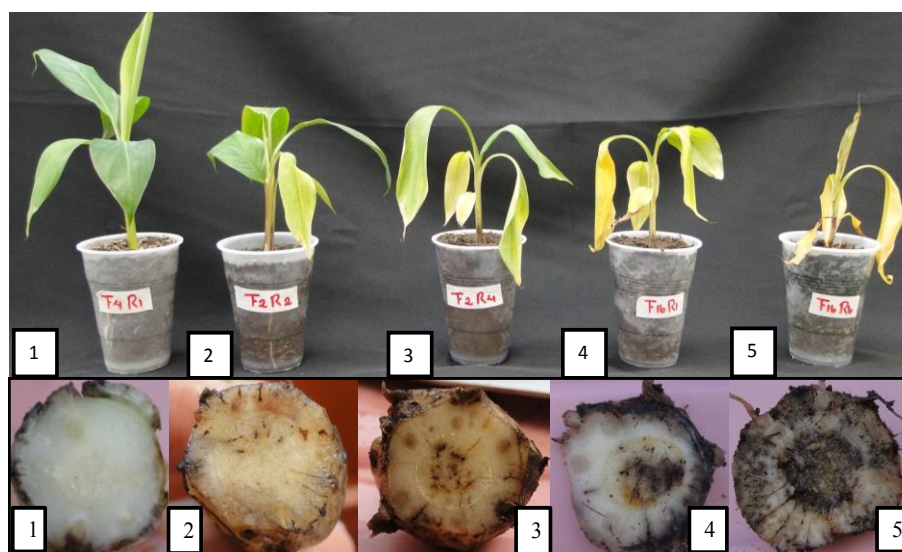


Figura 1. Escala para evaluación de severidad de Foc en plántulas de Gros Michel en invernadero. Fuente: Bioversity Internacional.

También se determinó la biomasa radical y el peso fresco de los cormos –después de retirar las raíces. Para medir la biomasa, se cortaron y separaron las partes aéreas y radicales de las plantas, se rotularon bolsas de papel con el nombre del tratamiento y se dispusieron en ellas las raíces -sin los cormos-, se secaron las raíces en horno por 24 horas a 60 C° y posteriormente se pesó cada raíz.

Al octavo mes del experimento se midieron variables cuantitativas como la altura de la planta, el número de hojas, el grosor del pseudotallo en la base de la planta y el área foliar aproximada -multiplicando el ancho y largo de las hojas fotosintéticamente activas.

2.7 Diseño Experimental

El experimento se hizo con un diseño de bloques completamente al azar (DBCA) con ocho repeticiones y 15 tratamientos. Se consideraron como bloques a las repeticiones para evitar

capturar el efecto de la luz en las unidades experimentales, la ubicación de los tratamientos dentro de los bloques se realizó por sorteo; el análisis estadístico se procesó con el Infostat versión del 2013 enlazado con paquete de R y Statconn.

El modelo que se utilizó para el análisis de los datos de crecimiento de banano fue el siguiente:

$$Y_{ijklm} = \mu + B_i + \beta_j(S_i) + E_k + M_m + T_n + BE_{ik} + BM_{im} + BEM_{ikm} + \epsilon_{ijklm}$$

donde: Y_{ijkl} = una observación cualquiera

μ = media general

B_i = efecto del i-ésimo biocarbón

$\beta_j(B_i)$ = efecto del j-ésimo bloque del i-ésimo biocarbón

E_k = efecto del k-ésimo endófito

M_m = efecto del m-ésimo microorganismo nativo

T_n = efecto del n-ésimo tratamiento

BE_{ik} = interacción biocarbón x endófito

BM_{im} = interacción biocarbón x microorganismo nativo

BEM_{ikm} = interacción biocarbón x endófito x microorganismo nativo

ϵ_{ijklm} = error aleatorio experimental a nivel de tratamientos, supuestamente distribuido normal e independiente con media cero y varianza constante.

3. Resultados

3.1 Severidad de *Foc*:

Todos los tratamientos se enfermaron con *Foc*, por lo tanto la incidencia de la enfermedad fue de un 100% y se comprobó que el método de infección fue exitoso, tardó entre cinco y seis semanas para presentar la sintomatología de la enfermedad; en la evaluación de la severidad de *Foc*, el estudio se enfocó en dos perspectivas: a) en las hojas y tallo y b) en el cormo, se encontraron diferencias significativas ($p=0.0179$) cuando se transformó la variable incidencia de cormos a rangos (Figura 2).

Se encontró que los TTO que solo recibieron endófitos (indistintamente del BC) lograron tener niveles bajos de severidad de *Foc* (1,4 y 1,5) y se diferenciaron estadísticamente del testigo y el químico quienes reportaron los niveles más altos de severidad (2,5 y 3,5 respectivamente) considerando el nivel uno como una planta sana y cinco como una planta muerta (Figura 2).

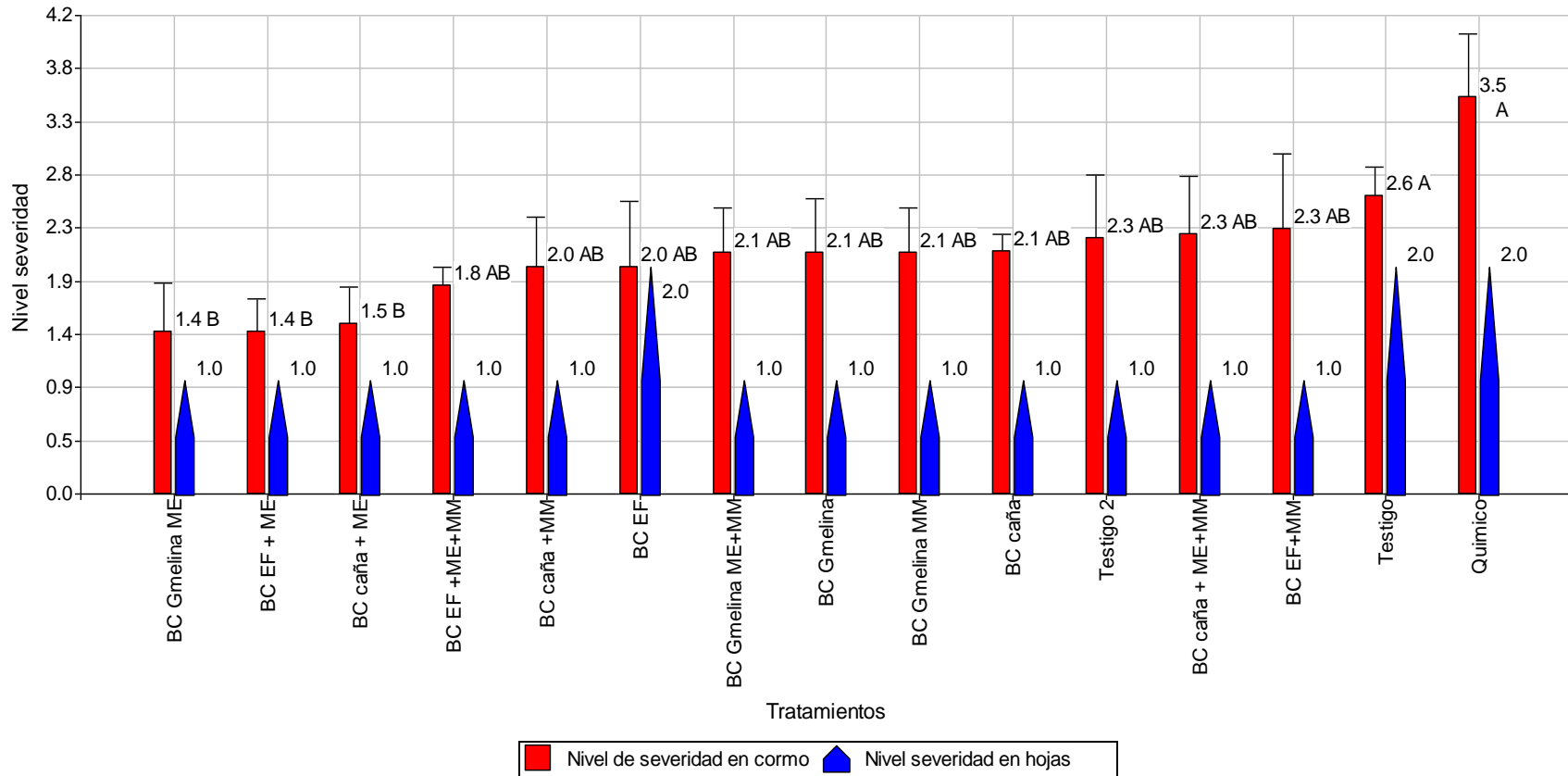


Figura 2. Nivel de severidad de *Foc* en parte aérea y radical de las plantas después de 9 meses de seguimiento. BC: biocarbón, EF: Estufa Finca, ME: microorganismos endófitos, MM: microorganismos de montaña. Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes (Prueba LSD Fisher $p < 0.05$)

Aunado a lo anterior, se encontraron diferencias significativas ($p=0.001$) para las variables de peso fresco del cormo (semilla) y biomasa radical. Los tratamientos de BCEF y BC Gmelina que recibieron ME y MM, demostraron ser los mejores en cuanto al peso del cormo, pero no reportaron una diferencia en la biomasa radical cuando se compararon con el testigo y el químico (Cuadro 4).

Cuadro 4. Resultados de peso promedio, severidad (rango) y biomasa radical en cormos por tratamiento. Datos con error estándar y diferencia estadística (LSD Fisher).

Tratamientos	Peso promedio cormo (g) y diferencia	Severidad de <i>Foc</i> en cormo (rangos) y diferencia	Biomasa radical (g) y diferencia
BC EF +ME+MM	140.98 +/- 7.14 a	55.83 +/-5.83 ab	20.67 +/- 1.71 ab
BC EF + ME	131.99 +/-6.61 ab	71.64 +/-9 a	19.93 +/- 1.58 abc
BC Gmelina			
ME+MM	125.95 +/- 6.19 ab	49.79 +/- 11.24 ab	19.07 +/- 1.48 abcd
BC EF+MM	122.57 +/- 10.1 abc	46 +/- 19.5 ab	22.63 +/- 2.42 a
BC caña +MM	117.33 +/-6.61 bc	55.86 +/- 11.58 ab	18.24 +/- 1.58 abcde
BC caña + ME	114.04 +/-6.19 bcd	70.38 +/-9.57 a	21.34 +/- 1.48 a
BC EF	107.51 +/-6.61 cde	71.64 +/- 9 a	14.4 1.58 ef
BC Gmelina	107.3 +/-6.19 cde	51.5 +/- 12.86 ab	19.88 +/- 1.48 abc
BC caña +ME+MM	107.21 +/-6.61 cde	49.79 +/- 11.24 ab	16.74 +/- 1.58 bedef
BC Gmelina ME	99.6 +/-6.61cdef	32.57 +/- 10.57 b	15.26 +/- 1.58 def
BC caña	98.31 +/-6.61 def	46.64 +/- 3.36 ab	14.3 +/- 1.58 ef
BC Gmelina MM	95.65 +/-6.19 ef	52.19 +/- 10.67 ab	13.47 +/- 1.48 f
Testigo 2	91.09 +/- 6.19 ef	53.5 +/- 12.89 ab	15.7 +/- 1.48 cdef
Químico	81.27 +/- 7.14 f	23.67 +/- 12.7 b	20.15 +/- 1.71 abc
Testigo	54.06 +/- 6.19 g	31.88 +/- 5.71 b	18.29 +/- 1.48 abcde

Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes (Prueba LSD Fisher $p<0.05$); \pm error estándar.

3.2 Crecimiento

Las variables se modelaron y transformaron a rangos; en altura se obtuvo diferencia entre tratamientos ($p<0.0240$), al igual que en el número de hojas ($p<0.0180$), en área foliar aproximada ($p<0.0094$) y en grosor del pseudotallo ($p<0.0047$).

Los tratamientos Químico y BCEF +MM presentaron menor altura que el resto de los tratamientos; todos los tratamientos con BC presentaron mayor altura comparados con el Testigo, incluido el Testigo+FO. El tratamiento BC Gmelina logró desarrollar un pseudotallo significativamente más grueso que los demás tratamientos (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados de altura*, Grosor de pseudotallo*, área foliar aproximada* y número de hojas* por tratamiento. Datos con error estándar y diferencia estadística (LSD Fisher).

Tratamiento	Altura (cm)	Tratamiento	Grosor (cm)	Tratamiento	Área foliar aproximada (cm ²)	Tratamiento	Número de hojas (unidad)
BCGmelina	48.74 +/- 1.28 a	BCGmelina	13.68 +/- 0.35 a	BCGmelina+ME+MM	1293.94 +/- 66.55 ab	BCGmelina+ME+MM	8.88 +/- 0.23 a
BCGmelina+ME+MM	48.31 +/- 0.55 ab	BCGmelina+ME+MM	13.35 +/- 0.3 ab	BCGmelina	1244.04 +/- 49.53 ab	Testigo	8.75 +/- 0.45 ab
BCGmelina+MM	48.15 +/- 2.41 a	BCcaña+ME	13.04 +/- 0.13 abcd	BCcaña+ME	1241 +/- 45.36 ab	BCGmelina	8.38 +/- 0.42 ab
Testigo+FO	47.84 +/- 2.22 ab	Testigo+FO	12.79 +/- 0.42 abcd	BCcaña+MM	1238.1 +/- 181.03 a	BCcaña+ME	7.63 +/- 0.26 bcde
BCcaña+ME	47.29 +/- 0.82 abc	BCGmelina+MM	12.4 +/- 0.38 bcde	Testigo+FO	1229.19 +/- 88.37 ab	Testigo+FO	7.63 +/- 0.32 bcde
BCcaña+MM	45.84 +/- 6.59 a	BCcaña+MM	12.35 +/- 1.8 a	BCGmelina+MM	1218.2 +/- 79.87 ab	BCcaña+ME+MM	7.5 +/- 1.21 abc
BCGmelina+ME	43.14 +/- 6.55 abc	BCEF	12.03 +/- 1.73 ab	BCEF+ME	1187.31 +/- 187.59 a	BCcaña+MM	7.5 +/- 1.1 ab
BCEF+ME	42.39 +/- 6.37 ab	BCEF+ME	11.95 +/- 1.73 ab	BCcaña	1186.7 +/- 177.66 ab	BCGmelina+MM	7.5 +/- 0.27 bcde
BCcaña+ME+MM	42.23 +/- 6.17 abc	BCcaña+ME+MM	11.46 +/- 1.69 abcd	BCEF	1157.98 +/- 173.23 ab	BCEF	6.88 +/- 1.06 bcde
BCEF	42.16 +/- 6.19 abc	BCGmelina+ME	11.38 +/- 1.64 abcd	BCGmelina+ME	1147.79 +/- 176.05 ab	BCcaña	6.38 +/- 0.96 cde
BCcaña	41.61 +/- 6.12 abc	BCcaña	11.25 +/- 1.63 bcde	BCcaña+ME+MM	1074.63 +/- 167.02 abc	BCEF+ME+MM	6.38 +/- 1.41 abcd
BCEF+ME+MM	37.25 +/- 8.48 abc	Testigo	11.19 +/- 0.35 e	BCEF+ME+MM	982.39 +/- 221.96 abc	BCEF+ME	6.25 +/- 0.98 cde
Testigo	36.08 +/- 0.99 d	BCEF+ME+MM	10.24 +/- 2.26 abc	Químico	780.51 +/- 171.79 cd	BCGmelina+ME	6.13 +/- 0.91 de
Químico	34.21 +/- 7.59 bc	Químico	9.19 +/- 2.03 de	Testigo	730.01 +/- 50.07 d	Químico	5.25 +/- 1.16 e
BCEF+MM	18.63 +/- 9.11 cd	BCEF+MM	5.11 +/- 2.5 cde	BCEF+MM	570.56 +/- 281.13 bcd	BCEF+MM	3.5 +/- 1.72 cde

Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes (Prueba LSD Fisher $p < 0.05$); \pm error estándar; *Se modelo como rango pero se presentan sus valores medios originales.

Aunado a lo anterior, BC Gmelina+ME y MM y BC caña con ME presentaron mayor grosor del pseudotallo y fueron diferentes estadísticamente en comparación con el Testigo y el tratamiento Químico. El único caso donde un tratamiento con BC obtuvo igual o menor grosor que el Testigo fue el BCEF+MM.

En el caso del área foliar aproximada BCGmelina+MM+ME y BCGmelina presentaron los más altos valores y alcanzaron entre 1290cm² y 1240 cm² y fueron distintos al tratamiento Químico y Testigo quienes por su parte alcanzaron 780cm² y 730cm² lo que significa una diferencia aproximada del 40% equivalente a la reducción del área de captación de luz.

El BC Gmelina solo y en combinación con MM y ME promovió la mayor aparición de hojas (aproximadamente nueve), también el Testigo, pero evidentemente las hojas fueron más grandes en el BC Gmelina; en contraste el tratamiento Químico se reportó como el que menos hojas produjo (aproximadamente cinco). El BCEF +MM tampoco resultó con un número normal de hojas ya que se vio afectado por la alta mortalidad inicial.

4. Discusión

El uso de microorganismos *PGRP* ha sido validado en relación a la mejoría del rendimiento y disminución del uso de fertilizantes químicos. En ese sentido un estudio en Israel corrobora el mayor crecimiento de raíces de canola cuando se evaluó *Trichoderma asperellum* raza T202 (Viterbo *et al.* 2010).

El anterior estudio es consistente con los resultados obtenidos respecto al peso de la semilla (cormo), ya que todos los tratamientos que recibieron endófitos, entre esos *Trichodermas*, mejoraron sus valores medios en rendimiento de biomasa fresca cuando fueron comparados con el testigo.

Estudios en la India concluyeron que existe gran potencial de las bacterias endófitas como biofertilizante e inoculante. La bacteria *Bacillus aryabhata* benefició en sanidad y productividad a los cultivos de soya y trigo, pues se mejoró la disponibilidad del zinc (Ramesh *et al.* 2014).

En este estudio los tratamientos que recibieron bacterias endófitas -de tipo *Bacillus*- presentaron valores altos en área foliar y grosor del pseudotallo; además fueron distintos y superiores a los tratamientos Testigo y Químico lo cual es acertado con el anterior estudio citado.

El género de bacterias *Burkholderia* posee una variabilidad de especies que se relaciona con el historial y manejo agronómico del suelo y no con el tipo de cultivo (Salles *et al.* 2004). En Brasil un estudio con caña de azúcar y endófitos de *B. cepacia*, reportó incrementos de la

biomasa explicados por la promoción del crecimiento y la sanidad de las plantas (Mendes *et al.* 2007).

En esta investigación la combinación de distintas fuentes de BC y las bacterias endófitas de *B. cepacia* significó obtener niveles bajos de severidad de enfermedad en los cormos, por lo que se suma a las investigaciones que aseveran la efectividad de las bacterias endófitas para controlar enfermedades; cabe resaltar que no se evaluó por separado a esta bacteria así que su eficacia se dio en conjunto con otras de tipo *Bacillus* y con hongos *Trichoderma*.

Los resultados obtenidos sobre la promoción del crecimiento en altura, grosor y área foliar con los tratamientos de BC que fueron acompañados de los microorganismos, con certeza corroboran que dichos microbios pueden ser clasificados como microorganismos promotores del crecimiento (PGRP, por sus siglas en inglés) de acuerdo con Sofo *et al.* (2014).

Mientras que el tratamiento Químico mostró mayor incidencia de enfermedad, perdió hojas y por consiguiente, disminuyó su capacidad fotosintética- la combinación de las distintas fuentes de BC combinadas con ME+MM resultaron con altos niveles en la producción de hojas y bajos niveles en la incidencia de enfermedad en un suelo fuertemente ácido.

Los anteriores resultados se pueden explicar con estudios como los de Kinkel *et al* (2011) en los que se destacó la importancia de los microorganismos indígenas y el rol que pueden ejercer para alcanzar suelos supresivos y ocasionar promoción de crecimiento de los cultivos en corto tiempo y de acuerdo al manejo que se haga del suelo.

En los primeros meses de la investigación se encontró que la asociación de BCEF+MM presentó una posible alta incidencia y severidad de *Foc*; lo que significó una pérdida del 62.5% de las plantas. El TTO BCGA+MM presentó una incidencia alta aunque menor que BCEF+MM. Estos resultados pueden deberse a que probablemente el MM contenía cepas de *Foc* y BCEF y BCGA son tipos de BC recalitrantes que provienen de plantas dicotiledóneas y tienen mayores contenidos de lignina y hemicelulosa.

En contraste a lo anterior, el BCcaña+MM no presentó esa alta severidad de enfermedad. Pudiera explicarse que BCcaña proviene de una planta monocotiledónea y presentó 10 veces más actinos que los demás tipos de BC (Cuadro 2); lo que podría indicar la inhibición temprana de *Foc* por competencia o antibiosis, pero no se puede ser concluyente sobre esa situación.

Independientemente de ser mono o dicotiledónea; químicamente BCcaña contenía más nitrógeno, más humedad y más hierro que el BCEF y BCGmelina, por tanto, la humedad y contenidos nutricionales deben tomarse en cuenta en futuros trabajos, pues también podrían incidir en el biocontrol de *Foc*.

Recientemente Román (2012) demostró la correlación positiva entre suelos ácidos, marchitez por *Fusarium* y plantas *Gros Michel* en el Perú. Los resultados de la presente investigación

indican que aún con un suelo Ultisol fuertemente ácido (pH 4.2) la acidez del suelo disminuyó con BC. La adicción de BC incrementó la promoción del crecimiento incluso por encima del Testigo, del tratamiento Químico y de tratamientos con BC sin microorganismos.

5. Conclusiones

El tratamiento Químico contribuyó a la mayor enfermedad de las plantas, evidenciado en la severidad de *Foc* raza 1 (3,5 en una escala de 1 a 5, donde se considera a 5 la planta muerta), el tratamiento Testigo no fue diferente al químico estadísticamente, pero registró menor severidad de *Foc* raza 1 (2,5) lo que indica que el uso de fertilizante químico en un suelo Ultisol estaría contraindicado para cultivar banano *Gros Michel*.

Los tratamientos que recibieron la combinación de endófitos y se combinaron a su vez con las fuentes de biocarbón de la Estufa Finca y *Gmelina* registraron una severidad de 1,4 , y el tratamiento que recibió biocarbón de caña de azúcar registro 1,5 de severidad, lo que indica que esta combinación puede ser tenida en cuenta para proteger a los cultivos de *Gros Michel* cuando se siembran en Ultisoles.

El grupo de tratamientos que recibieron microorganismos benéficos (MM y mezclados con endofitos y MM) - que fueron comparados con los tratamientos testigo y químico- crecieron más, soportaron con mayor éxito a *Foc* y sobrevivieron en mayor porcentaje (no fueron estadísticamente diferentes a los tratamientos con solo endófitos). Por lo que no son la herramienta más efectiva para controlar a *Foc* pero resultan mejores que no aplicar nada.

El tiempo de infección de *Foc* se calculó entre 5 y 6 semanas después de haber infectado a las plantas sanas provenientes de cultivo de tejidos, este tiempo se determinó al registrar los primeros síntomas visuales en tallo y hojas.

La combinación de las bacterias *Bacillus aryabhatai*, *Burkholderia cepacia* y el hongo *Trichoderma Asperellum* resultó adecuada al mezclarse y aplicarse en conjunto para promover el crecimiento y la sanidad de las plantas *Gros Michel*, pero este efecto se pudo lograr acompañado de fuentes de BC de alta calidad ambiental como el BCGmelina, BCcaña y en especial el BCEF que produjo el proyecto Estufa Finca.

Recomendaciones

Se recomienda para futuros trabajos hacer combinaciones de fertilizantes químicos, fuentes locales de BC y microorganismos benéficos como los usados en esta investigación, para ayudar técnicamente a los productores que se encuentran en la transición a ser agroecológicos.

La investigación científica con el BC en *Foc* es importante para el pequeño agricultor que tiene sus cultivos en suelos ácidos, por tanto se recomienda hacer futuras investigaciones especialmente con estas características.

Es importante señalar que las investigaciones sobre MM e incidencia de las enfermedades del Gros Michel y BC; deben hacerse directamente en los cultivos de los agricultores, es decir, que no se queden en pruebas de invernadero o laboratorio. La presente investigación retomó los conceptos de la fertilización orgánica de Agricultura Natural de MOA enfatizando los beneficios de los microorganismos del bosque, cepas endófitas y hábitats para microorganismos del suelo a través del biocarbón.

6. Agradecimientos

A SeaChar *Seattle Biochar Working Group* por financiar la beca para esta investigación. Al equipo de *Bioversity* Costa Rica y en especial a Ph.D Miguel Angel Dita por facilitar apoyo científico, logístico y humano.

7. Bibliografía

- Alcazar, A.; Acosta-Buitrago, J. 2010. Cartilla Teorico-ilustrativa Las maravillas de los microorganismos de montaña Fundacion ETIKAVERDE: 16.
- Asai, Hidetoshi. 2009. Biochar amendment techniques for upland rice production in Northern Laos: 1. Soil physical properties, leaf SPAD and grain yield. *Field Crops Research* 111.1 (2009): 81-84.
- Bonanomi, G.; Antignani, V.; Capodilupo, M.; Scala, F. 2010. Identifying the characteristics of organic soil amendments that suppress soilborne plant diseases. *Soil Biology and Biochemistry* 42(2): 136-144.
- Dias, T.; Dukes, A.; Antunes, P.M. 2014. Accounting for soil biotic effects on soil health and crop productivity in the design of crop rotations. *Journal of the science of food and agriculture*.
- Elad, Y.; David, D.R.; Harel, Y.M.; Borenshtein, M.; Kalifa, H.B.; Silber, A.; Graber, E.R. 2010. Induction of systemic resistance in plants by biochar, a soil-applied carbon sequestering agent. *Phytopathology* 100(9): 913-921.
- Elmer, W.H.; Pignatello, J.J. 2011. Effect of biochar amendments on mycorrhizal associations and Fusarium crown and root rot of asparagus in replant soils. *Plant Disease* 95(8): 960-966.
- Fravel, D.; Olivain, C.; Alabouvette, C. 2003. Fusarium oxysporum and its biocontrol. *New Phytologist* 157(3): 493-502.
- Henreaux, J. 2012.. Efecto del biocarbón combinado con fertilizantes orgánicos y microorganismos benéficos sobre el desarrollo, productividad y resistencia de las plantas, CATIE, Turrialba,. Tesis, Mag. Sc. CR.
- Higa, T. 1994. Effective Microorganisms: A new dimension for nature farming. *In Proceedings of the Second International Conference on Kyusei Nature Farming*. US Department of Agriculture, Washington, DC, USA 1994. p. 20-22.
- Hojah, J. 2013. Impacto del uso de biocarbón sobre la calidad de suelos y producción de cacao (*Theobroma cacao* L.) en sistemas agroforestales, Reserva Indígena Bribri, Talamanca, Costa Rica. MSc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 93 p.
- Inyang, M.; Gao, B.; Pullammanappallil, P.; Ding, W.; Zimmerman, A.R. 2010. Biochar from anaerobically digested sugarcane bagasse. *Bioresource Technology* 101(22): 8868-8872.

- Jeffery, S.; Verheijen, F.; Van Der Velde, M.; Bastos, A. 2011. A quantitative review of the effects of biochar application to soils on crop productivity using meta-analysis. *Agriculture, Ecosystems & Environment* 144(1): 175-187.
- Kameyama, K.; Miyamoto, T.; Shiono, T.; Shinogi, Y. 2012. Influence of sugarcane bagasse-derived biochar application on nitrate leaching in calcaric dark red soil. *Journal of Environmental Quality* 41(4): 1131-1137.
- Kinkel, L.L.; Bakker, M.G.; Schlatter, D.C. 2011. A coevolutionary framework for managing disease-suppressive soils. *Annual review of phytopathology* 49: 47
- Lara Fiallos, D.F. 2009. uso de bacterias endofíticas para el control biológico del Mal de panamá (*fusarium oxysporum f. sp. cubense*) en el cultivar gros micheL (AAA). MSc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 68 p.
- Lehmann, J, and Rondon, M. "Bio-char soil management on highly weathered soils in the humid tropics." *Biological approaches to sustainable soil systems*. CRC Press, Boca Raton, FL (2006): 517-530.
- Major, Julie, et al. 2010. "Maize yield and nutrition during 4 years after biochar application to a Colombian savanna oxisol." *Plant and Soil* 333.1-2: 117-128.
- Mendes, R.; Pizzirani-Kleiner, A.A.; Araujo, W.L.; Raaijmakers, J.M. 2007. Diversity of cultivated endophytic bacteria from sugarcane: genetic and biochemical characterization of *Burkholderia cepacia* complex isolates. *Applied and environmental microbiology* 73(22): 7259-7267.
- Pacheco, F. 2006. Lactofermentados: una alternativa en la producción de abonos líquidos fermentados. Centro Nacional en Agricultura Orgánica. INA, <http://www.rapaluruaguay.org/organicos/articulos/Lactofermentos.pdf>.
- Pacheco, F. 2009. Evaluación de la eficacia de la aplicación de inóculos microbiales y de eissenia fetida en el proceso de compostaje doméstico de desechos urbanos, España. septiembre 89 p.
- Pérez, L.; Battle, A.; Fonseca, J. 2003. *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* en Cuba: biología de las poblaciones, reacción de los clones híbridos de la FHIA y biocontrol. In *Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras enfermedades asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos* (2003, Guayaquil, Ecuador). 2004. Actas. Eds. G. Rivas; F. Rosales. Montpellier, Francia. INIBAP (Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y Plátano).192 p.
- Pocasangre, L.E.; Vicente, L.P.; Martínez, E.; Brown, D. 2010. Taller de entrenamiento sobre diagnóstico y caracterización de la marchitez por *Fusarium* o Mal de Panamá.
- Quirk, R.; Taylor, P. 2010. Chapter 19 Producing Biochar on sugar Cane Farms: Industry Benefits, Local and Global implications. Taylor, P. . In Taylor, P. ed. 2010. *The Biochar Revolution: Transforming Agriculture and Environment*. Victoria, Australia 361 p. .
- Ramesh, A.; Sharma, S.K.; Sharma, M.P.; Yadav, N.; Joshi, O.P. 2014. Inoculation of zinc solubilizing *Bacillus aryabhattai* strains for improved growth, mobilization and biofortification of zinc in soybean and wheat cultivated in Vertisols of central India. *Applied Soil Ecology* 73: 87-96.
- Román Jeri, C. 2012. Consideraciones epidemiológicas para el manejo de la marchitez por *Fusarium* (*Fusarium oxysporum f. sp. cubense*) del banano en la región central del Perú. Turrialba Costa Rica, Tesis MSc. 187 p.
- Salas, E.; Araya, M. 2009. Efecto combinado de biocarbono (biochar) comunidades de microorganismos nativos (CMN) y polvo de rocas sobre el crecimineto de plantas in

vitro de banano (Musa AAA cv. Grande Naime) y la poblacion de *Radopholus similis*. Direccion de investigaciones, informe anual CORPORACION NANANERA NACIONAL CORBANA: 7.

SALAS, E. s/f. Biofermentos. CORBANA.

Salas, P.; Fernández, T.; Soto; Estrada. 2011. Efecto del Bio-carbón sobre Fusarium oxysporum f. sp. cubense y el desarrollo de plantas de banano (Musa AAA). Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica.

Salles, J.F.; Van Veen, J.A.; Van Elsas, J.D. 2004. Multivariate analyses of Burkholderia species in soil: effect of crop and land use history. Applied and environmental microbiology 70(7): 4012-4020.

Sofo, A.; Nuzzaci, M.; Vitti, A.; Tataranni, G.; Scopa, A. 2014. Control of Biotic and Abiotic Stresses in Cultivated Plants by the Use of Biostimulant Microorganisms. *In*. 2014. Improvement of Crops in the Era of Climatic Changes. Springer. p. 107-117.

Soto, G.; Joseph, S. 2012. 20 years of Biochar in Costa Rica (en línea). Disponible en: <http://www.biochar-international.org/bocashi>

Viterbo, A.; Landau, U.; Kim, S.; Chernin, L.; Chet, I. 2010. Characterization of ACC deaminase from the biocontrol and plant growth-promoting agent Trichoderma asperellum T203. FEMS microbiology letters 305(1): 42-48.

Anexos

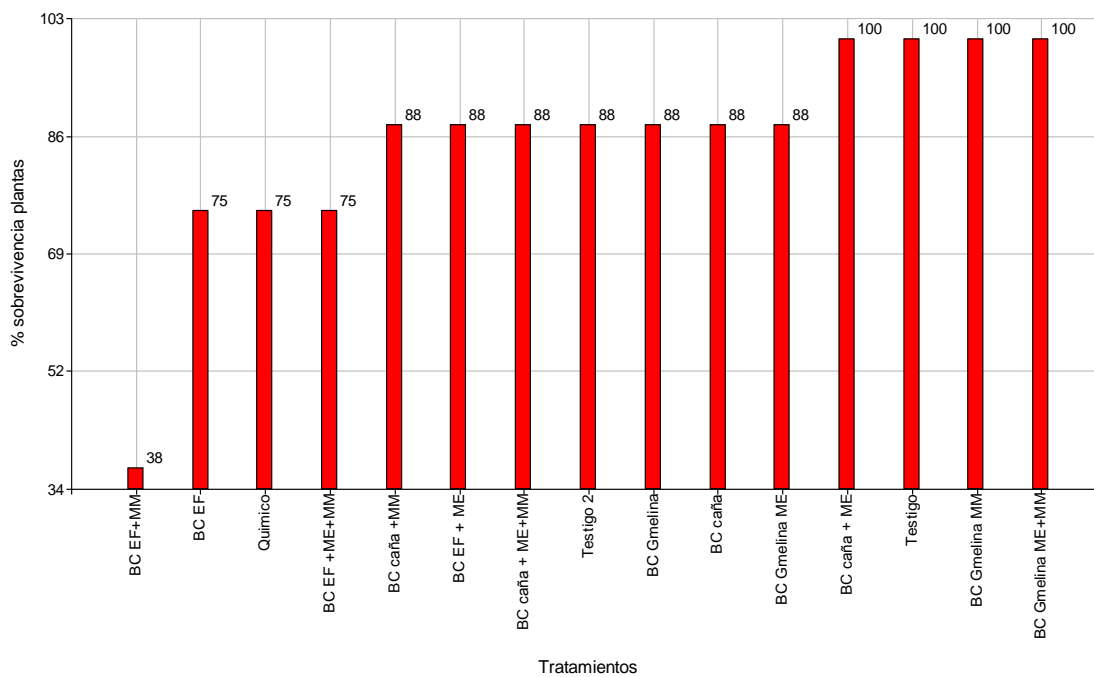


Figura 3. Porcentajes de sobrevivencia de tratamientos.

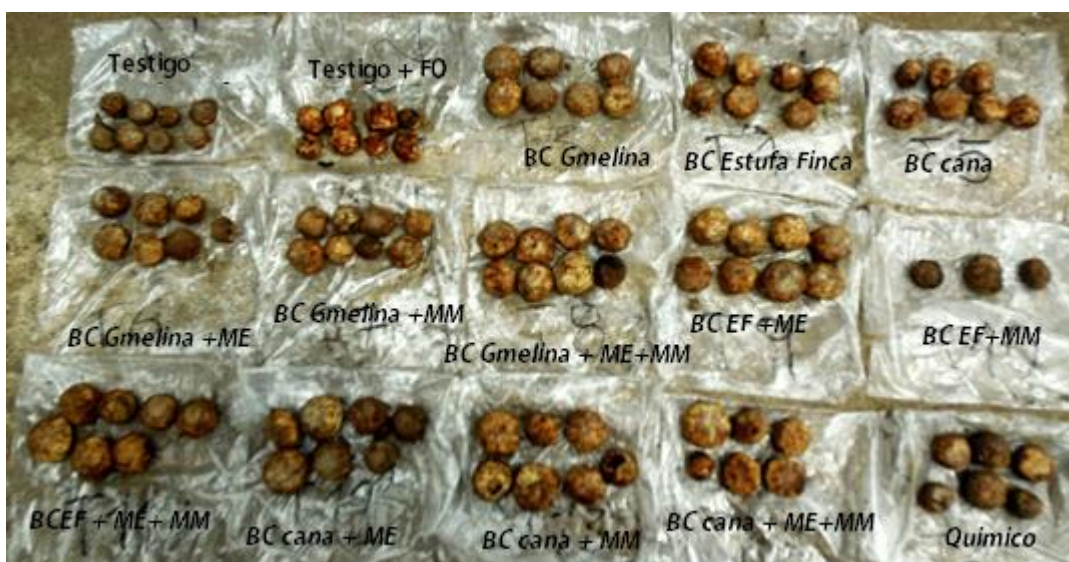


Figura 4. Efecto de tratamientos en microcormos de Gros Michel. BC: biocarbón, FO: fertilización orgánica, ME: microorganismos endófitos, MM: microorganismos de montaña EF: Estufa Finca.