

EVALUACION DE ENMIENDAS Y MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS PARA EL MANEJO DE *Pseudomonas solanacearum* E.F.Smith EN CULTIVO DE TOMATE (*Lycopersicon esculentum* L.)

Jorge Ulises Díaz B¹

¹ MSc. Departamento de Protección Agrícola y Forestal, Universidad Nacional Agraria. Apartado 453, e-mail: esave@ibw.com.ni

RESUMEN

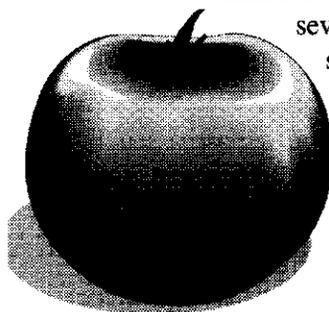
Se estudió el efecto de dos enmiendas y tres microorganismos como posibles factores supresivos y antagonistas respectivamente al agente causal de la marchitez bacteriana *Pseudomonas solanacearum* E.F.Smith. Los experimentos fueron conducidos en campo e invernadero en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Turrialba, Costa Rica. Se establecieron en diseño de parcelas divididas con cuatro repeticiones en el campo y tres en el invernadero. Las parcelas principales se dispusieron en bloques completamente al azar. Se evaluaron tres tratamientos (compost comercial, cal dolomítica y un tratamiento sin enmiendas) en las parcelas principales y ocho tratamientos (*Pseudomonas cepacia*, *Bacillus cereus* y *Glomus occultum* solos y en combinación) en las subparcelas. Los tratamientos con enmiendas se asignaron a las parcelas principales, mientras que los tratamientos con antagonistas se asignaron a las subparcelas. Las variables evaluadas fueron incidencia y severidad de la enfermedad y área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE). Se determinó el efecto de las enmiendas sobre las poblaciones de *P. solanacearum* en tres momentos. En el campo no hubo diferencias significativas en las variables evaluadas. Las poblaciones de *P. solanacearum* fueron reducidas significativamente en el suelo. En invernadero, las enmiendas redujeron significativamente la severidad de la enfermedad y el ABCPE. Los antagonistas no redujeron significativamente la incidencia y la severidad en el campo e invernadero.

Palabras claves: marchitez bacteriana, control biológico, incidencia, severidad, ABCPE.

ABSTRACT

The effects of two amendments and three microorganisms were studied as possible suppressive and antagonistic factors to bacterial wilt *Pseudomonas solanacearum* E.F.Smith. The experiments were conducted in field and greenhouse at the Tropical Agriculture Research and Higher Education Centre (CATIE), located in Turrialba, Costa Rica. Treatments were arranged in a split-plot, using randomized complete block design with four (field) and three (greenhouse) repetitions. Three treatments were evaluated in the main plots and eight in the subplots. The treatments with amendments (commercial compost and dolomitic lime) and control plot were assigned to the main plots, while treatments with the antagonists (*Pseudomonas cepacia*, *Bacillus cereus* and *Glomus occultum* alone and in combinations) were assigned to the subplots. The response variables were disease incidence and severity and the area under disease progress curve (AUDPC). The effect of the amendments was determined on the populations of *P. solanacearum* in three moments. In the field experiment there were not significant differences among treatments. The *P. solanacearum* populations were reduced significantly in the soil. In the greenhouse experiment, the amendments reduced significantly disease

severity and the area under disease progress curve. The antagonists did not reduce significantly incidence and severity in both field and greenhouse experiments.



La marchitez bacteriana del tomate, causada por *Pseudomonas solanacearum* E.F. Smith es una enfermedad distribuida en las regiones tropicales y subtropicales y en regiones calientes de clima templado del mundo (Hayward, 1991). Cultivos alimenticios económicamente importantes tales como papa, tomate y bananos son afectados. La enfermedad ha sido registrada en más de 450 especies de plantas distribuidas en más de 50 familias (Hayward, 1994; Prior *et al.*, 1998).

El control de la enfermedad es difícil debido al amplio ámbito de hospedantes, a su amplia distribución, y a la variabilidad genética del patógeno (Hayward, 1991). Como en el caso de otras enfermedades bacterianas vasculares, los productos químicos no son efectivos y las prácticas de saneamiento del cultivo son difíciles de aplicar (Enfinger *et al.*, 1979). La estrategia de control generalizada ha sido la obtención de cultivares resistentes (Buddenhagen, 1986). Sin embargo, la resistencia varietal fluctúa geográficamente y en el tiempo debido a la variabilidad de las cepas del patógeno, así como también a las condiciones climáticas y ambientales locales (Hartman, 1991).

Recientemente, la investigación sobre métodos de control de la marchitez bacteriana ha estado dirigida hacia la evaluación de enmiendas orgánicas e inorgánicas y la aplicación de microorganismos antagonistas a las semillas o a las raíces de las plantas antes de la siembra.

La incorporación de varios materiales orgánicos e inorgánicos en suelo infestado con *P. solanacearum* ha demostrado que suprime la marchitez bacteriana del tomate (Michel *et al.*, 1997; Michel y Mew, 1998; Sood *et al.*, 1998). Entre los microorganismos antagonistas a *P. solanacearum* se reportan *P. fluorescens* y *P. cepacia* (Hartman *et al.*, 1993; Sood *et al.*, 1998), *Bacillus* spp., y hongos micorrízicos vesículo-arbusculares (Sood *et al.*, 1998), mutantes avirulentos de *P. solanacearum* (Trigalet *et al.*, 1998).

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto de enmiendas, compost comercial y cal dolomítica, y de microorganismos como *Pseudomonas cepacia*, *Bacillus cereus* y *Glomus occultum* sobre la incidencia, severidad y poblaciones de *Pseudomonas solanacearum* en condiciones de campo e invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron dos experimentos, uno en campo y otro en invernadero. En los dos experimentos se utilizó el material experimental: *Pseudomonas cepacia* Palleroni & Holmes (Pc), *Bacillus cereus* Frankland & Frankland (Bc), *Glomus occultum* (Go) como microorganismos antagonistas y compost comercial y cal dolomítica como enmiendas. Se utilizó la variedad de tomate "Hayslip" con susceptibilidad a *P. solanacearum*. Para el semillero se utilizaron bandejas "Tray Master" No. 51. Como sustrato se utilizó mezcla de suelo esterilizado, granza de arroz y bocashi en

proporción 10:2:1 más 20 g de 10-30-10 (N-P-K) por kilogramo de mezcla de sustrato (Cubillo *et al.*, 1998).

Experimento de campo. El experimento de campo se estableció en la Estación Experimental "La Montaña" del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), ubicado en Turrialba, provincia de Cartago, Costa Rica, a 602 msnm, entre los 9° 55'21" de latitud norte y 83° 39'40" de longitud oeste, con precipitación promedio anual de 2065 mm, humedad relativa de 87% y temperatura promedio anual de 21° C, con una máxima de 26° C y una mínima de 18° C. Según Kass *et al.*, (1995), el suelo del área experimental pertenece al Orden Inceptisol, Suborden Tropepts, Gran Grupo Eutropepts, Subgrupo Andic y Familia Fine, Isohyperthermic, Halloysitic.

Se utilizó un diseño de parcelas divididas con las parcelas principales dispuestas en bloques completamente al azar y cuatro repeticiones. En las parcelas principales se ubicaron tres tratamientos: parcelas con compost, parcelas con cal dolomítica y parcelas sin enmiendas. En las subparcelas se ubicaron ocho tratamientos: testigo, los antagonistas solos y en combinación (*P. cepacia*, *B. cereus*, *G. occultum*, *P. cepacia* + *B. cereus*, *P. cepacia* + *G. occultum*, *B. cereus* + *G. occultum* y *P. cepacia* + *B. cereus* + *G. occultum*).

Las enmiendas fueron incorporadas el 11 de enero de 1999 (cuatro meses antes del transplante) a razón de 40 t.ha⁻¹ para el compost y 5 t.ha⁻¹ para cal dolomítica según las recomendaciones de Sasaki *et al.* (1994) y Michel y Mew (1998). Las semillas de tomate fueron bacterizadas antes de la siembra con los antagonistas de acuerdo a la técnica empleada por Mao *et al.* (1998).

La biomasa de las bacterias antagonistas *P. cepacia* y *B. cereus* se obtuvo 24 horas después de cultivarlas en medio de cultivo agar nutriente. La biomasa de las bacterias por separado y una combinación de ellas se centrifugó a 6000 r.p.m., por diez minutos, luego el sobrenadante se decantó. Posteriormente, 20 ml de la solución sucrosa-carboximetil celulosa y 2 ml de los pellets bacterianos se agitaron en un vortex para lograr una mezcla homogénea. Esta mezcla se utilizó para tratar tres pequeños lotes de semillas de tomate de cinco gramos cada uno. Se bacterizaron cinco gramos de semilla de tomate con *P. cepacia*, cinco gramos con *B. cereus* y cinco gramos con una combinación de las dos bacterias (Pc+Bc). Cada semilla fue cubierta con aproximadamente 1 x 10⁶ unidades formadoras de colonias (ufc) de las bacterias antagonistas. Las semillas se colocaron en papel toalla y se dejaron secando durante toda la noche en una cámara de flujo laminar para su siembra al día siguiente.

Antes de sembrar las semillas bacterizadas se colocaron 4 g de inóculo del hongo micorrízico *Glomus occultum* en la parte media del sustrato con el que se llenaron las bandejas. Posteriormente, se procedió a colocar dos semillas en cada orificio de las bandejas. Las plántulas se transplantaron en el campo a los 26 días después de la

siembra. Un día antes del trasplante se aplicó una solución (20 ml) de las bacterias antagonistas solas y en combinación al sistema radical de las plántulas de tomate.

Después del trasplante se aplicó riego. Se hicieron dos aplicaciones de insecticidas para combatir crisomélidos y seis aplicaciones de fungicidas para el control de *Phytophthora infestans* (Mont.) De Bary. El control de malezas fue manual. Se fertilizó con una fórmula completa (N-P-K) al momento del trasplante y con 18-5-15-6-2 (N-P-K-Mg-B) al inicio de la floración.

Se realizaron tres monitoreos de las poblaciones de *P.solanacearum*: en enero (antes de la incorporación de las enmiendas), en abril (antes del trasplante) y en septiembre (etapa de fructificación). La toma de muestras y el conteo de las poblaciones se hizo siguiendo la técnica empleada por Michel *et al.* (1997).

Experimento de Invernadero. Se utilizó un diseño de parcelas divididas. En las unidades principales se colocaron tres tratamientos (sustrato con compost, sustrato con cal dolomítica y sustrato sin enmiendas). El sustrato consistió en mezcla de suelo estéril y arena. En las subunidades se ubicaron ocho tratamientos (tres antagonistas solos y cuatro combinaciones de ellos más un tratamiento testigo). Las raíces de 63 plantas de tomate de dos semanas de germinadas fueron sumergidas por una hora en una solución bacteriana a una concentración de aproximadamente 1×10^8 ufc.ml⁻¹ de los antagonistas solos y en combinación. Las raíces de las plantas del tratamiento testigo fueron sumergidas por una hora en agua destilada según la técnica empleada por Misaghi *et al.* (1992). Inmediatamente después, las plantas tratadas y no tratadas fueron sembradas en vasos plásticos de doce onzas de capacidad que contenían los tres tipos de sustratos. En los tratamientos con el hongo endomicorrízico *G. occultum* se depositaron 2 g de inóculo del hongo inmediatamente debajo del sistema radicular de las plantas.

A los 27 días después de la siembra (DDS), las plantas de tomate fueron trasplantadas en macetas de 3.75 kg de capacidad que contenían los tres tipos de sustratos que se mencionaron anteriormente. Las plántulas fueron trasplantadas con el suelo contenido en los vasos y adherido a las raíces. Nueve días antes del trasplante se inocularon 63 macetas con una suspensión bacteriana del aislamiento TL8-1 de *P. solanacearum*. Esta suspensión se obtuvo de platos petri con el medio agar tetrazolium chloride (TZC) donde el patógeno había crecido a 30° C. La suspensión se preparó en agua destilada estéril y se ajustó a una densidad óptica de 600 nm (OD₆₀₀) = 0.3 (aproximadamente 6×10^8 ufc/ml) de acuerdo a lo propuesto por Michel y Mew (1998). En cada maceta se depositó 20 ml de la suspensión bacteriana. En este experimento no se hicieron heridas a las raíces de las plantas.

A las plantas se les aplicó riego diario. A los 36 DDS las plantas fueron fertilizadas con la fórmula 10-30-10 (N-P-K) aplicada a una dosis de 5 gramos.maceta⁻¹; para combatir

el mildiú polvoriento fue necesaria la aplicación de azufre a los cinco días después del trasplante a una dosis de 1.5 g L⁻¹.

En el campo se evaluó la incidencia con la fórmula propuesta por James (1983): $I = N^{\circ}$ de plantas enfermas/ N° total de plantas evaluadas (sanas y enfermas) y la severidad de la marchitez según la escala de Kempe y Sequeira (1983): 0 = plantas sanas; 1 = 25% del follaje marchito; 2 = 26-50% del follaje marchito; 3 = 51-75% del follaje marchito; 4 = 76-100 % del follaje marchito. Las evaluaciones se realizaron durante siete semanas después del trasplante. En el invernadero se registró el índice de severidad de la enfermedad (ISE) durante cuatro semanas después de la inoculación de las macetas con el patógeno. Se calculó el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) mediante la siguiente fórmula: $ABCPE = [\sum ((X_{i+1} + X_i)/2) (t_{i+1} - t_i)]$, donde X_i es la medida de la severidad de la enfermedad en la i -ésima observación, t es la medida del tiempo, y n es el número total de observaciones. El conteo de poblaciones de *P.solanacearum* y las demás variables mencionadas se sometieron a análisis de varianza. Para el análisis de los datos se hizo uso del programa SAS versión 6.1.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el campo no se observaron diferencias significativas ni en los efectos principales (tratamientos con y sin enmiendas y tratamientos con antagonistas), ni en la interacción de ambos tratamientos para la variable incidencia de la enfermedad. El menor valor de incidencia fue observado en parcelas que fueron enmendadas con compost y el mayor en las parcelas que no recibieron enmienda (Figura 1A).

Los menores valores en porcentaje de incidencia fueron para los tratamientos *G. occultum*, *P. cepacia*+*B. cereus* y *P. cepacia*+*B. cereus*+*G. Occultum*. Todos fueron mejores que el testigo, aunque estadísticamente no hubo diferencias entre ellos (Figura 1B).

Para las variables índice de severidad de la enfermedad (ISE) y área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE) en el campo no se encontró diferencias significativas tanto en los efectos principales como en la interacción de los mismos (datos no presentados).

Los resultados del estudio de campo, indican que las enmiendas (compost y cal dolomítica) y microorganismos antagonistas no tuvieron efecto supresivo significativo sobre la incidencia y severidad del agente causal de la marchitez bacteriana, *P. solanacearum*. A pesar de esto, si hubo tratamientos como Go, Pc+Bc y Pc+Bc+Go, que mostraron nivel de reducción de los valores del ABCPE, la incidencia y la severidad. Sin embargo, esta reducción no fue significativa.

La influencia de factores físicos del suelo sobre el desarrollo de la marchitez bacteriana ha sido señalada con inconsistencia en los reportes de las investigaciones lle-

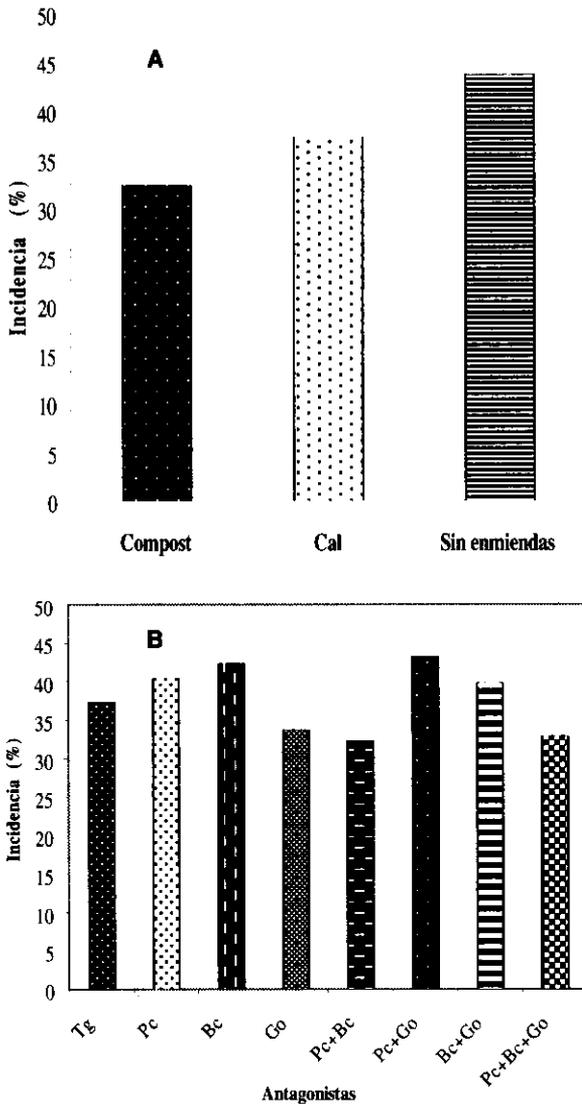


Figura 1. (A) Efecto de enmiendas sobre la incidencia de la marchitez bacteriana en tomate. **(B)** Efecto de microorganismos antagonistas sobre la incidencia de la marchitez bacteriana en tomate. Estación Experimental La Montaña, Turrialba, Costa Rica. 1999.

vadas a cabo con tal fin. Ho *et al.* (1988) señalan que la enfermedad aumentó con un incremento del pH del suelo, mientras que Locascio *et al.* (1988) reportan que la enfermedad disminuyó al incrementarse el pH del suelo. Kelman (1950) observó una disminución en la incidencia de la enfermedad con un incremento en los niveles de Ca en el suelo. Por otro lado, Jaworski y Morton (1964), no encontraron relación entre los niveles de Ca y la enfermedad. En este estudio no se encontró relación entre los niveles de Ca aportados por la cal dolomítica y la incidencia de la marchitez bacteriana, en coincidencia con lo encontrado por Jaworski y Morton (1964).

El efecto supresivo de los agentes de control biológico introducidos en el campo no fue notorio debido quizás a una pérdida de competencia ecológica, una colonización variable de las raíces de las plantas de tomate, e interferencia de un patógeno no blanco (como fue el caso de *Phytophthora infestans*). Estos tres factores han sido señalados por Weller (1988) como los principales obstáculos para el éxito de los microorganismos introducidos en el campo como agentes de control biológico. En este estudio se ha demostrado una vez más este señalamiento.

Las poblaciones de *P. solanacearum* tuvieron un comportamiento fluctuante durante el período de evaluación (enero-septiembre) y en los dos primeros muestreos no se detectaron diferencias en el número de unidades formadoras de colonias (ufc) por gramo de suelo de *P. solanacearum* en las parcelas con enmiendas (compost y cal dolomítica) y en las parcelas sin enmiendas. En el tercer muestreo se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en el número de ufc.g⁻¹ de suelo entre las parcelas con enmiendas y las parcelas sin enmiendas. En las parcelas con enmiendas no se detectaron diferencias significativas en las poblaciones de *P. solanacearum* (Figura 2).

Se estudió el efecto de dos enmiendas y tres microorganismos

Las poblaciones de *P. solanacearum* fueron reducidas significativamente en el suelo. En invernadero, las enmiendas redujeron significativamente la severidad de la enfermedad y el ABCPE.

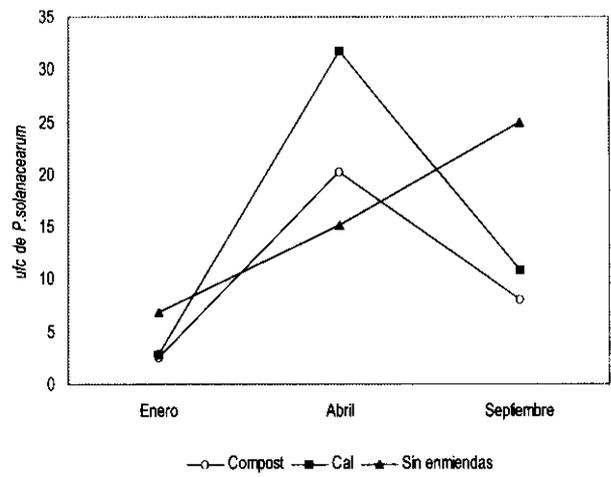


Figura 2. Comportamiento de las poblaciones de *P. solanacearum* en parcelas con enmiendas de compost (40 t.ha⁻¹), cal dolomítica (5 t.ha⁻¹) y en parcelas sin enmiendas. Estación Experimental La Montaña, Turrialba, Costa Rica. 1999.

Las poblaciones de *P. solanacearum* fueron reducidas significativamente ($p \leq 0.05$) ocho meses después de la aplicación de las enmiendas. Michel *et al.* (1997) redujeron las poblaciones de *P. solanacearum* a cero a las cuatro semanas de aplicar una enmienda consistente de urea+Ca (200 kg N + 5000 kg), la cual elevó el pH del suelo hasta 8.2. En este estudio en particular, el tiempo para reducir las poblaciones de la bacteria en el suelo fue más prolongado (ocho meses) debido a que no se aplicó urea como en el trabajo de Michel *et al.* (1997), lo que hace suponer que la urea tiene un efecto detrimental por sí misma sobre la bacteria o su efecto es sinérgico al aumentar el efecto supresor del Ca sobre las poblaciones de la bacteria de la marchitez. Esta hipótesis debe ser comprobada en investigaciones posteriores.

En el experimento de invernadero, los valores del área bajo la curva de progreso de la enfermedad (compost-15.8; cal dolomítica-19.2; y sin enmiendas-27.2) y del índice de severidad de la enfermedad (Figura 3) fueron significativamente diferentes ($p \leq 0.05$) entre los tratamientos sustratos, pero no entre tratamientos microbianos ni en la interacción tratamientos sustratos*tratamientos microbianos. El antagonista *Bacillus cereus* mostró tendencia a reducir la severidad de la marchitez bacteriana en el invernadero (datos no presentados).

En el sustrato con compost se observaron los valores promedio más bajos del ABCPE y del ISE indicando que en este experimento si hubo una respuesta positiva del compost al disminuir el efecto de la severidad de la enfermedad sobre las plantas inoculadas con el patógeno.

En el invernadero, las enmiendas redujeron significativamente la severidad de la marchitez bacteriana y los valores del ABCPE. Hernández Garboza (1997) en un estudio bajo condiciones de invernadero observó, que las plantas que crecieron sobre sustratos con enmiendas orgánicas presentaron los menores grados de severidad de la marchitez bacteriana, lo cual está de acuerdo con lo encontrado en este estudio.

La mezcla de microorganismos no aumentó su capacidad de reducir la severidad de la marchitez bacteriana. Esta misma tendencia fue encontrada por Ryder *et al.*, (1999), quienes encontraron que una mezcla de dos cepas de *Bacillus cereus*, M22 y A47-3 (en una proporción aproximada de 1:1), controló menos la enfermedad toma-todo en trigo, que los aislamientos inoculados separada-

mente. Estos resultados sugieren que existe incompatibilidad entre las cepas.

Sood *et al.* (1998) reportan que *Glomus mosseae* controló completamente la marchitez bacteriana en tomate hasta el final de un experimento de invernadero, 48 días después de la inoculación de las plantas con *P. solanacearum*. Estos mismos autores señalan que plantas tratadas con otro hongo vesículo-arbuscular, *Glomus fasciculatum* mostraron síntomas de marchitamiento a los 35 días después de la inoculación y un 100% de marchitamiento se presentó en estas plantas a los 44 días después de la inoculación. En este estudio, *G. occultum* presentó valores bajos del ABCPE y del ISE, pero no logró suprimir completamente al patógeno, lo que sugiere que puede haber una especificidad antagonista-patógeno para el caso de *G. mosseae*.

Estos microorganismos podrían ser útiles en un sistema de control integrado de la enfermedad. Se debe tener en cuenta que en este estudio se utilizó una variedad de tomate susceptible a la marchitez bacteriana, lo cual indudablemente influye en los resultados obtenidos. Su potencial podría verse incrementado si fueran utilizados en un sistema de control que incluya una variedad moderadamente susceptible al patógeno que le brinde ventajas ecológico-competitivas principalmente a aquellos antagonistas que vayan a ser introducidos en el campo donde las condiciones son completamente diferentes a las de laboratorio o invernadero.

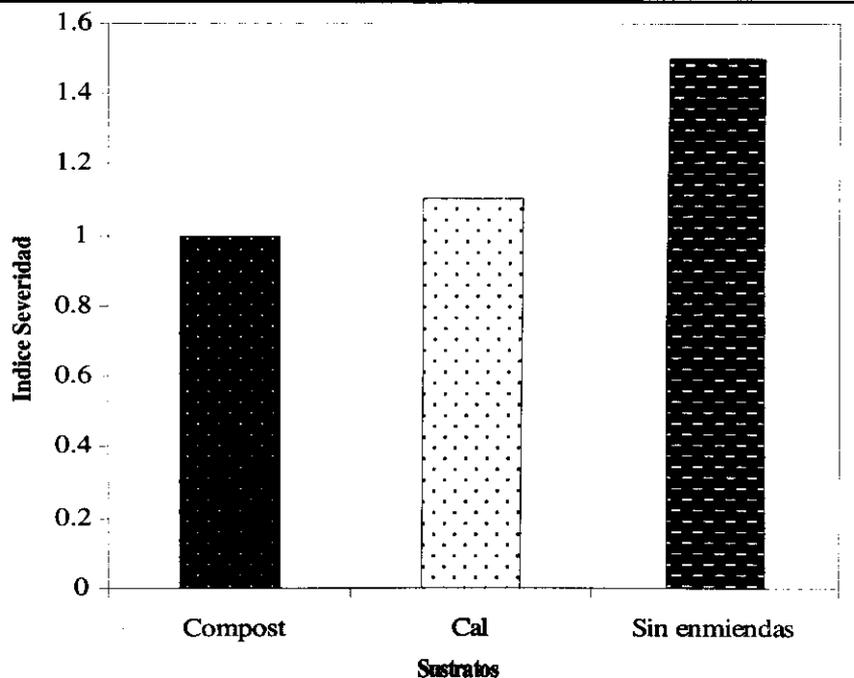


Figura 3. Efecto de enmiendas sobre la severidad de la marchitez bacteriana (*P. solanacearum*) en tomate. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 1999.

CONCLUSIONES

Las poblaciones de *P. solanacearum* E.F.Smith fueron reducidas significativamente en las parcelas con enmiendas ocho meses después de la incorporación de éstas últimas en el campo. El compost comercial utilizado en este estudio no redujo significativamente la incidencia y la severidad de la marchitez bacteriana en el campo; en invernadero la severidad fue reducida significativamente en los sustratos enmendados; los tratamientos *G. occultum*, *P. cepacia*+*B. cereus* y *P. cepacia*+*B. cereus*+*G. occultum*

mostraron tendencia a reducir incidencia y severidad de la enfermedad en el campo. El antagonista *B. cereus* mostró tendencia a reducir la severidad de la marchitez bacteriana en invernadero.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo financiero suministrado por el Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) para la ejecución de esta investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ANURATHA, C.S.; GNANAMANICKAM, S.S. 1990. Biological control of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* in India with antagonistic bacteria. *Plant and Soil* 124:109-116.
- BUDDENHAGEN, I.W. 1986. Bacterial Wilt revisited. In Persley, G.J. (ed). *Bacterial wilt disease in Asia and The South Pacific: proceedings of an international workshop held at PCARRD, Los Baños, Philippines, 8-10 October 1985*. ACIAR Proceedings No. 13, p. 126-143.
- CUBILLO, D., SANABRIA, G.; HILJE, L. 1998. Evaluación de recipientes y mallas para el manejo de *Bemisia tabaci* mediante semilleros cubiertos, en tomate. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* No. 51:29-35.
- ENFINGER, J.M., MCCARTER, S.M.; JAWORSKY, C.A. 1979. Evaluation of chemicals and application methods for control of bacterial wilt of tomato transplants. *Phytopathology* 69: 637-640.
- HARTMAN, G.L. 1991. Screening for bacterial wilt resistance in tomato: seedling response to *Pseudomonas solanacearum*. *Bacterial Wilt Newsletter* 7: 1-2.
- HARTMAN, G.L., HONG, W.F., HANUDIN; HAYWARD, A.C. 1993. Potential of biological and chemical control of bacterial wilt. In Hartman, G.L., and Hayward, A.C. (eds). *Bacterial wilt. Proceedings of an international conference held at Kaohsiung, Taiwan, 28-31 October 1992*. ACIAR Proceedings No. 45. p. 322-326.
- HAYWARD, A.C. 1991. *Biology and Epidemiology of bacterial wilt caused by Pseudomonas solanacearum*. *Annual Review of Phytopathology* 29: 65-87.
- HAYWARD, A.C. 1994. The hosts of *Pseudomonas solanacearum*. In A.C. Hayward, and G.L. Hartman (eds). *Bacterial wilt, the disease and its causative agent, Pseudomonas solanacearum*. CAB International, Wallingford, United Kingdom. p. 9-24.
- HERNÁNDEZ GARBOZA, L.R. 1997. Control biológico de la marchitez bacteriana en tomate con el uso de enmiendas orgánicas. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE 77 p.
- HO, W.C., CHERN, L.L.; KO, W.H. 1988. *Pseudomonas solanacearum*-suppressive soils in Taiwan. *Soil Biology & Biochemistry* 20:489-492.
- JAMES, W.C. 1983. Crop loss assessment. In Johnston, A., and Booth, C. *Plant pathologist's pocketbook. Second edition*. Wales, United Kingdom. Commonwealth Agricultural Bureaux. p. 131-143.
- JAWORSKI, C.A.; MORTON, D.J. 1964. An epiphytotic of *Pseudomonas solanacearum* in tomatoes on newly-cleared Klej sand in relation to potassium, calcium and magnesium levels. *Plant Disease Reporter* 48:88-89.
- KASS, D.C.L.; JIMÉNEZ, M.; KAFFMAN, J.H.; HERRERA-REYES, C. 1995. Reference soils of the Turrialba valley and slopes of the Irazú volcano. *Soil Brief Costa Rica* 2. CATIE, Costa Rica, ISRIC, The Netherlands. 26 p.
- KELMAN, A. 1950. Influence of nitrogen nutrition on the development of bacterial wilt in tomato and tobacco. *Phytopathology* 40:14.
- KEMPE, J.; SEQUEIRA, L. 1983. Biological control of bacterial wilt of potatoes: attempts to induce resistance by treating tubers with bacteria. *Plant Disease* 67: 499-503.
- LOCASCIO, S.J., STALL, R.E.; STALL, W.M. 1988. Bacterial wilt expression in tomato as influenced by cultivar and lime. *Proceedings of Florida State Horticultural Society* 101:356-358.
- MAO, W., LEWIS, J.A., LUMSDEN, R.D.; HEBBAR, K.P. 1998. Biocontrol of selected soilborne diseases of tomato and pepper plants. *Crop Protection* 17: 535-542.
- MICHEL, V.V., J.F. WANG, D.J. MIDMORE; G.L. HARTMAN. 1997. Effects of intercropping and soil amendment with urea and calcium oxide on the incidence of bacterial wilt of tomato and survival-borne *Pseudomonas solanacearum* in Taiwan. *Plant Pathology* 46: 600-610.
- MICHEL, V.V.; MEW, T.W. 1998. Effect of soil amendment on the survival of *Ralstonia solanacearum* in different soils. *Phytopathology* 88: 300-305.
- MISAGHI, I.J., OLSEN, M.W., BILLOTTE, J.M.; SONODA, R.M. 1992. The importance of rhizobacterial mobility in biocontrol of bacterial wilt of tomato. *Soil Biology & Biochemistry* 24:287-293.
- PRIOR, P., ALLEN, C.; ELPHINSTONE, J. (ed). 1998. *Bacterial wilt disease: molecular and ecological aspects*. Springer Verlag, Berlin, Germany.
- RYDER, M.H.; YAN, Z.; TERRACE, T.E.; ROVIRA, A.D.; TANG, W.; CORRELL, R.L. 1999. Use of strains of *Bacillus* isolated in China to suppress take-all and rhizoctonia root rot, and promote seedling growth of glasshouse-grown wheat in Australian soils. *Soil Biology and Biochemistry* 31: 19-29.
- SASAKI, S., ALVARADO, M.A.; KAM, A.L. 1994. *Manual del curso básico de agricultura orgánica*. Alajuela, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 30 p.
- SOOD, A.K., KALHA, C.S.; PARASHAR, A. 1998. Ecofriendly methods for the management of bacterial wilt of tomato caused by *Ralstonia solanacearum*. ACIAR. *Bacterial Wilt Newsletter*, Number 15.
- TRIGALET, A., TRIGALET-DEMERY, D.; FEUILLADE, R. 1998. Aggressiveness of French isolates of *Ralstonia solanacearum* and their potential use in biocontrol. *Bulletin OEPP/EPPO Bulletin* 28:101-107.
- WELLER, D. M. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26: 379-407.