

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ÁREA ACADÉMICA AGROFORESTAL

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN GESTIÓN DE RECURSOS NATURALES Y
TECNOLOGÍAS DE PRODUCCIÓN

**BIOPROSPECCIÓN DE HONGOS ENDÓFITOS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO
DEL NEMATODO BARRENADOR *Radopholus similis* (Cobb) Thorn EN EL
CULTIVO DEL BANANO**

Trabajo Final de Graduación sometido al Tribunal del Área Académica Agroforestal del
Instituto Tecnológico de Costa Rica para optar por el grado de Magister en Gestión de
Recursos Naturales y Tecnologías de Producción

Denis Morales García

Campus Cartago, Costa Rica

2014

Este Trabajo Final de Graduación fue aceptado por el Tribunal del Área Académica Agroforestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Magister en Gestión de Recursos Naturales y Tecnologías de Producción.

**Ing. Luis E. Pocasangre Enamorado, Ph.D.
Profesor Tutor**

**Ing. Olga Rivas Solano, M.Sc.
Profesor Lector**

**Ing. Rodolfo Canessa Mora, M.Sc.
Presidente del Tribunal**

**Ing. Denis Morales García
Sustentante**

2014

DEDICATORIA

A mi Dios, porque siempre ha estado a mi lado haciéndome sentir su maravilloso amor en todo momento.

A mi extraordinaria e incondicional esposa, Melina, por su amor, sacrificio, comprensión y enorme apoyo.

A mis hijos Mattías y Matteo, quienes le han dado el sentido más hermoso a mi vida.

A mis suegros, Melvin y María Teresa, quienes con su amor y guía, han sido base fundamental para el logro de mis metas.

A mis amados padres, Homer y Carmen, quienes con su amor y esfuerzo, me dieron la mejor herencia, mi educación.

AGRADECIMIENTO

Un profundo agradecimiento al Dr. Luis Pocasangre por las enseñanzas dadas a través de su guía y consejo.

Al Dr. Miguel Angel Dita, a la M.Sc. Olga Rivas y a la Dra. Marielos Álvarez por sus consejos, apoyo y aportes en la realización de esta investigación.

Al personal de los laboratorios de Nematología y Fitopatología de Del Monte por su valiosa ayuda y entrega, muy agradecido.

A Don Carlos Hernández, por ser un funcionario ejemplar, con gran don de servicio. Gracias por ser de tanto apoyo y utilidad durante este proceso.

CONTENIDO

DEDICATORIA	3
AGRADECIMIENTO	4
CONTENIDO	5
RESUMEN	7
LISTA DE CUADROS	8
LISTA DE FIGURAS	9
<i>I. Introducción general</i>	10
<i>II. Objetivos del estudio</i>	12
<i>III. Hipótesis del estudio</i>	12
<i>IV. Revisión de literatura</i>	13
1. El cultivo del banano	13
2. Los nematodos	13
3. Nematodos en el cultivo de banano (<i>Musa spp.</i>) y su importancia económica	14
4. Patogenicidad de <i>Radopholus similis</i> y su combate	15
4.1 Control químico	16
4.2 Control biológico e inducción de resistencia	17
5. Potencial antagonista de microorganismos endofíticos	19
6. Hongos endofíticos	20
6.1 <i>Trichoderma spp.</i>	21
6.2 <i>Fusarium spp.</i>	22
<i>V. Efecto de las inoculaciones de hongos endofíticos sobre el biocontrol de Radopholus similis y la promoción de crecimiento de plantas de banano del cultivar "Williams" (Musa AAA)</i>	24
1. Introducción	24
2. Materiales y Métodos	25
2.1 Ubicación geográfica de la investigación	25
2.2 Material Experimental	25
2.3 Aislamiento de hongos endofíticos	26
2.4 Ensayo de biocontrol de <i>Radopholus similis</i> en vitroplantas de banano (Musa AAA)	27
2.4.1 Protección y siembra de vitroplantas	27
2.4.2 Cultivo monoxénico y multiplicación de <i>Radopholus similis</i>	28
2.4.3 Inoculación de vitroplantas con <i>Radopholus similis</i>	29
2.4.4 Extracción de nematodos y conteo de poblaciones	30
2.5 Efecto de los agentes biológicos en la promoción de crecimiento de las plantas	30
2.6 Diseño experimental y análisis estadístico para bioensayos de biocontrol y promoción de crecimiento	31
3. Resultados	33
3.1 Prueba de biocontrol de <i>Radopholus similis</i> en vitroplantas de banano	33
3.2 Efecto de hongos endofíticos solos y combinados en la promoción de crecimiento de las plantas	35

4. Discusión	37
4.1 Prueba de biocontrol para <i>Radopholus similis</i> en vitroplantas de banano	37
4.2 Efecto de hongos endofíticos solos y combinados en la promoción de crecimiento de las plantas	39
5. Conclusiones	40
5.1 Bioensayo de penetración de <i>Radopholus similis</i> en vitroplantas de banano	40
5.2 Efecto de los agentes biológicos en la promoción del crecimiento de las plantas.	40
6. Recomendaciones	41
7. Referencias bibliográficas	42
VI. Anexos	53

RESUMEN

Dos aislamientos endofíticos de *Fusarium oxysporum* y dos de *Trichoderma atroviride* con conocida actividad antagonista contra *Radopholus similis* fueron evaluados en condiciones de invernadero para determinar su efecto, individual y combinado, sobre el biocontrol de *R. similis* y en la promoción del crecimiento de vitroplantas de banano del cultivar "Williams". Las poblaciones de *R. similis* en las raíces fueron significativamente menor en plantas protegidas con inoculaciones combinadas respecto a la inoculación individual de los hongos endofíticos y el testigo referencial. Las dos combinaciones de hongos estudiadas mostraron una actividad antagonista estadísticamente similar al testigo químico, con un porcentaje de biocontrol de 72%, demostrando el efecto aditivo y/o sinérgico de los mecanismos de acción de estos organismos. De igual forma, las plantas protegidas con inoculaciones combinadas de hongos mostraron una mejor condición de la planta en relación a peso total, peso radical y longitud radical respecto a inoculaciones individuales.

Palabras claves: hongos, endofíticos, *Fusarium*, *Trichoderma*, control biológico, *Radopholus similis*, promoción de crecimiento.

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Tratamientos evaluados en bioensayos de penetración y biocontrol de <i>Radopholus similis</i> , y en la promoción de crecimiento de vitroplantas de banano cv. "Williams" (AAA)	26
Cuadro 2. Variables de respuesta a evaluar para determinar la actividad biocontroladora de los endofíticos (bacterias y hongos) contra <i>Radopholus similis</i> y su efecto en la promoción del crecimiento de vitroplantas de banano cv. "Williams" (AAA)	32
Cuadro 3. Valores promedio por tratamiento para el peso del follaje y pseudotallo (g), raíz total (g) y <i>Radopholus similis</i> por 100 g raíz, de plantas in vitro de banano sembradas en macetas con suelo esterilizado e inoculadas con R. similis.	33
Cuadro 4. Contraste y probabilidad asociada para las variables peso de raíz total (g), follaje-pseudotallo (g), <i>Radopholus similis</i> y nematodos totales en plantas in vitro de banano sembradas en macetas en suelo esterilizado con <i>Radopholus similis</i> .	34
Cuadro 5. Efecto de inoculaciones individuales y combinadas de hongos endofíticos sobre el control de <i>Radopholus similis</i> en vitroplantas del cv. "Williams", diez semanas después de la inoculación de nematodos.	35
Cuadro 6. Efecto de inoculaciones individuales y combinadas de hongos endofíticos sobre la promoción del crecimiento de vitroplantas cv. "Williams", después de doce semanas en invernadero.	35
Cuadro 7. Efecto de inoculaciones individuales y combinadas de hongos endofíticos sobre la promoción del crecimiento y desarrollo del sistema radical de vitroplantas analizadas mediante el software WinRhizo.	37

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. <i>Trichoderma atroviride</i> aislado del tejido interno de raíces de banano (<i>Musa</i> AAA)	22
Figura 2. <i>Fusarium oxysporum</i> aislado del tejido interno de raíces de banano (<i>Musa</i> AAA)	23
Figura 3. Protocolo para el recuento de unidades formadoras de colonias y determinación del potencial de inóculo de los hongos endofíticos	26
Figura 4. Protocolo de inoculación de vitroplantas de banano con aislamientos endofíticos	27
Figura 5. Protocolo de preparación de discos de zanahoria para la reproducción de <i>Radopholus similis</i>	28
Figura 6. Protocolo de preparación de <i>Radopholus similis</i> para su inoculación en discos de zanahoria.	29
Figura 7. Protocolo utilizado en la prueba de biocontrol con <i>Radopholus similis</i> .	29
Figura 8. Protocolo de extracción de nematodos utilizado en la prueba de biocontrol de <i>Radopholus similis</i>	30

I. Introducción general

El banano es la fruta fresca de mayor comercialización en el mundo y uno de los principales cultivos dentro de los sistemas de producción agrícola en más de 120 países, siendo alimento importante en la dieta básica de 400 millones de personas; con una producción de 104 millones de toneladas al año, en aproximadamente 4.050.000 hectáreas, donde India y Ecuador son los mayores productores y exportadores, respectivamente (Frison y Sharrock 1998, Cárdenas 2001, FAO 2004, FAO 2013).

Este cultivo para fines de exportación, por lo general se caracteriza por tener la modalidad de monocultivo y estar en manos de grandes cultivadores con canales de comercialización bien establecidos (FAO 2004).

Las enfermedades y plagas son los factores más importantes y limitantes en la producción de banano en el mundo. Se puede afirmar que esta ha sido la motivación científica para la creación de los programas de mejoramiento genético, así como también, del auge de las empresas de agroquímicos.

Se ha determinado que los nematodos fitoparásitos son la plaga más importante y el nematodo barrenador *Radopholus similis* es el más destructivo en las zonas productoras de Centroamérica y el Caribe. Esta plaga ataca el sistema radical provocando la caída y volcamiento de las plantas y cuando este fenómeno ocurre en plantas que han alcanzado el periodo de floración-fructificación, provoca pérdidas económicas importantes que oscilan entre 30 a 50 % (Pinochet 1985) y se han reportado pérdidas superiores al 60% en las Filipinas y de un 70 a 80% en Sudáfrica. Tradicionalmente, el control químico ha sido la principal arma para el manejo de nemátodos en musáceas.

La creciente búsqueda de alternativas de manejo integrado de plagas y enfermedades que permitan incrementar la eficiencia en el uso de los recursos, disminuir la dependencia sobre productos químicos sintéticos y el impacto sobre el ambiente, ha llevado a realizar cada vez más investigaciones sobre el potencial de los microorganismos dentro de los sistemas productivos.

El desarrollo y uso de hongos endófitos antagonistas para el control alternativo de nematodos y enfermedades en el cultivo de banano se perfila como una alternativa

promisoria. Varias investigaciones han sido llevadas a cabo para la búsqueda de fuentes naturales de resistencia a patógenos (Matsumoto *et al.*, 1999, Cárdenas 2001, Zambrano *et al.*, 2007). Una de estas fuentes es la implementación de biocontrol con especies de *Trichoderma* desde 1930, a partir de estudios en tratamientos de semillas y aplicaciones en suelo (Weindling 1934, Harman 1951, Papavizas 1985, Moore *et al.* 1995, Pérez *et al.*, 2003). Encontrándose que *T. harzianum* induce altos niveles de enzimas líticas (1-3 β glucanasa y quitinasa) sobre las células de las paredes de los patógenos *R. solani*, *P. aphanidermatum* y *Fusarium oxysporum* (Sivan y Chet 1987, Tronsmo 1996). Resultados de la actividad inhibitoria de cepas de *Trichoderma* spp., en tratamientos previos a la inoculación con *Fusarium oxysporum* cv. *cubense* en cultivares susceptibles de banano, han sido reportados por varios autores (Mitov y Oliva 1975, Pérez- Vicente 2004).

Estudios realizados por Pocasangre (2000) demuestran el efecto antagonista de hongos endófitos (cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum*) contra *Radopholus similis* en plantas de banano del cultivar Gran Enano (AAA). Además, se encontró un efecto significativo en la promoción de crecimiento de las plantas, representado en un incremento del peso radical de plantas del cultivar Gran Enano (AAA), Williams (AAA) y FHIA-23 (AAAA). Por su parte, Rutherford y Kangire 1998, comprobaron que bacterias asociadas al sistema radical del banano se encontraban actuando como agentes de biocontrol sobre *Foc*, considerándolas como alternativas prometedoras al control de esta enfermedad.

A través de estudios previos de hongos provenientes de áreas silvestres de banano se han identificado alrededor de 50 hongos endófitos correspondientes a cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma* spp. Estos agentes biológicos de control han evidenciado el mayor potencial antagonista en diversos estudios tanto in vitro como in vivo. La utilización de hongos proveniente de áreas silvestres supresivas al desarrollo de patógenos podría ser una mejor estrategia para obtener un control más efectivo de las plagas y enfermedades y un mejoramiento biológico de las plantas.

La presente investigación consistió en la determinación del efecto de agentes de biocontrol sobre *Radopholus similis* y la promoción de crecimiento de las plantas.

II. Objetivos del estudio

Objetivo general

Prospectar el potencial de hongos endófitos procedentes de *Musa spp.* para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorn.

Objetivos específicos

- Determinar el potencial de biocontrol de hongos endófitos de dos cepas de *Trichoderma spp.*, dos cepas de *Fusarium spp.* y combinación de éstas, provenientes de *Musa spp.*, sobre *Radopholus similis* en plantas de banano en invernadero.
- Comprobar el efecto de hongos endófitos provenientes de *Musa spp.* sobre el crecimiento de vitroplantas de banano Cavendish en condiciones de invernadero.

III. Hipótesis del estudio

- Hongos endófitos procedentes de *Musa spp.* reducen la severidad del nemátodo *Radopholus similis* en banano Cavendish en condiciones de invernadero.
- Hongos endófitos procedentes de *Musa spp.* tienen capacidad de promover el crecimiento de plantas de banano en condiciones de invernadero.

IV. Revisión de literatura

1. El cultivo del banano

El cultivo de banano constituye una de las principales fuentes de ingreso en las economías de muchos países. Este cultivo, en términos de producción, es el cuarto cultivo más importante del mundo, después de arroz, trigo y maíz. Los bananos son cultivados en más de 125 países del mundo, en donde 13 millones de toneladas se destinan a la exportación anualmente, siendo una importante fuente de divisas en más de cien países productores en África, Asia, América Latina y el Caribe (FAO 2013, Gold y Dubois 2005).

Los cultivares de banano empleados en la industria se basan en variedades del subgrupo Cavendish (AAA) desde los años 1960, cuando fue introducido el cultivar Valery, seleccionado por su resistencia al Mal de Panamá.

Valery reemplazó al cultivar Gros Michel y fue luego reemplazado por el cultivar Gran Enano en la década de 1980, el cual es uno de los materiales más utilizados actualmente (Crane y Balerdi 1998, Marín *et al.* 2002).

2. Los nematodos

Los nematodos son animales filiformes con cuerpo sin segmentos y más o menos transparentes, cubiertos de una cutícula hialina, que está marcada por estrías u otras marcas, son redondeados en sección transversal, con boca, sin extremidades u otros apéndices, muchos son parecidos a lombrices con forma de anguila. Las hembras de algunas especies cuando llegan al estado adulto son abultadas con forma de pera o esfera (Agrios 2005, Perry y Moens 2006).

Asimismo, según el género de nematodo fitoparásito, tienen en la región anterior (cabeza) un órgano de alimentación llamado estilete hueco “lanza” (estomatoestilete u odontoestilete), que en algunas especies puede ser modificado (onquioestilete). El estilete es usado para perforar o penetrar las células de las raíces y el corno u otros

órganos como tallos, hojas y frutos, y a través de él extraen los nutrientes de la plantas hospedantes, causando enfermedades en diferentes cultivos que se manifiestan con un crecimiento deficiente y un menor rendimiento (Maggenti *et al.* 1987, Mai *et al.* 1996, Montiel *et al.* 1997, Agrios 2005, Luc *et al.* 2005, Perry y Moens 2006).

Son los organismos multicelulares más abundantes en el suelo y han sido ampliamente conocidos y estudiados por muchos años. Más del 90% de los nematodos identificados son benéficos, incluso su diversidad y abundancia son un indicador de la salud y calidad de un suelo. Sin embargo, el 10% corresponde a especies fitoparásitas que representan un importante factor de reducción de rendimiento en la producción de muchos cultivos de importancia económica y para seguridad alimentaria alrededor del mundo. Muchas de las especies de fitonematodos son parásitos de las plantas, ya sea en las raíces, en los tallos, hojas, semillas, bulbos, o en rizomas y se alimentan de las células de las plantas al extraer su contenido por medio de un estilete (Taylor 1971, Yépez 1972). De acuerdo al modo de acción de las diferentes especies, los síntomas varían desde el más severo, que es el volcamiento de la planta, hasta los menos obvios como la prolongación de los ciclos de producción (Gowen y Quénehervé 1990).

3. Nematodos en el cultivo de banano (*Musa spp.*) y su importancia económica

En el cultivo de banano, después de las lesiones foliares ocasionadas por la Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*), los nematodos son los principales determinantes en afectar su crecimiento y desarrollo en el mundo debido al daño ocasionado en raíces y cormos (Robinson *et al.* 1998, Araya 2003).

En plantaciones con varios años de establecidas, es común encontrar comunidades poliespecíficas, compuestas por endoparásitos migratorios como *Radopholus similis* (Cobb) Thorne y *Pratylenchus coffeae* Sher & Allen, los ecto-endoparásitos *Helicotylenchus multicinctus* Cobb y *H. dihysteria* Cobb, los endoparásitos sedentarios *Meloidogyne incognita* (Kofoid y White) Chitwood y *Meloidogyne javanica* (Treub) Chitwood y el semi-endoparásito *Rotylenchulus reniformis* Lindford y Oliveira (Araya 2003 y 2004, Gowen *et al.* 2005, Martínez *et al.* 2006). En adición a estas cinco especies,

hay muchas otras que han sido registradas en *Musa spp.* a través del mundo (Gowe *et al.*, 2005). Sin embargo, la frecuencia y abundancia de cada una de estas especies puede cambiar según sea la variedad de banano y las condiciones agroecológicas (Araya, 2003).

De acuerdo con las frecuencias y densidades poblacionales, durante el año y en las zonas productoras de banano de cada país, *R. similis* es el más abundante y la principal especie fitoparásita, constituyendo entre el 82 y 97% de la población de nematodos en raíces y cormos (Araya, 2003) y cuando este fitonemato no es controlado, se disminuye el peso de los racimos y, por efecto del volcamiento, se reduce el rendimiento entre 60 y 52% en la primera y segunda cosecha, respectivamente (Fogain 2000), pero la reducción en el rendimiento puede llegar hasta un 80% (Moens *et al.* 2004).

4. Patogenicidad de *Radopholus similis* y su combate

R. similis fue observado por primera vez por Nathan August Cobb en 1891 en Nueva Gales del Sur, en raíces necróticas de *Musa sapientum*, provenientes de las islas Fiji y desde entonces se ha encontrado disperso en las regiones tropicales y subtropicales donde se cultiva banano y plátano, con algunas excepciones como las Islas Canarias, Israel, Taiwán y el Este de África (Gowen y Quénehervé 1990).

Su distribución en plantaciones de banano, especialmente del subgrupo Cavendish, se cree que ha sido el resultado de la multiplicación de estos clones una vez que se inició con el cambio del cultivar Gros Michel, susceptible a *Fusarium*, en muchas partes del Oeste de África, el Caribe, América Central y América del Sur (Gowen 1993).

R. similis es un parásito obligado de tejidos de plantas, es decir necesita de un hospedante vivo para sobrevivir (Siddiqi 2000, Brooks 2008). Es considerado un endoparásito migratorio, ya que logra completar su ciclo de vida dentro del tejido radicular y los cormos (Blake, 1961, Loos 1962, Sarah *et al.* 1999, Sarah 2000) en un periodo de 20 a 25 días a una temperatura entre 24 y 32°C, siendo óptima su reproducción entre 25 y 28°C.

El nematodo perfora la pared celular e ingresa principalmente cerca de la cofia de las raíces moviéndose a lo largo de ellas y desplazándose hasta el cormo donde hacen cavidades o lesiones que en presencia de altas infestaciones en la raíz, coalescen, anillándola completamente. Las poblaciones de nematodos en las raíces pueden crecer rápidamente y decaer cuando la disponibilidad de alimento es limitante (Yépez 1972, Gowen 1979, Gowen y Quénéhervé 1990).

Los fitonematodos provocan necrosis y muerte de las raíces y de los tejidos del cormo reduciendo la absorción de agua y nutrientes. Esto genera una afectación del tamaño y vigor de las plantas con una disminución del área foliar y peso del racimo. Adicionalmente se produce un incremento de los periodos entre floraciones y cosechas (Sarah *et al.* 1996, Araya 2003, Gowen *et al.* 2005). Finalmente, las plantas pierden anclaje por el deterioro del sistema radical, por lo cual tienden a desraizarse o volcarse. Esto puede ocurrir en plantas jóvenes y adultas, principalmente entre la época de floración y cosecha debido al peso del racimo, particularmente durante vientos y lluvias fuertes, lo que causa pérdidas económicas altas (Sarah 2000, Araya 2003, Brooks 2008).

Chaves (2007), hace referencia que el daño causado por el nematodo en el sistema radical puede favorecer la infección de la planta con hongos y bacterias fitopatógenos. En este sentido, Pinochet (1996) menciona que por ejemplo, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Cylindrocarpon musae* y *Acremonium stromaticum* pueden ser aislados de lesiones causadas por diferentes nematodos endoparásitos migratorios, especialmente *R. similis*, dado que son parte de la flora radical e invasores de las heridas de la raíz, por lo que no presentan daños en ausencia de nematodos, solo se convierten en patogénicos cuando hay heridas en la raíz.

4.1 Control químico

Actualmente, el control químico es la manera más común de controlar las poblaciones de nematodos. Estos productos químicos empleados en el control de nematodos resultan altamente tóxicos, por lo que requieren una adecuada capacitación para disminuir el

riesgo de afectación al ambiente y a las personas (Pinochet 1986, Gowen y Quénéhervé 1990, Tabora *et al.* 2002, Araya 2004, Athman *et al.* 2006).

Los nematicidas se recomienda utilizarlos, en el cultivo de banano, en tres ciclos al año, empleando una dosis de 2,5 a 3 gramos de ingrediente activo por planta, de acuerdo a lo indicado en la ficha técnica del producto. Los nematicidas, utilizados hasta ahora, han sido generalmente organofosforados (Fenamifos, Terbufos, Cadusafos) o carbamatos (Oxamil, Carbofuran), los cuales son aplicados como gránulos sobre la superficie del suelo alrededor de la planta o en el caso del Vydate 24 SL (Oxamil) inyectado en el pseudotallo de la planta. Estos productos inhiben la acetilcolinesterasa presente en la neuroanatomía de los nematodos.

Las moléculas nematicidas en el mercado son rotadas en tres ciclos al año logrando que el mismo ingrediente activo no sea aplicado dos veces en un periodo de doce meses (Marín 2003). El mayor efecto de estos productos es en la reproducción y no en la mortalidad de los nematodos, con una efectividad que fluctúa entre un 50 y 90%, grandemente afectada por las propiedades físico-químicas del suelo y las condiciones climáticas de la zona (Araya 2004), debido a esto se ha ido optando por la utilización de nematicidas de formulación líquida (Vydate 24 SL, Nema-cur 48 EC) con una mejor absorción a través de las raíces y menos afectados por los periodos secos prolongados al momento de la aplicación.

Araya (2004), señala que algunas de las principales preocupaciones con la utilización de estos productos es el efecto sobre la microfauna del suelo, ya que altera las cadenas tróficas, eliminando los microorganismos antagonistas de los nematodos fitoparásitos. Además, el uso no adecuado de una determinada molécula generalmente resulta en pérdida de efectividad, debido a su biodegradación a metabolitos no tóxicos por la acción de hongos y bacterias del suelo (Moens *et al.* 2004).

4.2 Control biológico e inducción de resistencia

En muchas ocasiones se ha demostrado que los suelos con alto contenido de materia orgánico se caracterizan por ser supresivos al desarrollo y actividad de diversos

patógenos y nematodos (Baker y Dunn, 1990). Esta supresividad se fundamenta en la existencia de un amplio espectro de microorganismos que forman parte de un sistema complejo de interacciones que conforman la rizósfera donde la competencia por las fuentes alimenticias, nichos y dinámicas entre predador-presa ayudan a limitar la población de microorganismos con potencial de plaga (Altieri 1999, Baker y Paulitz 1996).

El manejo y uso de las comunidades microbianas se plantean como alternativas en los programas de manejo de plagas basados en estrategias de competencia, antibiosis, hiperparasitismo, protección cruzada e inducción de resistencia (Baker 1982).

Por otro lado, se ha demostrado que en las raíces de las plantas se establecen relaciones simbióticas con comunidades de microorganismos específicos, los cuales son atraídos mediante exudados que son producidos por la planta y que son emitidos mediante la endoriza (Sikora 2003). Es por esto que microorganismos específicos logran colonizar las raíces, y desencadenan reacciones de defensa en las plantas hospedantes. Este tipo de mecanismo de defensa activada o resistencia sistémica inducida (ISR), es descrita como una respuesta de la planta ante la presencia y actividad de un agente biológico no patogénico, específico, que reduce la severidad o la incidencia de la enfermedad o daño causado por un patógeno que se encuentra espacialmente separado del agente inductor (Kloepper *et al.* 2004, Kloepper y Ryu 2006). La resistencia sistémica también puede ser inducida por sustancias químicas o por la presencia de patógenos, denominándose entonces resistencia sistémica adquirida (SAR). De acuerdo con Pieterse *et al.* (1998), las diferencias entre ISR y SAR son el agente inductor y los signos que presenta la planta. ISR es un fenómeno independiente del ácido salicílico, el etileno y el ácido jasmónico, y no produce la acumulación de proteínas relacionadas con la patogenicidad (PR). Las proteínas PR son acumuladas en la SAR, inducida por patógenos y/o químicos. Además, SAR es dependiente del ácido salicílico (van Loon *et al.* 1998, Zhang *et al.* 2002).

En cultivos como tomate (Yan *et al.* 2002), pepino (Wei *et al.* 1991) y tabaco (Zhang *et al.* 2002b), se ha demostrado ISR contra diversas plagas y enfermedades a partir de la colonización de las raíces de las plantas por rizobacterias (PGPR) y microorganismos endofíticos (Kloepper *et al.* 2004, Kloepper y Ryu 2006). En el 2006, Vu *et al.*

demonstraron la inducción de resistencia contra *Radopholus similis* en plantas de banano con la inoculación de aislamientos endofíticos de cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum* en pruebas de split-root system, con reducciones en la penetración de *R. similis* de hasta 45% en la parte no tratada de la planta.

5. Potencial antagonista de microorganismos endofíticos

El término endófito se conoce desde el siglo XIX y se usó inicialmente para agrupar a aquellos organismos fúngico que viven dentro de las plantas (Gamboa-Gaitán 2006), pero diferentes autores han propuesto definiciones más complejas, coincidiendo en que la naturaleza endofítica permite colonizar tejidos internos de plantas sin producir signos visibles de enfermedad (Petrini 1991, Hallmann *et al.* 1997, Schulz y Boyle 2006).

Los hongos endofíticos establecen relaciones simbióticas complejas con las plantas desde su interior, lo cual le confiere la capacidad de defenderse ante factores bióticos y abióticos adversos (Carrol 1990, Schulz y Boyle 2006), de ahí que existen muchos estudios dirigidos a indagar su habilidad como agentes controladores de patógenos.

Chaves (2007) señala que para considerar un microorganismo endofítico como potencial agente de biocontrol se requieren ciertas características. En primer lugar, que no sea patógeno de plantas, hombres o animales. Debe tener una elevada capacidad de colonización y reproducción en los tejidos internos después de su inoculación en las plantas, ya que una población que declina rápidamente tiene una baja capacidad competitiva con la microflora presente en la planta. Además, que tenga capacidad de reducir o suprimir eficientemente la población de nematodos por debajo del nivel crítico. Por su parte, Cook (1993), Hernández y Escalona (2003), mencionan que estos además deben tener la capacidad de reproducirse abundantemente en condiciones *in vitro* para asegurar su reproducción y conservación a nivel comercial.

6. Hongos endofíticos

Son organismos que viven dentro de los tejidos de las plantas, sin causar síntomas o daños aparentes (Carroll y Petrini 1983, Carroll 1988, Bandara *et al.* 2006, Shi *et al.* 2009) y cumplen todo o al menos una parte significativa de su ciclo de vida de una forma no sintomática dentro de tejidos o células de plantas.

Hata *et al.* (2002) indica que los hongos endofíticos colonizan la mayoría de plantas sanas; considerados como simbioses y mutualistas omnipresentes. Caballero (2011), citando a Bandara *et al.* (2006) y Shi *et al.* (2009), indica que estos se pueden encontrar en varios tejidos, semillas, raíces, tallos y hojas. Pueden ser extraídos del interior de las plantas o aislados de la superficie estéril de los tejidos de las plantas.

Sikora (1992) y Pocasangre (2003), señalan que la mayoría de los hongos endofíticos pertenecen al grupo de los ascomicetos. Estos pueden generar beneficios para la planta hospedera, incluyendo la actividad antagonista y la inducción de resistencia contra patógenos a través de la producción de antibióticos o metabolitos secundarios, así como la promoción de crecimiento mediante la secreción de fitohormonas y la movilización de nutrientes de la rizosfera hacia la planta (Harman *et al.* 2004, Compant *et al.* 2005, Schulz 2006).

La presencia de microorganismos como rizobacterias, hongos depredadores de nematodos, endomicorrizas y hongos endofíticos, hace más efectiva la capacidad amortiguadora de un suelo en la naturaleza, para suprimir la mayoría de los patógenos de suelo y problemas de nematodos (Sikora 1992). Según Zum Felde (2002) en Guatemala suelos de fincas comerciales suprimen a los nematodos y esta supresión fue transmitida de una plantación a otra, mediante el trasplante de cormo. Lo que puede indicar que la acción antagonista de estos hongos es desarrollada por una interacción endofítico-nematodo, dentro de los tejidos de la planta.

Por su parte, Chaves (2007) señala que se ha determinado que *Trichoderma* y *Fusarium* son los géneros más abundantes de hongos endofíticos presentes en tejidos internos de raíces de banano y que muestran un alto potencial como antagonistas de los nematodos, encontrando reducciones de hasta un 90% en la población final de *R. similis* en el sistema

radical de plantas de banano protegidas con hongos endofíticos de los géneros *Fusarium* y *Trichoderma*.

Pocasangre (2000 y 2004) y Chaves (2007) reportan un incremento en el peso y longitud de la raíz, y en el peso foliar de dichas plantas, en comparación con plantas no protegidas.

6.1 *Trichoderma* spp.

Trichoderma spp. es un hongo anaeróbico facultativo, perteneciente a los Deuteromycetes, caracterizados por no presentar un estado sexual determinado. Se les encuentra tanto en suelos tropicales como subtropicales.

Son hongos considerados como invasores secundarios oportunistas con rápido crecimiento del micelio, productores de esporas fuertes, generadores de enzimas degradadoras de pared celular y productor de antibiosis (Vinale *et al.*, 2008).

Trichoderma spp. produce tres tipos de propágulos: hifas, clamidosporas y conidios, estas son activas contra fitopatógenos en diferentes fases del ciclo de vida, desde la germinación de esporas hasta la esporulación. El mecanismo de biocontrol utilizado por *Trichoderma* con fitopatógenos son el micoparasitismo, antibiosis y competencia directa por espacio y nutrientes (Papavizas 1985, Howell 2003, Harman *et al.* 2004, Lu *et al.* 2004, Chet *et al.* 2006, Vinale *et al.* 2008).

Cuando es utilizado en el control de nematodos, éste tiene una gran capacidad de envolver al nematodo en micelio, y produce metabolitos que actúan como nematocidas, tales como Trichodermin, Suzukacilina, Alameticina, Dermadina, entre otros. Además, frecuentemente, las raíces colonizadas por *Trichoderma* spp. presentan mejor crecimiento y peso radical que las plantas no tratadas, incrementando la productividad del cultivo y su resistencia a factores bióticos y abióticos adversos (Rey *et al.* 2000, Howell 2003, Pocasangre *et al.* 2004).



Figura 1. *Trichoderma atroviride* aislado del tejido interno de raíces de banano (*Musa AAA*)

6.2 *Fusarium spp.*

Fusarium es un hongo cuyas cepas no patogénicas viven como saprófitos, no obstante son capaces de colonizar las raíces de las plantas sin provocar síntomas de daño, de hecho pueden penetrar en el interior de las raíces y generar reacciones de defensa en la planta (Bacon y Yates 2006, Vu *et al.* 2006).

Su crecimiento se caracteriza por la producción de tres tipos de esporas: micronidias, macronidias y clamidosporas, estas últimas tienen paredes muy gruesas, lo cual las hace muy resistentes a condiciones ambientales desfavorables (Olivain *et al.* 2003).

Se ha demostrado que las cepas no patogénicas de *F. oxysporum* tienen tres modos de acción; competencia por nutrientes en la rizósfera, competencia por la infección de sitios en la rizósfera y la inducción de resistencia (Friting y Regrind 1993, Hammerschmidt y Kuc 1995). Estas cepas no patogénicas han sido ampliamente documentadas como antagonistas de los nematodos fitoparásitos, lo cual llevan a cabo a través de metabolitos producidos por esta especie que provocan la muerte de los nematodos en diversos cultivos (Crump 1987, Quadri y Saleh 1990). En plantas de banano por ejemplo, Chaves (2007), encontró cepas no patogénicas de *F. oxysporum* como endofíticos naturales y han sido detectados en el sistema radical de diferentes cultivares en varios países,

algunas de ellas ya han demostrado su habilidad de afectar positivamente la salud y productividad de las plantas.

Asimismo, se ha demostrado la actividad antagonista de los aislamientos endofíticos contra poblaciones de *R. similis* provocando parálisis y muerte del nematodo tanto en pruebas in vitro como in vivo (Hallmann y Sikora 1996, Harman *et al.* 2004, Pocasangre *et al.* 2004, Athman *et al.* 2006).

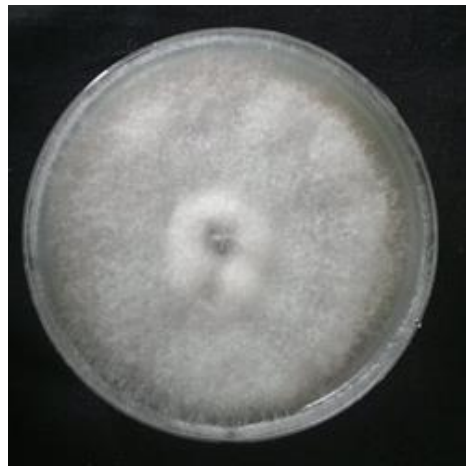


Figura 2. *Fusarium oxysporum* aislado del tejido interno de raíces de banano (*Musa AAA*)

V. Efecto de las inoculaciones de hongos endofíticos sobre el biocontrol de *Radopholus similis* y la promoción de crecimiento de plantas de banano del cultivar “Williams” (*Musa AAA*)

1. Introducción

El nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorne es la especie de nematodo más importante para la producción de bananos y plátanos en las zonas tropicales y subtropicales, causando pérdidas significativas en la producción de estos cultivos.

El nematodo es capaz de provocar el volcamiento de las plantas al debilitar su sistema radical, pues penetra dentro de las raíces, se alimenta de su tejido celular y afecta la absorción de nutrientes y el anclaje de la planta (Pinochet 1986, Gowen y Quénéhervé 1990).

Tradicionalmente el manejo de los fitonematodos en el cultivo de banano se ha basado en la aplicación de dos o tres ciclos de nematocidas químicos con costos que superan los USD 300 por hectárea al año (Pocasangre *et al.* 2004, Martínez *et al.* 2007), representado la segunda plaga de mayor importancia para la producción de este cultivo. Adicionalmente, son productos clasificados como de alto riesgo para la salud humana y el ambiente, lo que obliga a las empresas a desarrollar procedimientos para lograr un manejo muy seguro de estos productos. De ahí que dentro del sector bananero se ha considerado que el desarrollo de nuevas herramientas de la biotecnología y uso de microorganismos abre oportunidades para generar nuevas estrategias que permitan un manejo más integrado de las poblaciones de nematodos con menor riesgo para los trabajadores y el ambiente (Sikora 1992, Araya *et al.* 1995).

Dentro de estos, el uso de hongos endofíticos ha demostrado efectos favorables al disminuir el nivel daño que ocasionan patógenos sobre la planta. La aplicación de hongos extraídos de raíces de banano ha reducido el deterioro del sistema radical del banano provocado por *Radopholus similis*, no obstante muchas de las cepas de estos hongos endofíticos recuperados en estudios previos y la combinación doble de estos

aislamientos aún no han sido evaluados. Consecuentemente, el objetivo de la presente investigación tuvo por objetivo evaluar el efecto de la aplicación individual y combinada de hongos endofíticos en el biocontrol de *R. similis* mediante la evaluación de la disminución en la población y la tasa de reproducción del nematodo en el sistema radical. Adicionalmente, se evaluó el efecto de las combinaciones de los agentes biológicos sobre el crecimiento de vitroplantas de banano en ausencia de *R. similis* en condiciones de invernadero.

2. Materiales y Métodos

2.1 Ubicación geográfica de la investigación

El trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Nematología de Bandeco-Del Monte, ubicado en el cantón de Siquirres, provincia de Limón, Costa Rica. Localizado a una latitud de 10°12'36" norte, longitud 83°28'47" oeste y una altitud de 32 msnm. Durante el periodo de estudio de noviembre a mayo del 2014 se registró una temperatura máxima promedio de 26,91 °C y mínima promedio de 24,10 °C, con un promedio de 84,73% de humedad relativa, una precipitación promedio de 300,7 mm Datos obtenidos de la estación meteorológica de Bandeco en El Carmen 2 de Siquirres.

2.2 Material Experimental

El estudio consistió en la realización de dos experimentos utilizando plantas de banano del cultivar Williams (*Musa AAA*) con seis semanas de endurecimiento colectivo en invernadero, provenientes de un laboratorio comercial de cultivo de tejidos.

Dentro de estas pruebas se evaluaron dos cepas de los agentes biológicos *Fusarium oxysporum*, dos de *Trichoderma atroviride* y el efecto combinado estas cepas recolectadas en suelos supresivos de Costa Rica en Turrialba y Sixaola (Menjivar 2005). Se realizaron inoculaciones individuales de estos organismos y se incluyó un testigo absoluto, un testigo referencial y un testigo químico (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tratamientos evaluados en bioensayos de biocontrol de *Radopholus similis* y en la promoción del crecimiento de vitroplantas de banano cv. Williams (AAA).

Tratamiento	Código	Género
1	EC11	<i>Trichoderma atroviride</i>
2	EC23	<i>Fusarium oxysporum</i>
4	EC26	<i>Trichoderma atroviride</i>
5	EC34	<i>Fusarium oxysporum</i>
6	EC11 + EC26	<i>Trichoderma atroviride</i> + <i>Fusarium oxysporum</i>
7	EC23 + EC34	<i>Trichoderma atroviride</i> + <i>Fusarium oxysporum</i>
8 (Testigo)	TA	Testigo absoluto (sin endofíticos sin <i>R. similis</i>)
9 (Testigo)	TQ	Testigo químico (con <i>R. similis</i> y Vydate 24 SL)
10 (Testigo)	TR	Testigo referencial (con <i>R. similis</i>)

2.3 Aislamiento de hongos endofíticos

Se utilizaron dos aislamientos endofíticos de *Trichoderma atroviridae* y dos cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum* recolectadas de suelos supresivos de Sixaola y Talamanca (Cuadro 1). Estos aislamientos fueron seleccionados como agentes de biocontrol de fitonematodos en pruebas *in vitro* realizadas en Bandeco (Menjivar 2005).

Los aislados fueron conservados en incubadora a 24 °C. Para la producción de inóculo de los hongos endofíticos se cultivaron en PDA al 100% durante dos semanas, posteriormente, bajo condiciones asépticas, se removieron las esporas agregando 25 ml de agua estéril, para luego hacer un rayado con una espátula de 3 cm de ancho y decantada en un beaker de 250 ml para obtener la suspensión de esporas. De la suspensión de cada hongo se realizaron conteos por medio de un hemacitómetro de Neubauer para medir la concentración de esporas, luego esta suspensión fue ajustada a 1.0×10^6 ufc/ml.

2.4 Ensayo de biocontrol de *Radopholus similis* en vitroplantas de banano (Musa AAA)

2.4.1 Protección y siembra de vitroplantas

Vitroplantas de banano del cultivar Williams (AAA) de 6 semanas de aclimatización en invernadero fueron inoculadas con suspensiones conidiales de los hongos endofíticos *Trichoderma atroviride* y *Fusarium oxysporum*. El sistema radical de las vitroplantas se sumergió en una suspensión de conidias de hongos endofíticos a una concentración de 1×10^6 ufc/ml durante 5 minutos. Posteriormente, las vitroplantas fueron trasplantadas a bolsas plásticas de 3600 cm³ de capacidad que contenían una mezcla de suelo y arena en una relación 1:1. El sustrato se esterilizó mediante un horno eléctrico a 300 °C durante ocho horas. Se establecieron diez repeticiones por cada tratamiento, colocando estas plantas al azar sobre tarimas en el invernadero donde permanecieron 12 semanas a una temperatura de $25,4 \pm 2$ °C.



Figura 4. Protocolo de inoculación y siembra de vitroplantas de banano con aislamientos endofíticos.

El resultado de las inoculaciones de los agentes biológicos en el biocontrol de *Radopholus similis* fue comparado con un testigo absoluto, un testigo referencial y un testigo químico (Cuadro 1).

2.4.2 Cultivo monoxénico y multiplicación de *Radopholus similis*

La reproducción de los nematodos en cultivo monoxénico se realizó sobre discos de zanahoria, según la metodología descrita por Araya (2001 y 2002) y llevada a cabo en el Laboratorio de Nematología de Del Monte. Se tomaron zanahorias frescas previamente desinfectadas con detergente líquido, a las cuales se les asperjó alcohol al 95% y flameada superficialmente. Posteriormente, se eliminó la cáscara de la zanahoria y se cortaron discos de 2 a 4 cm de diámetro con 0,5 cm de espesor, esterilizados superficialmente. Cada disco fue transferido con pinzas estériles a platos Petri de 6 cm de diámetro y sellados con papel Parafilm® (Figura 5).



Figura 5. Protocolo de preparación de discos de zanahoria para la reproducción de *Radopholus similis*

Utilizando cultivos en discos de zanahoria esterilizados preparados en Corbana, se procedió al lavado de los platos que contenían los nematodos para obtener una suspensión de nematodos que fue recolectada en un tubo de ensayo estéril. Para la esterilización superficial de los nematodos se preparó una solución de 6000 ppm de sulfato de estreptomicina, la cual fue agregada al tubo de ensayo que contenía los nematodos y se dejó reposar durante tres horas. Posteriormente, se procedió a retirar el sobrenadante y hacer dos lavados con agua destilada estéril.

Una vez desinfectados los nematodos, se procedió a la inoculación de los discos de zanahoria en platos Petri, aplicando tres gotas de la suspensión de aproximadamente 100 nematodos en 10 ul de agua en tres diferentes puntos de cada disco, utilizando una micropipeta calibrada. Los platos Petri fueron identificados y sellados con papel

Parafilm® y almacenados en incubadoras bajo condiciones de oscuridad a una temperatura de 27 °C.



Figura 6. Protocolo de preparación de *Radopholus similis* para su inoculación en discos de zanahoria.

2.4.3 Inoculación de vitroplantas con *Radopholus similis*

Dos semanas después de la inoculación con los hongos endofíticos, las plántulas fueron inoculadas con 500 nematodos por pote. La inoculación se realizó colocando alrededor de las raíces de cada planta insertando una pipeta Ependorf con la suspensión calibrada de *Radopholus similis* en tres hoyos en la base del pseudotallo.

El resultado de la aplicación de los agentes biológicos individualmente y combinados sobre la disminución de las poblaciones de *R. similis* en el sistema radical de la planta fue comparado con un control absoluto, un control referencial y un testigo químico que consistió en la aplicación de Vydate 24 SL (Oxamil) a una concentración de 100 ppm en la mezcla de suelo (Cuadro 1).



Figura 7. Procedimiento empleado en la prueba de biocontrol de *Radopholus similis*

2.4.4 Extracción de nematodos y conteo de poblaciones

La cantidad de nematodos presentes en el sistema radical de las plantas fue obtenida por el método de licuado y tamizado utilizado en el Laboratorio de Nematología de Bandeco, descrito por Araya (2002) (Figura 8).



Figura 8. Procedimiento empleado para la extracción de los nematodos en el ensayo de biocontrol de *Radopholus similis*.

Los nematodos presentes en el sistema radical de las plantas tratadas fue comparado con las poblaciones de *R. similis* obtenidas en el testigo referencial para determinar el efecto de los agentes biológicos sobre el control de las poblaciones de *R. similis*.

2.5 Efecto de los agentes biológicos en la promoción de crecimiento de las plantas

Este ensayo se estableció utilizando la misma metodología empleada en el ensayo para determinar el efecto sobre el control de *R. similis* pero sin llevar a cabo la inoculación con nematodos.

Se utilizaron plantas del cv. Williams de seis semanas de endurecimiento en invernadero y provenientes de un laboratorio comercial de cultivo de tejidos. Una vez que las plantas fueron sembradas en potes se colocaron al azar sobre tarimas de madera y permanecieron bajo esas condiciones durante doce semanas.

Las variables de crecimiento se midieron cada dos semanas hasta el término del bioensayo, evaluando número de hojas por planta, altura de planta y diámetro del

pseudotallo. Finalmente, las plantas fueron retiradas de los potes y se pesaron por separado raíz, cormo, pseudotallo y hojas.

Posteriormente, utilizando un escaneo con el Hewlett Packard Scan Jet 6100 C/T y el programa WinRhizo (Versión 5.1: Regent Instruments, Canadá) se analizó la morfología del sistema radical. Se determinó longitud (cm) y diámetro promedio (mm) de las raíces de cada planta.

El efecto de los agentes biológicos fue comparado con un testigo absoluto y un testigo químico, ya que no existió tratamiento con inoculación de nematodos.

2.6 Diseño experimental y análisis estadístico para bioensayos de biocontrol y promoción de crecimiento

El diseño experimental utilizado para los dos ensayos fue en bloque aleatorio completo. Todos los datos individualmente para cada variable fueron analizados mediante el análisis de la varianza para las variables que se midieron en cada uno de los bioensayos (Cuadro 2). Los conteos de los nematodos fueron transformados antes de realizar el análisis estadístico utilizando $\ln(x+1)$. Los promedios de cada variable estudiada fueron comparados mediante una prueba de rangos múltiples de Duncan ($P \leq 0.05$).

Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico InfoStat usando una interfase de la plataforma R (Di Rienzo *et al.*, 2009)

El modelo estadístico para este arreglo de tratamientos se define matemáticamente de la siguiente manera:

$$Y_{ij} = u + T_i + e_{ij} \text{ Donde;}$$

Y_{ij} = Variable a medir

u = Media general

T_i = Efecto del i -ésimo tratamiento

E_{ij} = Error experimental

Cuadro 2. Variables respuesta medidas para el bioensayo de actividad biocontroladora de hongos endofíticos contra *Radopholus similis* y el bioensayo sobre promoción de crecimiento de vitroplantas de banano cv. Williams.

Actividad antagonista de hongos endofíticos contra <i>Radopholus similis</i>	Promoción de crecimiento y morfología de las raíces
Nematodos totales	Peso fresco del sistema foliar (g)
Nematodos por gramo de raíz	Peso fresco de raíces (g)
% de biocontrol de nematodos	Diámetro de raíces (mm)
Tasa de incremento de nematodos	Longitud radical (cm)
Densidad, número de nematodos por gramo de raíz	Volumen de raíz (cm ³)

3. Resultados

3.1 Prueba de biocontrol de *Radopholus similis* en vitroplantas de banano

Las medidas del peso de follaje, raíces, número de *R. similis* y nematodos totales por 100 g de raíces en suelo se presentan en el cuadro 3. El peso promedio de las raíces ($P<0.0001$) y follaje ($P<0.0001$) de los agentes de control biológico aplicados fue mayor al testigo inoculado con nematodos y sin aplicación. Los endofíticos redujeron ($P=0.0016$) el número de *R. similis* de 39% a 75% en comparación al testigo referencial (inoculado con nematodos y sin aplicación).

Cuadro 3. Valores promedio por tratamiento para el peso del follaje y pseudotallo (g), raíz total (g) y *Radopholus similis* por 100 g raíz, de plantas *in vitro* de banano sembradas en macetas con suelo esterilizado e inoculadas con *R. similis*.

Tratamiento	Follaje y pseudotallo (g)	Raíz total (g)	R. similis/100 g raíz	Nematodos totales /100 g raíz
EC11	228.8	96.2	7,500	7,850
EC23	171.6	86.2	9,100	9,400
EC26	236.7	94.1	5,700	6,150
EC34	232.7	95.2	6,900	7,100
EC11 + EC23	249.5	111.6	3,700	3,800
EC26 + EC34	246.7	109.5	3,750	3,850
Testigo absoluto	215.4	95.3	100	750
Testigo químico	200.2	90.7	3,500	3,600
Testigo referencial	143.8	68.1	13,150	13,450

La combinación de los dos hongos (*Trichoderma* y *Fusarium*) aumentó el peso de las raíces ($P<0.0001$) y follaje ($P<0.0001$) y redujo el número de *R. similis* ($P<0.0002$) en relación al testigo inoculado y sin aplicación y con una actividad antagonista estadísticamente similar al testigo químico (77%), correspondiendo a porcentajes de biocontrol de 75%. Tanto las cepas de *Trichoderma atroviridae* como de *Fusarium oxysporum* redujeron el número de *R. similis*, aumentando el peso de raíces y follaje y reduciendo el número de *R. similis* aunque en menor medida que el efecto combinado de estos hongos. Solo la cepa EC23 de *F. oxysporum* no ofreció un efecto similar en la reducción de la población final de *R. similis* al logrado con las otra cepas (EC11, EC26, EC34).

Cuadro 4. Contraste y probabilidad asociada para las variables peso de raíz total (g), follaje-pseudotallo (g), *Radopholus similis* y nematodos totales en plantas *in vitro* de banano sembradas en macetas en suelo esterilizado con *Radopholus similis*.

Tratamiento	Follaje y pseudotallo (g)	Raíz (g)	R. similis/100 g raíz	Nematodos totales /100 g raíz
Agentes biocontrol - TR	83.90 (<0.0001)	30.69 (<0.0001)	-9041 (0.0016)	-9091 (0.0161)
Agentes individuales - TR	73.67 (<0.0001)	24.80 (0.0001)	-7850 (0.0099)	-7825 (0.0529)
Agentes combinados - TR	104.35 (<0.0001)	42.46 (<0.0001)	-11425 (0.0002)	-11625 (0.0046)
Agentes combinados - Agentes individuales	30.67 (0.0014)	17.67 (0.0003)	-3575 (0.0449)	-3800 (0.1150)
TQ - TR	56.43 (0.0004)	22.56 (0.0039)	-11650 (0.0010)	-11850 (0.0111)
Agentes biocontrol - TQ	83.9 (0.020)	8.13 (0.1636)	2608 (0.2340)	2758 (0.3465)
Agentes individuales - TQ	73.67 (0.1534)	2.24 (0.7081)	3800 (0.0960)	4025 (0.1886)
Agentes combinados - TQ	104.35 (0.0005)	19.9 (0.0033)	225 (0.9236)	225 (0.9336)

TR = Testigo referencial

TQ = Testigo químico

Los efectos de las inoculaciones dobles e individuales se diferenciaron significativamente entre sí, con un mayor control observado en las plantas inoculadas con dos hongos sobre la cantidad de *R. similis* por 100 gramos de raíz.

Por su parte, la tasa de reproducción de los nematodos inoculados dos semanas después de la siembra, muestran una clara disminución en aquellas plantas inoculadas con hongos combinados respecto al testigo referencial y un efecto similar al testigo químico (Cuadro 5).

Cuadro 5. Efecto de inoculaciones individuales y combinadas de hongos endofíticos sobre el control de *Radopholus similis* en vitroplantas del cv. "Williams", diez semanas después de la inoculación con nematodos.

Tratamiento	Código	Género	Peso raíz (g)		Nematodos Total (#)		Biocontrol (%)	Tasa reproducción	Densidad R. similis/g raíz		
1	EC11	<i>Trichoderma atroviride</i>	96.2	BCD	7,850	BC	49.2	15.0	CD	77.3	BC
2	EC23	<i>Fusarium oxysporum</i>	86.2	B	9,400	BC	39.2	18.2	D	112.6	C
3	EC26	<i>Trichoderma atroviride</i>	94.1	BC	6,150	BC	60.2	11.4	BCD	62.3	ABC
4	EC34	<i>Fusarium oxysporum</i>	95.2	BCD	7,100	BC	54.1	13.8	BCD	73.8	BC
5	EC11 + EC23	<i>Trichoderma + Fusarium</i>	111.6	D	3,800	B	75.4	7.4	BC	33.7	AB
6	EC26 + EC34	<i>Trichoderma + Fusarium</i>	109.5	CD	3,850	B	75.1	7.5	BC	34.8	AB
7	TA	Testigo absoluto	95.3	BCD	750	A				1.0	
8	TQ	Testigo químico	90.7	B	3,600	B	76.7	7.0	B	41.0	AB
9	TR	Testigo referencial	68.1	A	15,450	C	0	26.3	E	228.8	D

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

3.2 Efecto de hongos endofíticos solos y combinados en la promoción de crecimiento de las plantas

Diferencias significativas fueron obtenidas en el peso de la raíz ($P=0.013$) y peso total ($P=0.033$) de las plantas entre los tratamientos con hongos endofíticos dobles y el testigo absoluto. Hubo un incremento en el peso del sistema radical de 15.0 a 21.7 gramos respecto al tratamiento absoluto, lo que corresponde a una variación de 14.4 % a 20.9%.

De igual forma, plantas protegidas con inoculaciones dobles de las cepas EC26 + EC34 alcanzaron un mayor crecimiento que aquellas inoculadas con los mismos agentes por separado, alcanzando un aumento en la cantidad de raíz de 10.8 a 12.5 gramos respecto al tratamiento absoluto, lo que corresponde a una variación de 8.62 % y 9.98 %.

Cuadro 6. Efecto de inoculaciones individuales y combinadas de hongos endofíticos sobre la promoción del crecimiento de vitroplantas cv. "Williams", después de doce semanas de crecimiento en invernadero.

Tratamiento	Código	Género	Peso total (g)		Peso follaje y pseudotallo (g)		Peso raíz (g)	
1	EC11	<i>Trichoderma atroviride</i>	319.6	AB	209	AB	111.1164	A
2	EC23	<i>Fusarium oxysporum</i>	343.7	ABC	224	ABC	119.48	AB
3	EC26	<i>Trichoderma atroviride</i>	330.5	ABC	216	ABC	114.52	A
4	EC34	<i>Fusarium oxysporum</i>	362.8	BCD	247	BCD	116.05	A
5	EC11 + EC23	<i>Trichoderma + Fusarium</i>	368.3	CD	250	CD	118.58	AB
6	EC26 + EC34	<i>Trichoderma + Fusarium</i>	390.4	D	265	D	125.28	B
7	TA	Testigo absoluto	302.2	A	199	A	103.64	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

El tratamiento 6 de la combinación de las cepas EC26 y EC34 de *Trichoderma atroviride* y *Fusarium oxysporum*, respectivamente, fue la que mostró el mayor incremento de peso fresco total de la planta y del sistema radical, con valores de 29.2% y 20.9% respecto al testigo absoluto.

Diferencias altamente significativas fueron determinadas para longitud y diámetro del sistema radical ($p < 0,0001$) entre el testigo absoluto y los tratamientos con agentes de control biológico.

La fluctuación de esas diferencias en longitud y diámetro del sistema radical de plantas inoculadas con hongos endofíticos estuvo entre 35 y 1248 cm para longitud y 0.09 y 0.48 mm, lo cual corresponde hasta un 34% para longitud y 27 % para diámetro, respecto al testigo absoluto.

Nuevamente, las inoculaciones con dos agentes biológicos alcanzaron un mayor incremento sobre el sistema de raíces que la aplicación de estos por separado.

Cuadro 7. Efecto de inoculaciones individuales y combinadas de hongos endofíticos sobre la promoción del crecimiento y desarrollo del sistema radical de vitroplantas analizadas mediante el software WinRhizo.

Tratamiento	Código	Género	Longitud (cm/m ³)	Diámetro (mm)	Volumen (cm ³)	Area superficial (cm ²)				
1	EC11	<i>Trichoderma atroviride</i>	3,702.3	A	2	B	21.96	AB	1026.24	B
2	EC23	<i>Fusarium oxysporum</i>	3,928.1	B	2	D	22.73	B	1077.01	C
3	EC26	<i>Trichoderma atroviride</i>	3,685.3	A	2	AB	22.07	AB	1026.94	B
4	EC34	<i>Fusarium oxysporum</i>	4,254.4	C	2	C	24.15	C	1128.87	D
5	EC11 + EC23	<i>Trichoderma + Fusarium</i>	4,357.4	C	2	C	24.28	C	1129.63	D
6	EC26 + EC34	<i>Trichoderma + Fusarium</i>	4,915.5	D	2	D	27.4	D	1298.39	E
7	TA	Testigo absoluto	3,667.9	A	2	A	21.43	A	990.69	A

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

4. Discusión

4.1 Prueba de biocontrol para *Radopholus similis* en vitroplantas de banano

Los resultados de este estudio indican que la combinación de los agentes de biocontrol compatibles puede proporcionar una protección mejorada contra *Radopholus similis* al compararla con el uso de sólo un agente de biocontrol. Los dos tratamientos con la combinación de los agentes de biocontrol redujo sustancialmente la reproducción de *Radopholus similis* en el sistema radical de las plantas en comparación con el testigo relativo.

Resultados similares fueron documentados por Chaves (2007), quién trabajó con cepas de los mismos hongos endofíticos evaluados en la presente investigación contra *Radopholus similis* en plantas de banano cv. “Gran Enano” y encontraron que plantas protegidas con el uso de una combinación de agentes de biocontrol mejora la eficacia y persistencia del biocontrol. Algunos investigadores sugieren que la supresión más eficaz de la enfermedad utilizando combinaciones de agentes de biocontrol se debe a los efectos antagonista, aditivo y/o sinérgico de sus mecanismos combinados (Pierson y Weller 1994, Raupach y Kloepper 1998). Mientras que las formas exactas de acción contra el *Radopholus similis* deben ser confirmadas, pues ellas pueden diferir entre aislados o géneros.

Se considera por lo tanto que las menores cantidades de nematodos en la raíces de las plantas inoculadas con más de un aislado fungoso puedan ser atribuidas no solamente a un incremento en la carga del inóculo sino también relacionado con los efectos sinérgicos de estos agentes de biocontrol compatibles.

Guetsky *et al.* citado por A zun felde (2006), postularon que mientras los agentes de biocontrol tengan diferentes requerimientos ecológicos, las combinaciones de los agentes con distintos requerimientos probablemente aumentarán la confiabilidad y disminuirán la variabilidad del biocontrol. Kusari *et al.* (2012) concluyen que la acción de las combinaciones de los agentes de biocontrol resultan de que sus mecanismos de

control se dirigen no sólo al patógeno de la planta, sino también al agente de biocontrol acompañante dentro de la combinación.

Los hongos *Trichoderma* y *Fusarium oxysporum*, han sido utilizados con éxito para suprimir patógenos en varios cultivos (Park *et al.* 1988, Lemanceau *et al.* 1993). De ahí que, aunque las cepas de los agentes de biocontrol evaluados fueron aislados de los tejidos internos de las raíces del banano, y como tales ocupan los mismos nichos ecológicos o similares, ellos parecen no competir entre sí y pueden hasta complementarse uno al otro.

Existen diferentes mecanismos por medio de los cuales los microorganismos endofíticos actúan como antagonistas de nematodos fitoparásitos. Sin duda, uno de los principales mecanismos de acción involucra la producción de metabolitos secundarios tóxicos para los fitonematodos (Carrol 1988, Sharon *et al.* 2001, Mena *et al.* 2003, Athman *et al.* 2006, Kusari *et al.* 2012). Es posible que aún cuando no se establezca un contacto directo con el nematodo, la producción de toxinas de los agentes biológicos pueda inducir mecanismos de defensa en la planta (Pocasangre *et al.* 2004, Althman *et al.* 2006, Kusari *et al.* 2012). Sin embargo, existe poca información disponible de las toxinas específicas involucradas en la actividad antagonista de los hongos contra los nematodos.

Debido a que los resultados de esta investigación muestran un biocontrol mayor y más estable cuando los aislados se usan en combinación respecto al testigo referencial y similar a la aplicación de Vydate 24 SL, se deben realizar estudios para confirmar su eficacia y potencial en el campo. Este enfoque podría integrarse en la producción *in vitro* de plantas, incorporando los agentes de control en la fase de endurecimiento y vivero previniendo la penetración y reproducción de los nematodos en las primeras etapas del cultivo, como lo sugieren estudios realizados por Chaves (2007). Posteriormente, al momento de la siembra en campo, podría evaluarse la incorporación en abonos orgánicos que se aplicarían a la siembra y luego reintroduciéndolos periódicamente siempre con aplicaciones de materia orgánica.

4.2 Efecto de hongos endofíticos solos y combinados en la promoción de crecimiento de las plantas

Con esta investigación se determina que aquellas plantas tratadas con agentes biológicos desarrollan un mayor peso de la planta ($P= 0,013$) y del sistema radical ($P= 0,033$) respecto a plantas no inoculadas, coincidiendo con los resultados obtenidos por Cassambai *et al.* (2011) y anteriormente por otros investigadores (Chaves, 2007, Menjivar, 2005 y Pocasangre, 2002), quienes comprobaron que al inocular plantas del cultivar Gran Enano con hongos endofíticos se promueve un incremento significativo respecto a plantas no inoculadas o testigo absoluto. Asimismo Chaves *et al.* (2009), encontraron un incremento de peso total en plantas protegidas con el hongo *T. atroviridae* de 38.36 g, comparado con el testigo que alcanzó un peso total de 34.06 g.

Por su parte, estudios de Meneses (2003) mostraron un incremento promedio de 39% en el sistema radical y 29% en peso foliar comparado con el testigo absoluto. En el mismo año, Cañizales determinó que plantas inoculadas con *Fusarium oxysporum* incrementaban en un 24% el peso radical respecto a plantas no inoculadas. Recientemente, Cassambia *et al.* (2011) reportaron efectos similares sobre vitro y cormoplantitas del cultivar Gran Enano.

Las mediciones de longitud y diámetro del sistema radical muestran una vez más que aquellas plantas inoculadas con agentes biológicos alcanzan valores más altos para estas variables respecto al testigo absoluto. A su vez, las plantas con inoculaciones dobles tienen un mejor efecto que las aplicaciones individuales de estos hongos.

Estos efectos sobre la raíz le confieren a la planta de banano una mayor capacidad de crecer y alcanzar un mejor desarrollo, pues la raíz tiene la posibilidad de llegar a otros espacios en busca de nutrientes y agua (Pocasangre *et al.* 2004 y Turner, 2004).

Diferentes estudios realizados con *Trichoderma* y *Fusarium* confirman el efecto que estos hongos poseen sobre el crecimiento de varios cultivos incluido banano. En el caso de *Trichoderma*, se ha documentado por varios autores que el hongo impulsa la expresión de los genes de la planta activando su sistema de defensa y promoviendo el crecimiento de la planta y desarrollo del sistema radical, de tal forma que se mejora la absorción y

disponibilidad de nutrientes; creando una zona favorable para el biocontrol de patógenos (Yadidia *et al.*, 2003, Harman *et al.*, 2004, Hason y Howell, 2004, Vinale *et al.*, 2008).

Los resultados de esta investigación comprueban que la combinación de estos hongos confiere un mayor incremento en el peso de la planta y raíces respecto a aplicaciones individuales de éstos, pues se alcanzaron incrementos significativos en la promoción del crecimiento de las plantas, que a criterio de Chaves *et al.* (2009), confirma la importancia de interacciones positivas entre los agentes de biocontrol.

5. Conclusiones

5.1 Bioensayo de penetración de *Radopholus similis* en vitroplantas de banano

1. Hubo una mayor reducción de las poblaciones de *Radopholus similis* al realizar inoculaciones combinadas de hongos respecto a hacerlo individualmente.
2. Los aislamientos del género *Trichoderma* alcanzaron un mejor efecto de biocontrol que los aislamientos de *Fusarium*, en las inoculaciones individuales.
3. Los tratamientos de agentes combinados lograron un porcentaje de biocontrol del 75 % similar al testigo químico, pero superior al testigo referencial.

5.2 Efecto de los agentes biológicos en la promoción del crecimiento de las plantas.

4. Las dos combinaciones de las cepas de *Trichoderma* y *Fusarium* desarrollaron en la planta un mayor peso radical y peso total que las inoculaciones individuales de cada agente.
5. Los tratamientos combinados presentaron un incremento en el peso radical de 18% y 30% respecto al testigo sin inoculación.
6. Se obtuvo un mayor diámetro y longitud de la raíz al realizar inoculaciones combinadas de agentes biológicas respecto a realizarlas individualmente.
7. Hubo un efecto de las inoculaciones combinadas de hongos sobre el crecimiento de las plantas en ausencia de nematodos.

6. Recomendaciones

1. Llevar a cabo pruebas en invernadero con la utilización de estañones de tal forma que podamos evaluar las poblaciones de nematodos y el estado de la raíz en un mayor estado de desarrollo de las plantas y con reinoculaciones de los agentes biológicos.
2. Desarrollar ensayos en plantaciones nuevas, para comprobar el efecto de utilizar hongos endofíticos combinados sobre el control de las poblaciones de nematodos durante varias generaciones sucesivas.
3. Medir el efecto de las inoculaciones combinadas con endofíticos utilizando abonos orgánicos a la siembra y cada seis meses de tal forma que se pueda determinar si este favorece la capacidad de control de los hongos endofíticos sobre las poblaciones de nematodos.

7. Referencias bibliográficas

Alabouvette, C; Couteaudier, Y. 1992. Biological control of *Fusarium* wilts with nonpathogenic fusaria. In Tjamos, EC; Papavizas, GC; Cook, R. eds. Biological control of plant diseases: progress and challenges for the future. New York, Plenum Press. p. 415-426.

American Samoa Community College. 2004. Banana nematodes (en línea). Pest and diseases of American Samoa No. 9. Consultado 27 nov. 2006. Disponible en www.ctahr.hawaii.edu/adap2/ascc_landgrant/Dr_Brooks/BrochureNo9.pdf.

Araya, M. 2004. Situación actual del manejo de nematodos en banano (*Musa AAA*) y plátano (*Musa AAB*) en el trópico americano. In Rivas, G; Rosales, FE. eds. Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de las musáceas en los trópicos. Actas del taller “Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de las musáceas” celebrado en Guayaquil, Ecuador. 11-13 de agosto, 2003. Montpellier, FR. INIBAP. p. 79-102.

Athman, SY; Dubois, T; Viljoen, A; Labuschagne, N; Coyne, D; Ragama, P; Gold, CS; Niere, B. 2006. In vitro antagonism of endophytic *Fusarium oxysporum* isolates against the burrowing nematode *Radopholus similis*. *Nematology* 8(4):627-636.

Bacon, CW; Yates, IE. 2006. Endophytic root colonization by *Fusarium* species: histology, plant interactions and toxicity. In Schulz, B; Boyle, C; Sieber, T. eds. Microbial root endophytes. Berlin-Heidelberg, DE, Springer-Verlag. p. 133-152. (Soil Biology Vol. 9).

Baker K, Cook, R. 1982. Biological control of plant pathogens. APS. American Phytopathology Soc. St. Paul, MN, USA. 433 p.

Blake, CD. 1966. The histological changes in banana roots caused by *Radopholus similis* and *Helicotylenchus multicinctus*. *Nematológica* 12:129-137.

Bandara V, Seneviratne G, Kulasooriya S. 2006. Interaction among endophytic bacteria and fungi: effect and potentials. *J. Biosci* 31: 645-650.

- Cañizares C. 2003. Estudio sobre poblaciones de hongos endofíticos provenientes de suelos supresivos al nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorne en plantaciones comerciales de plátano en la zona de Talamanca, Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 75 p.
- Cárdenas, JE. 2001. Selección de vitroplantas provenientes de microsecciones de banana de la variedad Gros Michel (AAA) resistentes a la raza 1 del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*). Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 122 p.
- Carrol, GC. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69(1):2-9.
- Carrol, GC. 1990. Fungal endophytes in vascular plants: Mycological research opportunities in Japan. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 31:103-116.
- Carroll G, Petrini O. 1983. Patterns of substrate utilization by some fungal endophytes from coniferous foliage. *Mycologia* 75 (1): 53-63.
- Chaves N. 2007. Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del Nematodo Barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorn. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR. CATIE. 85p.
- Chaves N, Pocasangre L, Elango F, Rosales F, Sikora, R. 2009. Combining endophytic fungi and bacteria for the biocontrol of *Radopholus similis* (Cobb) Thorne and for effects on plant growth. *Scientia Horticulturae*, vol. 122, no. 3, p. 472-478.
- Chet, I; Viterbo, A; Brotman, Y; Lousky, T. 2006. Enhancement of plant disease resistance by the biocontrol agent *Trichoderma*. *Life Sciences*. Weizmann Institute of Science. p. 1-2.
- Compant S, Reiter B, Sessitsch A, Nowak J, Clément C. 2005. Endophytic colonization of *Vitis vinifera* L. by plant growth-promoting bacterium *Burkholderia* sp. Strain Ps JN. *Applied and Environmental Microbiology* 71(4): 1685-1693.
- Cook, RJ. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 31: 53-80.

Cooke, R. 1968. Relationships between nematode-destroying fungi and soil-borne phytonematodes. *Phytopathology* 58:909-913.

Coosemans, J. 1993. Possibilities for the biological control of nematodes, and their distribution in the soil of highland banana and plantain as a base for sampling. In Gold, CS; Gemmill, B. eds. *Biological and integrated control of highland banana and plantain pest and diseases. Proceedings of a research coordination meeting. Cotonou, Benin, 12-14 November, 1991.* p. 240-251.

Crane, JH; Balerdi, CF. 1998. Los plátanos en Florida (en línea). Universidad de Florida. Consultado 11 abril 2014. Disponible en <http://trec.ifas.ufl.edu/fruitscapes/>.

Crump, DH. 1987. Effect of time sampling, method isolation and age of nematode on the species of fungi isolate from females of *Heterodera schachtii* and *H. avenae*. *Revue de Nématologie* 10:369-373.

Davide, RG. 1992. Studies on chemical and biological control of banana nematodes. In Davide, RG. ed. *Studies on nematodes affecting bananas in the Philippines.* Los Baños, Philippine Agriculture and Resources Research Foundation, PH. p. 107-110.

Davide, RG. 1996. Overview of nematodes as a limiting factor in *Musa* production. In Frison, EA; Horry, JP; De Waele, D. eds. *New frontiers in resistance breeding for nematode, Fusarium and Sigatoka.* Montpellier, FR, INIBAP. p. 27-31.

Dochez, C; Speijer, PR; Hartman, J; Vuylsteke, D; De Waele, D. 2000. Cribado de híbridos de *Musa* para la resistencia a *Radopholus similis*. *INFOMUSA* 9(2):3-4.

EPA (Environmental Protection Agency, US). 2014. Biopesticide ingredient and product lists (en línea). Consultado 20 mayo, 2014. Disponible en <http://iaspub.epa.gov/apex/pesticides/f?p=CHEMICALSEARCH:1:>

EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization, FR) 2006. Distribution maps of quarantine pests for Europe (en línea). Consultado 21 mayo, 2014. Disponible en: http://www.eppo.int/QUARANTINE/nematodes/Radopholus_similis/RADOSI_images.htm

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2004. La economía mundial del banano 1985-2002. Eds. Arias, P., Dankers C., Lui P, Pilkauskas. Roma. 104 p.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2013. Banano estadísticas 2013 (en línea). Consultado 23 May. 2014. Disponible en <http://www.fao.org/es>

Fernández, E; Mena, J; González, J; Márquez, ME. 2003. Biological control of nematodes in banana. In Turner, DW; Rosales, FE. eds. Banana root system: towards a better understanding for its productive management. Proceedings of an international symposium held in San José, Costa Rica, 3-5 November 2003. San José, CR, CORBANA. p. 193-200.

Frison E. Sharrock S. 1998. The economic, social and nutritional importance of banana in the word. *In* Bananas and food security. International Symposium, INIBAP, Douala, Cameroon 10-14 November, 21-35 p.

Gold, CS; Dubois, T. 2005. Novel application methods for microbial control products: IITA's research against banana weevil and burrowing nematode. *Biocontrol News and Information* 26(3):86-89.

Gowen, SR. 1979. Some consideration of problems associated with the nematode pests of bananas. *Nematropica* 9(1):79-91.

Gowen, SR; Quénéhervé, P. 1990. Nematode parasites of bananas, plantains and abaca. In Luc, M; Sikora, RA; Bridge, J. eds. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Wallingford, UK, CAB International. p. 431-460.

Gowen, SR. 1993. Yield losses caused by nematodes on different banana varieties and some management techniques appropriate for farmers in Africa. In Gold, CS; Gemmill, B. eds. *Biological and integrated control of highland banana and plantain pest and diseases*. Proceedings of a research coordination meeting. Cotonou, Benin, 12-14 November, 1991. p. 199-208.

Guzman, M; Villalta R. 2008. Eficacia de mezclas de azoxistrobina con tiabendazole para el combate de enfermedades poscosecha del banano (*Musa AAA*). CORBANA 34(61):1-10.

Hallmann, J; Sikora, RA. 1994. In vitro and in vivo control of *Meloidogyne incognita* with culture filtrates from nonpathogenic *Fusarium oxysporum* on tomato. Journal of Nematology 26(1):102.

Hallmann, J; Sikora, RA. 1996. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. European Journal of Plant Pathology 102:155-162.

In Schulz, B; Boyle, C; Sieber, T. eds. Microbial root endophytes. Berlin-Heidelberg, DE, Springer-Verlag. p. 15-32. (Soil Biology Vol. 9).

Handelsmann, J; Stabb, EV. 1996. Biocontrol of soilborne pathogens. Plant Cell 8:1855-1869.

Harman, GE; Howell, CR; Viterbo, A; Chet, I; Lorito, M. 2004. Trichoderma species opportunistic, avirulent plant symbionts. Nature Reviews Microbiology 2:43-56.

Hemeng, OB. 1993. Studies on parasitic nematodes associated with plantain. In Gold, CS; Gemmill, B. eds. Biological and integrated control of highland banana and plantain pest and diseases. Proceedings of a research coordination meeting. Cotonou, Benin, 12-14 November, 1991. p. 252-259.

Hernández R. 2009. Sensibilidad a fungicidas poscosecha e identificación molecular del hongo *Colletotrichum* spp., agente causal de la antracnosis en frutos de banano en Costa Rica. Tesis de maestría. San José. Costa Rica. 96 p

Howell, CR. 2003. Mechanisms employed by Trichoderma species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. Plant Disease 87(1):4- 10.

Jones, DR. 2000. The genera *Musa* and *Ensete*. In Jones, Dr. ed. Diseases of banana, abaca and enset. Wallingford, Oxon, UK, CAB International. p. 1-36.

Kerry, BR; Crump, DH; Mullen, LA. 1982. Studies of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae*, under continuous cereals, 1974-1978. I. Plant growth and nematode multiplication. *Annals Of Applied Biology* 100:477-487.

Kuc, J. 1995. Induced systemic resistance. An overview. In Hammerschmidt, R; Kuc, J. eds. *Induced resistance to disease in plants*. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. p. 169-175.

López, P. 2004. Control biológico de nematodos parásitos de plantas. In *Control biológico de plagas agrícolas*. Turrialba, CR, CATIE. p. 189-191. (Serie Técnica. Manual Técnico N° 53).

Lu, Z; Tombolini, R; Woo, S; Zeilinger, S; Lorito, M; Jansson, JK. 2004. In vivo study of Trichoderma-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Applied and Environmental Microbiology* 70(5):1073-3081.

Marín, DH; Sutton, TB; Barker, KR. 2002. Diseminación del banano en Latinoamérica y el Caribe y su relación con la presencia de *Radopholus similis*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 66:62-75.

Marín, DH. 2003. Research in progress and future perspectives on the root system management (abstract). In Turner, DW; Rosales, FE. eds. *Banana root system: towards a better understanding for its productive management*. Proceedings of an international symposium held in San José, Costa Rica, 3-5 November 2003. San José, CR, CORBANA. p. 23.

Matsumoto K. Barbosa M., Copati Souza L. Teixeira J. 1999. In vitro selection for Fusarium wilt resistance in banana. II. Resistance to culture filtrate of race 1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Fruits* 54:97-102.

Mitov N., Oliva P. 1975. Estudio sobre el Mal de Panamá del Plátano en Cuba. *Revista de Agricultura* 8(2): 12-29.

Moens, T; Araya, M; Swennen, R; De Waele, D. 2004. Biodegradación acelerada de nematicidas en Musa. In Rivas, G; Rosales, FE. eds. *Manejo convencional y alternativo*

de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de las musáceas en los trópicos. Actas del taller "Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de las musáceas" celebrado en Guayaquil, Ecuador. 11-13 de agosto, 2003. INIBAP, Montpellier, FR. p. 105-117.

Moore N., Bentley S., Pegg K. Jones, D. 1995. Fusarium wilt of banana. INIBAP. Musa Disease no.5: 1-4.

Olivain, Ch; Trouvelot, S; Binet, MN; Cordier, Ch; Pugin, A; Alabouvette, C. 2003. Colonization of flax roots and early physiological responses of flax cells inoculated with pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. Applied and Environmental Microbiology 69(9):5453-5462.

Papavizas G. 1985. *Trichoderma* and *Gliocadium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. Annual. Review Phytopathology 23:23-54.

Perea M. 1998. Consideraciones Biotecnológicas para el Mejoramiento de las Musáceas. In: Seminario Internacional sobre Producción de Plátano. Memorias 4 al 8 de mayo. Quindío. Armenia, Colombia. CORPOICA-Universidad de Quindío-SENA. Comité Departamental de Cafetaleros del Quindío. p. 63-70.

Pereira, JO; Carneiro Vierira, ML; Azevedo, JL. 1999. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. World Journal of Microbiology & Biotechnology 15:37-40.

Pérez L. Battle A. Fonseca J. 2003. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en Cuba: biología de las poblaciones, reacciones de los clones híbridos de la FHIA y biocontrol. In Rivas, G., Rosales F., eds. Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka Negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos. Taller Guayaquil, EC. p. 141-155.

Pérez-Vicente L. 2004. Fusarium wilt (Panama disease) of banana: an updating review of the current knowledge on the disease and its causal agent. In Orozco-Santos M, Orozco-Romero J, Velásquez-Monreal J, Medina-Urrutia V, Hernández J. eds. XVI Reunión Internacional ACORBAT 2004 Oaxaca, México. Memoria. p. 1-16.

- Petrini, O. 1986. Taxonomy of endophytic fungi in aerial plant tissues. In Fokkema, NJ; van den Heuvel, J. eds. Microbiology of the phyllosphere. Cambridge, UK, Cambridge University. p. 175-187.
- Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In Andrews, J; Hirano, S. eds. Microbial ecology of leaves. Berlin Heidelberg, New York, Springer. p. 179-197.
- Pieterse, CMJ; van Wees, SCM; van Pelt, JA; Knoester, M; Laan, R; Gerrits, H; Weisbeek, PJ; van Loon, LC. 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic in Arabidopsis. Plant Cell 10:1571-1580.
- Pieterse, CMJ; van Loon, LC. 1999. Salicylic acid-independent plant defense pathways. Trends in Plant Science 22:291-296.
- Pinochet, J. 1986. A note on nematode control practices on bananas in Central America. Nematropica 16(2):197-203.
- Pinochet, J. 1996. Review of past research on Musa Germplasm and nematode interactions. In Frison, EA; Horry, JP; De Waele, D. eds. New frontiers in resistance breeding for nematode, *Fusarium* and Sigatoka. Montpellier, FR, INIBAP. p. 32-43.
- Pocasangre E. 2000. Biological enhancement of banana tissue culture plantlets with endophytic fungi for the control of the burrowing nematode *Radopholus similis* and Panamá disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. cubense). [Tesis Doctoral]. Bonn (DE) : Universidad de Bonn. 95 p.
- Pocasangre L, Sikora A, Vilich V, Schuster P. 2000. Encuesta sobre los hongos endofíticos del banano de América Central y el Caribe para el control biológico del nematodo barrenador (*Radopholus similis*). InfoMusa, vol. 9, no. 1, p. 3-5.
- Pocasangre, LE. 2002. Mejoramiento biológico de vitroplantas de banano mediante la utilización de hongos endofíticos para el control del nematodo barrenador *Radopholus similis*. In Riveros, AS; Pocasangre, LE; Rosales, FE. eds. Taller internacional sobre inducción de resistencia y uso de tecnologías limpias para el manejo de plagas en plantas. Turrialba (Costa Rica). 27-30 Ago 2002. p. 33-39.

Pocasangre, LE; zum Felde, A; Cañizares, C; Riveros, AS; Rosales, FE; Sikora, R. 2004. Manejo alternativo de fitonematodos en banano y plátano. In Memorias, XVI reunión internacional de ACORBAT, Oaxaca, MX. p. 106-112.

Quadri, AN; Saleh, HM. 1990. Fungi associated with *Heterodera schachtii* (Nematoda in Jordan, II). Effect on *H. schachtii* and *Meloidogyne javanica*. Nematologica 36:104- 113.

Raut, S, Ranade S. 2004. Diseases of banana and their management. Disease of Fruits and Vegetables. 2:37-57.

Rey, M; Delgado-Jarana, J; Rincón, AM; Limón, MC; Benítez, T. 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. Revista Iberoamericana de Micología 17:S31-S36.

Rodgers, PB. 1989. Potential of biological control organisms as a source of antifungal compounds for agrochemical and pharmaceutical product development. Pesticide Science 27:155-164.

Rutherford M, Kangire A. 1998. Prospects for the management of *Fusarium* wilt of banana (Panama disease) in Africa. In Frison, E, Gold C, Karamura E, Sikora R, eds. Mobilizing IPM for sustainable banana production in Africa. Proceeding of a workshop on banana IPM hek. 179-188 p.

Sarah, JL. 1989. Banana nematodes and their control in Africa. Nematropica 9(2):199-216.

Sarah, JL. 1999. Las prácticas culturales como medio de control de nematodos en el banano. In Rosales, FE; Tripon, SC; Cerna, J. eds. Producción de banano orgánico y, o, ambientalmente amigable. Memorias del taller internacional realizado en la EARTH, Guácimo, Costa Rica (27-29 de julio de 1998). Montpellier, FR, Red internacional para el mejoramiento del banano y plátano. p. 138-151.

Schippers, B; Bakker, AW; Bakker, PAHM. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Annual Review of Phytopathology 25:339-358.

Shi Y, Lou K, Li C. 2009. Promotion of plant growth by phytohormone producing endophytic microbes of sugar beet. *Biol Fertil Soils* 45:645-653.

Shönbeck, F; Steiner, U. 1997. Induced resistance. In Hartleb, H; Heitefuss, R; Hoppe, HH. eds. Resistance of crop plant against fungi. p. 272-297.

Shulz, B. 2006. Mutualistic interactions with fungal root endophytes. In Schulz, B; Boyle, C; Sieber, T. eds. Microbial root endophytes. Berlin-Heidelberg, DE, Springer-Verlag. p. 261-279. (Soil Biology Vol. 9).

Shulz, B; Boyle, C. 2006. What are endophytes? In Schulz, B; Boyle, C; Sieber, T. eds. Microbial root endophytes. Berlin-Heidelberg, DE, Springer-Verlag. p. 1-13. (Soil Biology Vol. 9).

Sikora, RA. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for biological control of plant parasitic nematodes. *Phytopathology* 30:245-270.

Sivan A., Chet, I. 1987. Biological control of Fusarium crown rot of tomato by *Trichoderma harzianum* under field conditions. *Plant Disease* 71(7):587-692.

Sivan, A., Chet, I. 1989. The possible role of competition between *Trichoderma harzianum* and *Fusarium oxysporum* on rhizosphere colonization. *Phytopathology* 79(2):198-203.

Speijer, PR; Gold, CS. 1996. Musa root health assessment: a technique for the evaluation of Musa germplasm for nematode resistance. In Frison, EA; Horry, JP; De Waele, D. eds. New frontiers in resistance breeding for nematode, *Fusarium* and Sigatoka. Montpellier, FR, INIBAP. p. 62-78.

Tabora, P; Okumoto, S; Elango, F. 2002. Organic and transition bananas: experience with effective microorganisms (EM). In Riveros, AS; Pocasangre, LE; Rosales, FE. eds. Taller internacional sobre inducción de resistencia y uso de tecnologías limpias para el manejo de plagas en plantas. Turrialba (Costa Rica). 27-30 Ago 2002. p. 33-39.

Taylor, AL. 1971. Introducción a la nematología vegetal aplicada. Guía de la FAO para el estudio y combate de los nematodos parásitos de las plantas. Roma, IT, FAO. 131 p.

Tronsmo A. 1996. *Trichoderma harzianum* in biological control of fungal diseases. In Hall, R. ed. Principles and Practice of Managing Soilborne Plant Pathogens. APS Press. American Phytopathological Soc. St. Paul, MN, USA. P. 213-216.

Van Loon L. Bakker P, Pietterse C. 1998. Systemic resistance induced by rhizosphere bacteria. Annual Review of Phytopathology 36:453-483.

Villalta R, Sample M, Shields D, Guzmán M. 2006. Evaluación de fungicidas y mezclas de fungicidas para el combate de enfermedades poscosecha del banano (Musa AAA). CORBANA 32(59):17-33.

Vinale, F.; Sivasithamparam, K.; Ghisalberti, EL.; Marra, R.; Woo, SL. y Lorito, M.2008. Trichoderma-plant-pathogen interactions. Soil Biology and Biochemistry, vol. 40, no. 1, p. 1-10.

Vu, T; Hauschild, R; Sikora, RA. 2006. *Fusarium oxysporum* endophytes induced systemic resistance against *Radopholus similis* on banana. Nematology 8(6):847-852.

Weinling R. 1934. Studies on a lethal principle effective in the parasitic action of *Trichoderma lignorum* on *Rhizoctonia solani* and other fungi. Phytopathology 24:153-1179.

Yépez, G. 1972. Los nemátodos; enemigos de la agricultura. Maracay, VE, Universidad Central. 220 p.

Zambrano A, Matínez G, Gutiérre Z, Manzanilla E, Vicente-Villardón J, Demey j. 2007. Marcador RAPD asociado a la resistencia de *Fusarium oxysporum* en Musa. INCI 32 (11): 775-779.

zum Felde, A. 2008. Studies on Characteristics of the Antagonistic Relationship between *Radopholus similis* (Cobb) Thorne and the Mutualistic Endophytic Fungi in Nematode-Suppressive Banana Plants (Musa AAA). Thesis PhD. Germany, University of Bonn. 93p.

VI. Anexos

Anexo 1. Análisis de varianza para la variable Peso Total de la planta, biocontrol de *Radopholus similis*.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso Total	70	0.44	0.29	13.53

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	93322.49	15	6221.50	2.85	0.0025
Trat	56113.96	6	9352.33	4.28	0.0013
Rep	37208.52	9	4134.28	1.89	0.0728
Error	117947.61	54	2184.21		
Total	211270.09	69			

Anexo 2. Análisis de varianza para la variable peso de parte aérea, biocontrol de *Radopholus similis*.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso parte aerea (g)	70	0.38	0.21	17.71

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	55668.99	15	3711.27	2.24	0.0157
Trat	35857.71	6	5976.28	3.61	0.0044
Rep	19811.28	9	2201.25	1.33	0.2441
Error	89441.81	54	1656.33		
Total	145110.79	69			

Anexo 3. Análisis de varianza para la variable peso de raíz total, biocontrol de *Radopholus similis*.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso raíz total (g)	70	0.45	0.30	16.39

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	14214.62	15	947.64	2.94	0.0019
Trat	4834.85	6	805.81	2.50	0.0331
Rep	9379.76	9	1042.20	3.23	0.0033
Error	17415.15	54	322.50		
Total	31629.77	69			