

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA

PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACIÓN

ESCUELA DE POSGRADUADOS

**ESTUDIO SOBRE POBLACIONES DE HONGOS ENDOFITICOS PROVENIENTES DE
SUELOS SUPRESIVOS AL NEMATODO BARRENADOR *Radopholus similis* (Cobb)
Thorne EN PLANTACIONES COMERCIALES DE PLATANO EN LA ZONA DE
TALAMANCA, COSTA RICA**

POR

CARLOS ALFREDO CAÑIZARES MONTEROS

**Turrialba, Costa Rica
2003**

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACIÓN
ESCUELA DE POSGRADUADOS

ESTUDIO SOBRE POBLACIONES DE HONGOS ENDOFITICOS
PROVENIENTES DE SUELOS SUPRESIVOS AL NEMATODO BARRENADOR
Radopholus similis (Cobb) Thorne EN PLANTACIONES COMERCIALES DE
PLATANO EN LA ZONA DE TALAMANCA, COSTA RICA

Tesis sometida a la consideración de la Escuela de Posgraduados,
Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro
Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza como requisito parcial
para optar el grado de:

Magister Scientiae

Por:

CARLOS ALFREDO CAÑIZARES MONTEROS

Turrialba, Costa Rica
2003

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y la Escuela de Posgraduados del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:

Luis E. Pocasangre E. Ph. D.
Consejero Principal

Franklin E. Rosales, Ph. D.
Miembro Comité Consejero

Alba Stella Riveros Angarita, Ph. D.
Miembro Comité Consejero

Thomas Moens, Ph. D.
Miembro Comité Consejero

Glenn Galloway, Ph. D.
Director y Decano de la Escuela de Posgraduados

Carlos Alfredo Cañizares Monteros
Candidato

DEDICATORIA

A Dios Padre Celestial por sus muchas misericordias, a Jesucristo Señor de señores y Rey de reyes por su Amor en la redención y al Espíritu Santo por su ayuda constante.

A mi madre por su comprensión y apoyo.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Luis E. Pocasangre E., Consejero Principal, por su excelente orientación, entrega de valiosos conocimientos y apoyo en el proceso de la investigación.

Al Dr. Thomas Moens, por su orientación oportuna para la culminación de esta investigación.

A los Drs. Alba Stella Riveros y Franklin Rosales por sus consejos y recomendaciones en esta investigación.

A la Asociación de Productores de Plátano Margarita de Sixaola-Talamanca y especialmente al Ing. Agr. Sigifredo Rojas Rojas, por su permanente colaboración y apoyo desinteresado en los muestreos de campo.

Al Programa del INIBAP, por el aporte técnico y soporte económico para llevar a buen término esta investigación.

Al IICA por su eficiente apoyo económico.

Al personal de CORBANA, por su apoyo técnico, en especial a los Drs. Jorge Sandoval, Director y Mario Araya, Jefe de Nematología, al permitir mi estadía para entrenamiento.

A todo el personal del laboratorio de Fitopatología-CATIE, por el apoyo en bien de esta investigación; y su siempre generosa amistad y calidad humana que me brindaron durante mi estadía.

A mi familia, mi madre Estela, mi padre, mis hermanas Leticia, Margarita y su familia, Miriam y su familia, a mis hermanos Patricio y Vinicio, por el apoyo que supieron brindarme en todo momento.

A Sara Yalle por su entrega y apoyo incondicional en la culminación de esta investigación.

A mi colega Annabella Meneses por compartir tantos momentos y ser ejemplo de tenacidad en esta investigación.

Al personal de la Escuela de Postgrado por el apoyo brindado.

Al personal de la biblioteca ORTON por su ayuda extraordinaria.

A mis amigas y amigos, compañeros de esta lucha y experiencia por compartir sus mejores momentos.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTO.....	iii
CONTENIDO.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE TABLAS.....	vii
LISTA DE ANEXOS.....	viii
RESUMEN.....	ix
SUMMARY.....	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.2. OBJETIVOS.....	5
1.2.1. Objetivo general.....	5
1.2.2. Objetivos específicos.....	5
1.3. HIPÓTESIS.....	5
2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	7
2.1. EL PLÁTANO: ORIGEN Y BOTÁNICA.....	7
2.1.1. Su cultivo y economía.....	12
2.2. LOS NEMATODOS Y SU IMPACTO ECONÓMICO.....	13
2.3. DINÁMICAS POBLACIONALES DE NEMATODOS PARASITOS EN PLÁTANO.....	16
2.4. CONTROL BIOLÓGICO.....	17
2.5. HONGOS ENDOFÍTICOS.....	19
2.5.1. Actividad antagonista de los hongos endofíticos.....	21
2.5.1.1. Parasitismo.....	22
2.5.1.2. Antibiosis.....	23
2.5.2. Inducción de resistencia.....	23
2.6. SUELOS SUPRESIVOS.....	24
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
3.1. LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA DEL ESTUDIO.....	26
3.2. DINÁMICA POBLACIONAL DE <i>RADOPHOLUS SIMILIS</i>	28
3.2.1. Determinación de la supresividad de los suelos mediante el método indirecto.....	29
3.2.1.1. Protocolo para la extracción de nematodos del sistema radical de plátano.....	30
3.3. MÉTODO INDIRECTO DE SUPRESIVIDAD.....	30
3.3.1. Cultivo aséptico de <i>Radopholus similis</i>	31
3.4. AISLAMIENTO DE HONGOS ENDOFÍTICOS DE SUELO SUPRESIVOS DE MARGARITA-SIXAOLA.....	32
3.5. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE HONGOS ENDOFÍTICOS A NIVEL <i>IN VITRO</i>	32
3.5.1. Prueba de parasitismo.....	32
3.5.2. Prueba de antibiosis.....	33
3.6. EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE AISLADOS ENDOFÍTICOS PROMISORIOS A NIVEL DE INVERNADERO.....	34
3.6.1. Protocolo de evaluación de la reproducción de <i>R. similis</i> en la prueba <i>in vivo</i>	35
3.6.1.1. Preparación de la suspensión de esporas.....	35
3.6.1.2. Inoculación de vitroplantas con hongos endofíticos.....	35
3.6.1.3. Inoculación del material vegetal con <i>R. similis</i>	35

3.6.1.4. Evaluación del experimento.....	37
3.7. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	38
3.7.1. Actividad antagonista <i>in vitro</i>	38
3.7.2. Actividad <i>in vivo</i>	38
3.7.3. Modelo estadístico.....	40
3.7.4. Análisis estadísticos.....	40
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	41
4.1. DINÁMICA POBLACIONAL DE <i>RADOPHOLUS SIMILIS</i>	41
4.2. MÉTODO INDIRECTO DE SUPRESIVIDAD DEL SUELO SOBRE <i>RADOPHOLUS SIMILIS</i>	43
4.3. AISLAMIENTO DE HONGOS ENDOFÍTICOS.....	46
4.4. ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE LOS AISLADOS ENDOFÍTICOS A NIVEL <i>IN VITRO</i>	47
4.4.1. Prueba de parasitismo.....	47
4.4.2. Prueba de antibiosis.....	49
4.5. ACTIVIDAD ANTAGONISTA DE LOS AISLADOS ENDOFÍTICOS A NIVEL <i>IN VIVO</i>	50
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	56
5.1. CONCLUSIONES.....	56
5.2. RECOMENDACIONES.....	57
6. BIBLIOGRAFÍA CITADA.....	59
7. ANEXOS.....	72

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representación diagramática de una planta de plátano con hijo de sucesión.
Tomado de Champion 1963.....7
- Figura 2. Metodología utilizada para obtener los extractos crudos de los hongos endofíticos.....34
- Figura 3. Protocolo utilizado en el bioensayo para determinar la actividad antagonista de los hongos endofíticos sobre *Radopholus similis*.....36
- Figura 4. Composición de fitonematodos presentes en tres gradientes de suelo, durante 4 períodos de muestreo en plantaciones de plátano “Curraré..... 42
- Figura 5. Extracción de nematodos en suelo esterilizado y no esterilizado después de tres días de inoculado *Radopholus similis*..... 45
- Figura 6. *Radopholus similis* parasitado por micelio del aislado *Trichoderma* S10...48
- Figura 7. Efecto de seis aislados endofíticos sobre la reproducción de *Radopholus similis* en el sistema radical dos cultivares de plátano y banano después de dos meses de inoculados con nematodos..... 53
- Figura 8. Efecto de la promoción de crecimiento del aislado *Fusarium* S9 sobre plantas de plátano..... 54
- Figura 9. Efecto de seis aislados de hongos endofíticos en peso del sistema radical de dos cultivares: plátano (*Musa* sp. AAB) y banano (*Musa* sp. AAA), después de dos meses de inoculado el nematodo en la prueba *in vivo*..... 55

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Información general de tres fincas con diferentes gradientes de supresividad a <i>Radopholus similis</i>	28
Tabla 2. Descripción de los tratamientos utilizados para determinar la supresividad de los suelos mediante el método indirecto.....	31
Tabla 3. Composición de fitonematodos encontrados entre gradientes de suelo, en cuatro períodos de muestreo en plantaciones de plátano “Curraré”.....	43
Tabla 4. Extracción de nematodos en suelo esterilizado y no esterilizado después de tres días de inoculado <i>Radopholus similis</i>	45
Tabla 5. Aislamientos de hongos endofíticos provenientes de suelos supresivos, medianamente supresivos y no supresivos de Sixaola, Costa Rica.....	46
Tabla 6. Actividad parasítica de aislados de hongos endofíticos sobre el nematodo barrenador <i>Radopholus similis</i> , a las 24 horas.....	48
Tabla 7. Efecto antagonista de cuatro concentraciones de metabolitos secundarios sobre <i>Radopholus similis</i>	50
Tabla 8. Efecto de seis hongos endofíticos sobre la reproducción de <i>Radopholus similis</i> en el sistema radical de plantas de plátano “Curraré” (<i>Musa</i> sp. AAB) a dos meses de inocular con el nematodo.....	54
Tabla 9. Efecto de seis hongos endofíticos sobre la reproducción de <i>Radopholus similis</i> en el sistema radical de vitroplantas de banano “Gran Enano” (<i>Musa</i> sp. AAB) a dos meses de inocular con el nematodo.....	55

LISTA DE ANEXOS

- Anexo 1. Dinámica de población de fitonematodos presentes en tres fincas de suelos supresivos, medianamente supresivos y no supresivos en cuatro muestreos...72
- Anexo 2. Composición de fitonematodos presentes en el sistema radical de plantaciones de plátano var. “Curraré en tres gradientes de suelo en cuatro periodos de muestreo.....73
- Anexo 3. Tratamientos: suelo esterilizado y no esterilizado, periodos de experimento en el método indirecto de supresividad a *Radopholus similis*..... 73
- Anexo 4. Comparaciones entre suelos esterilizados y no esterilizados, en el método indirecto de supresividad a *Radopholus similis*.....74
- Anexo 5. Comparación de periodos de experimento en el método indirecto de supresividad a *Radopholus similis*.....74
- Anexo 6. Actividad parasítica de los hongos endofíticos promisorios sobre el nematodo barrenador *Radopholus similis*, evaluado a las 24 horas.....74
- Anexo 7. Antibiosis de los hongos endofíticos promisorios, en cuatro concentraciones de extractos crudos sobre el nematodo *Radopholus similis*.....74
- Anexo 8. Efecto en la prueba *in vivo* de los hongos endofíticos élite en la promoción de crecimiento de rebrotes de microcormos de plátano var. “Curraré” y la reproducción del nematodo barrenador *Radopholus similis*.....75
- Anexo 9. Efecto en la prueba *in vivo* de los hongos endofíticos élite en la promoción de crecimiento de vitroplantas de banano var. “Gran Enano” y la reproducción del nematodo barrenador *Radopholus similis*.....75

RESUMEN

Estudios sobre la supresividad a *Radopholus similis* de tres suelos: supresivos, moderadamente supresivos y no supresivos, cultivados con plátano en Sixaola, Costa Rica fueron realizados en la presente investigación. El método directo para medir la supresividad demostró reducciones hasta de 94% en la población de *R. similis* en el sistema radical en suelos supresivos en comparación con suelos no supresivos. Sin embargo, no se registraron diferencias entre suelos moderadamente supresivos y no supresivos. Este comportamiento fue consistente en los cuatro muestreos realizados. Por otro lado, el método indirecto reconfirmó el potencial supresor de los suelos supresivos. Se encontraron reducciones hasta 56% en la extracción de *R. similis* en suelos supresivos en comparación con no supresivos. Sin embargo, no se detectaron diferencias entre suelos moderadamente supresivos y no supresivos en los cuatro experimentos consecutivos realizados. Por otro lado, la sanidad del sistema radical medido en porcentaje de raíces funcionales fue superior en suelos supresivos que no supresivos, variando de 71 a 91% en suelos supresivos y solamente de 47 a 62% en suelos no supresivos.

Investigaciones para conocer la población de hongos endofíticos en el sistema radical de plátano arrojaron que 62 aislados fueron recuperados de suelos supresivos y solamente 33 de suelos no supresivos. 15 aislados provenientes de suelos supresivos fueron seleccionados para conocer su actividad antagonista sobre *R. similis* en condiciones *in vitro*. Entre 3 a 78% de parasitismo sobre *R. similis* fue encontrado entre los hongos evaluados. Por otro lado, se registraron porcentajes de mortalidad de *R. similis* entre 10 y 98% causada por metabolitos secundarios 24 horas después de la exposición del nematodo a la suspensión metabólica de los hongos endofíticos. Los mejores cuatro aislados endofíticos, dos pertenecientes a *Fusarium* (S9 y S7) y dos aislados de *Trichoderma* (S10 y S2) fueron seleccionados como los mejores biocontroladores a nivel *in vitro* y se incluyeron para ser evaluados en condiciones de invernadero, conjuntamente con dos aislados endofíticos de actividad antagonista conocida, aislados *Fusarium* T5 y *Trichoderma* T12, provenientes de suelos supresivos de Guatemala.

Los resultados de los bioensayos demostraron que plantas protegidas con hongos endofíticos presentaron reducciones hasta 88 y 86% en la población final de *R. similis* en el sistema radical de plátano y banano, respectivamente, en comparación con plantas control. Los aislados endofíticos *Fusarium* S9 y *Trichoderma* S10 fueron los mejores biocontroladores de *R. similis* tanto en banano como en plátano, superando a los aislados de actividad antagonista conocida como *Fusarium* T5 y *Trichoderma* T12 provenientes de suelos supresivos de Guatemala. Por otro lado, se registraron reducciones hasta 89% y 88% en la población final de *R. similis* en suelo de plantas protegidas de plátano y banano, respectivamente, en comparación con suelo de plantas control. Adicionalmente al efecto de biocontrol, los aislados *Fusarium* S9 y *Trichoderma* S10 ejercieron un efecto en la promoción de crecimiento del sistema radical y foliar de plantas protegidas tanto en plátano como en banano. Estudios relacionados con el mejor entendimiento del mecanismo biocontrol de estos hongos así como la evaluación de biocontrol en condiciones de campo deben ser prioridades de investigaciones futuras.

SUMMARY

Studies on suppressiveness to *Radopholus similis* of three soils (suppressive, moderately suppressive and non-suppressive), cultivated with plantain in Sixaola, Costa Rica were conducted as part of this research. The direct method employed for suppressiveness measurement showed reductions of up to 94% of *R. similis* populations present in the root system of suppressive soils compared to non-suppressive. However, no differences were found between moderate and non-suppressive soils. This behavior was consistent through the four samplings conducted. On the other hand, the indirect method utilized for suppressiveness measurement reconfirmed the suppressive potential of suppressive soils. There were reductions of up to 56% on *R. similis* extractions from suppressive soils compared to non-suppressive. Nevertheless, no differences were detected between moderate and non-suppressive soils for the four consecutive experiments conducted. Root system health measured in percentages of functional roots was superior for suppressive soils than for non-suppressive, varying from 71 to 91% for suppressive soils and only 47 to 62% for non-suppressive.

Studies to determine populations of endophytic fungi in plantain root systems showed that 62 isolates were recovered from suppressive soils and only 33 from non suppressive. 15 isolates from suppressive soils were selected to study their antagonist activity on *R. similis* under *in vitro* conditions. *Parasitism* percentage of *R. similis* ranged between 3 and 78% for endophytic fungi under evaluation. Mortality percentages of *R. similis*, caused by secondary metabolites 24 hours after exposition of the nematode to the metabolic suspension of endophytic fungi, ranged between 10 and 98%. The best four endophytic isolates, two from *Fusarium* S19 and S7 and two from *Trichoderma* S10 and S2, were selected as the best *in vitro* bio-controllers and included for evaluation under greenhouse conditions, jointly with two endophytic isolates of antagonist activity known as *Fusarium* T5 and *Trichoderma* T12 from suppressive soils of Guatemala.

Results from the bioassays demonstrated that plants protected with endophytic fungi showed reductions of up to 88 and 86% regarding *R. similis* final population found in the root system of plantain and banana respectively, compared to check plants. *Fusarium* S9 and *Trichoderma* S10 were the best *R. similis* bio-controllers, both for banana and plantain, surpassing antagonistic activity isolates known as *Fusarium* T5 and *Trichoderma* T12 from suppressive soils of Guatemala. On the other side, reductions of up to 89 and 88% in *R. similis* final population were found in plant soils of protected plantain and banana, respectively, compared to control plants. Furthermore, the bio-control effect of *Fusarium* S9 and *Trichoderma* T12 isolates had an effect on growth promotion of the root and foliar system of protected plants of plantain and banana. Studies aimed at obtaining a better knowledge of these fungi bio-control mechanisms and bio-control evaluations under field conditions should be a priority for future research.

1. INTRODUCCIÓN

Jones y Diekmann (2000) señalan que el banano es cultivado en más de 120 países en los trópicos y subtropicos y constituye una de las principales fuentes de ingreso en las economías de muchos de esos países. Asimismo, el banano y el plátano es el cuarto cultivo más importante del mundo, después del arroz, el trigo y el maíz, además de ser considerado un producto básico y de exportación, constituyendo una importante fuente de empleo e ingresos en numerosos países en desarrollo. Los países latinoamericanos y del Caribe producen el grueso de los plátanos que entran en el comercio internacional, unos 10 millones de toneladas, del total mundial de 12 millones de toneladas.

Aunque las exportaciones de bananos no “Cavendish” representan hoy en día solo mercados “nicho”, es innegable que el mercado Europeo se abre poco a poco a estos otros tipos de bananos (Lescot 2000).

En América tropical los clones de los grupos AAB y ABB son de importancia especial, pues los plátanos o bananos de cocción constituyen un elemento corriente en la alimentación local. Al contrario de los bananos del grupo AAA, los plátanos tienen muchos usos menores, entre ellos su empleo como forrajeras y como plantas de sombra en cafetales y cacaotales (León 2000).

La producción de banano y plátano afronta problemas de mercado por su sobreoferta. Esto induce a que la mayor parte del año, las exigencias de sanidad de la fruta, longitud, grosor y grado de maduración sean incrementados para equilibrar la sobreoferta con la demanda. Adicionalmente a estos problemas de mercado, existen factores bióticos que limitan su producción. Después de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*), el daño causado por los nematodos, es el factor en importancia en reducir los rendimientos (Araya 2003).

Está completamente establecido que los fitonematodos son la plaga más importante que ataca al sistema radical del cultivo de plátano en los trópicos y subtropicos (Bridge 1993; Gowen 1995; Davide 1996; Sarah *et al* 1996). El control convencional de los nematodos en plantaciones comerciales de plátano consiste en dos a tres

aplicaciones de nematicidas por ciclo del cultivo. Este método de control es poco eficiente y altamente costoso para los pequeños y medianos productores. Además extermina los agentes biológicos de control de los nematodos presentes en el suelo Pocasangre (2002). Triviño (2003) señala que actualmente en Ecuador existe la tendencia de manejar las plantaciones solamente con productos no químicos, sin embargo, debido a las altas densidades poblacionales de *R. similis* en muchas plantaciones, habrá la necesidad de continuar utilizando los nematicidas en plantaciones con poblaciones más severas. Moens *et al.* (2003) experimentalmente comprobaron que la rotación racional de nematicidas, aunque no controló muy eficientemente los nematodos, produjo los racimos más pesados y un alto porcentaje de raíces funcionales.

El nematodo barrenador *Radopholus similis* es la especie de nematodo más importante en la producción de bananos y plátanos en América Central, África Occidental y Australia (Pinochet 1986, Sarah 1989, Schipke y Ramsey 1994). Pérdidas económicas que oscilan entre 30 a 50% han sido reportadas en Costa Rica y Panamá (Davide 1996). Actualmente, el nematodo barrenador es controlado por medio de prácticas culturales, nematicidas químicos (órganofosforados y carbamatos) y con el cultivo de variedades resistentes especialmente en banano (Marín *et al.* 1999; Marín 2003). Asimismo, los nematicidas son utilizados en gran escala, a pesar de los problemas ambientales que estos conllevan, tales como problemas en la salud humana y animal (Pocasangre *et al.* 2001). Nematicidas efectivos como DBCP (dibromocloropropano) y EDP (bromuro de etileno) se ha comercializado a pesar de sus efectos dañinos para la salud humana y el ambiente.

Los nematodos parasíticos de plantas tienen muchos enemigos naturales en el suelo y desde hace tiempo se ha estado dirigiendo estudios sobre posibles controles biológicos. Los primeros antagonistas considerados fueron los hongos tramperos (*Arthrobotrys*, *Dactyllela*, *Dactylaria*, etc.). Sin embargo, es muy difícil de producir en masa y, además, su eficiencia está ligada a características de suelo muy estrictas (pH, materia orgánica, microflora y microfauna del suelo). Los diversos esfuerzos industriales intentados no fueron exitosos (Sarah 1998).

El método biológico con el incremento de antagonistas tales como los hongos micorrizicos, nematófagos y endofíticos nativos o introducidos, bacterias y otros depredadores naturales en combinación con fertilizantes orgánicos (compost, humus, vermicompost) representan una alternativa muy apreciable para la obtención de un banano o plátano ambientalmente “amistoso” (González y Fernández 2003).

El control biológico del nematodo *R. similis* mediante hongos endofíticos ha sido reportado en banano. Reducciones en la tasa de reproducción de *R. similis* de hasta 90% han sido encontradas en condiciones de invernadero (Pocasangre 2000). El mismo autor reporta una amplia diversidad de hongos endofíticos presentes en fincas comerciales de banano en Guatemala, encontrando un total de 132 aislados endofíticos en tres fincas comerciales de banano: El Real, Maya y Creek, con suelos supresivos al nematodo barrenador *R. similis*, cepas no patogénicas de *Fusarium* y *Trichoderma* fueron las predominantes (Pocasangre *et al* 2000). Actualmente estudios sobre antibiosis y parasitismo del nematodo son realizados para conocer los mecanismos del biocontrol de *R. similis* de estos hongos endofíticos (Zum Felde *et al* 2002).

Pocasangre (2003) señala que recientes investigaciones sobre poblaciones de hongos endofíticos presentes en tejidos internos de raíces de banano y plátano demuestran que el 10% de los hongos endofíticos colectados presentan una alta actividad antagonista sobre el nematodo barrenador *Radopholus similis*. Además, puntualiza que, plantas protegidas con estos hongos han presentado un incremento en el peso radical y foliar en comparación con plantas no protegidas.

Estudios preliminares realizados con la colaboración de INIBAP, CORBANA y el Ministerio de Agricultura (MAG) en la zona atlántica de Costa Rica han demostrado la presencia de suelos con un gradiente de supresividad al nematodo barrenador *R. similis* en el cultivo de plátano. En suelos no supresivos la población de nematodos por 100 gramos de raíces alcanzan hasta 40,000 individuos, en suelos medianamente supresivos 6,800 y en suelos supresivos no se encontraron nematodos. El control natural de los nematodos en estos suelos posiblemente se debe a la actividad de las poblaciones de antagonistas presentes en estos suelos. Consecuentemente el aislamiento y caracterización de estas poblaciones es de importancia para su posible

uso como agentes biocontroladores o inductores de resistencia al ataque del nematodo. Actualmente, en plátano existe una alta demanda de material de siembra, debido al uso de altas densidades de siembra (2500 a 4000 plantas /ha.) en un sistema de cultivo anual o bianual de plátano. Las plantas propagadas *in vitro* o “vitroplantas” son fuente de semilla sana, libre de bacterias, hongos y nematodos en comparación con la propagación convencional (Sandoval 1998). Sin embargo, vitroplantas en condiciones de campo son más susceptibles al ataque de mal de Panamá y nematodos. La protección de material de siembra con hongos endofíticos podría dar una resistencia al ataque de nematodos en campo. Consecuentemente, la presente investigación pretende estudiar la incidencia natural de los hongos endofíticos que se encuentran asociados a la rizosfera del cultivo de plátano en suelos supresivos al nematodo *R. similis* de Talamanca en Costa Rica, y determinar el potencial antagonista de estos hongos sobre la tasa de reproducción del nematodo *R. similis*, en vitroplantas y rebrotes inoculados del cultivar de plátano “falso cuerno” (*Musa* AAB).

1.2.Objetivos

1.2.1.Objetivo general:

Estudiar las poblaciones naturales de hongos endofíticos de suelos supresivos a *Radopholus similis* en el cultivo de plátano para su potencial uso como agentes biológicos de control de nematodos y como promotores de crecimiento de vitroplantas y rebrotes.

1.2.2.Objetivos específicos:

- a) Comprobar la supresividad de los suelos mediante análisis de la dinámica de poblaciones de nematodos en plantaciones de plátano de Talamanca.
- b) Aislamiento y caracterización de poblaciones de hongos endofíticos provenientes de la rizosfera de plátano de suelos supresivos, medianamente supresivos y no supresivos.
- c) Realizar un estudio de la actividad antagonista de los hongos endofíticos al nematodo *R. similis* en bioensayos a nivel *in vitro* y de invernadero.
- d) Determinar el efecto de los hongos endofíticos elite en la promoción de crecimiento de vitroplantas y rebrotes de plátano, a nivel *in vivo*.

1.3. Hipótesis:

Existen diferencias significativas entre poblaciones de nematodos que crecen en suelos supresivos y en suelos no supresivos.

En la rizosfera de plantas provenientes de suelos supresivos existe mayor cantidad de hongos endofíticos que en la rizosfera de suelos no supresivos.

Existen diferentes grados de actividad antagonista de los hongos endofíticos sobre el nematodo barrenador *R. similis*.

Hongos endofíticos de suelos supresivos confieren a la planta una resistencia al ataque de nematodos, promueven el crecimiento radical y foliar de plantas, y protegen el material de siembra de plátano provenientes de retoños y vitroplantas.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. El plátano: origen y botánica

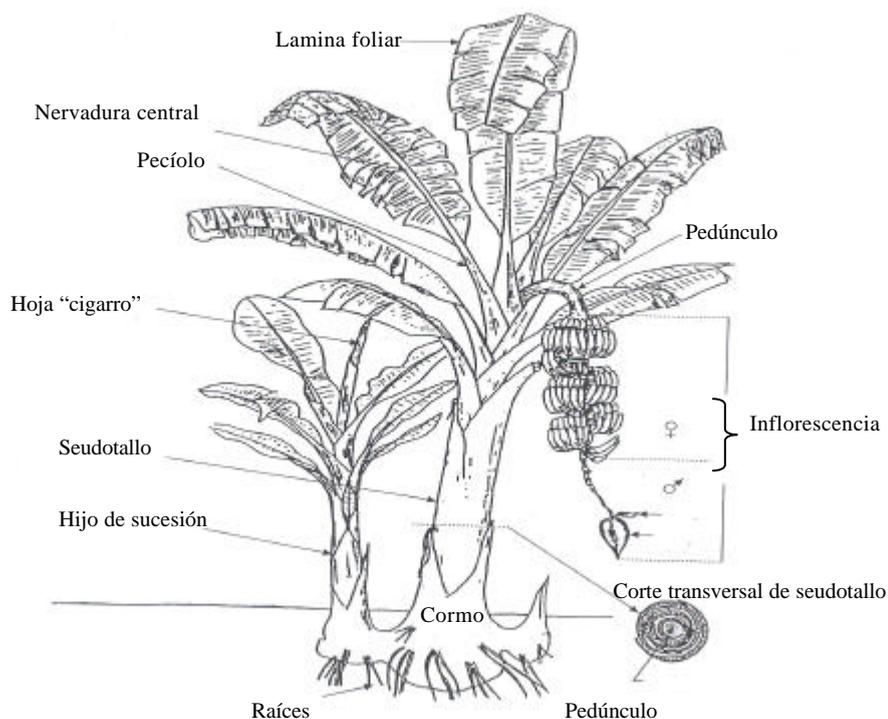


Figura 1. Representación diagramática de una planta de plátano con hijo de sucesión. Tomado de Champion 1963.

Araya (2000) señala que, las musáceas tienen su origen en el Asia Sudoriental. La *Musa acuminata* tuvo su origen en la península de Malasia o islas cercanas, de donde fue llevada a otros lugares como las Filipinas y la India, donde se mezcló con ejemplares de *Musa balbisiana* dando origen a grupos híbridos de los cuales se derivan los plátanos y guineos. Prácticamente desconocidas en América aún a finales del siglo pasado, eran consideradas frutas exóticas. El primero y decisivo paso en la evolución del plátano comestible fue el origen de la partenocarpia y desaparición de la semilla de la *Musa acuminata*.

Los cambios posteriores se basaron en la hibridación de *M. acuminata* con *M. balbisiana* y la aparición de caracteres triploides y tetraploides entre los productos.

Así, los plátanos AB, AAB, y ABB son característicos de la India y parece existir un segundo centro de diversificación de los tipos AAB y ABB en las Filipinas. Esto pareciera indicar que en estos países los grupos híbridos se originaron mediante cruzamientos de la *Musa balbisiana* local con linajes comestibles de *Musa acuminata* traídos de fuera. Esto indica una migración hacia el exterior de las formas comestibles de *Musa acuminata* desde un centro, en alguna parte de Malasia, acompañada de hibridación y de la aparición de caracteres poliploides.

El plátano fue llevado a las Islas Canarias por los portugueses poco después de 1402 y de ahí pasó al Nuevo Mundo, iniciándose en 1516 una serie de introducciones de este cultivo. La posibilidad de la presencia precolombina del plátano en América ha sido sugerida, pero no se tienen pruebas directas de ello. Linneo basó sus estudios en las especies *Musa paradisiaca* y *Musa sapientum* que corresponden a una variedad de Curraré el primero y a una variedad de Dominico el segundo, que existían en las Antillas en el Siglo XVII. Los bananos son una introducción más reciente hecha a principios del Siglo XIX y que marcó el inicio del imperio bananero de la United Fruit Co.

León (2000) señala que los plátanos y bananos fueron introducidos después de la conquista; Fray Tomás de Berlanga trajo las primeras cepas a Santo Domingo hacia 1516. Su aceptación por los indígenas fue inmediata y llevó a una dispersión tan rápida que su cultivo iba delante de los conquistadores, lo que dio base a la creencia que los bananos eran oriundos de América. Puede indicarse a propósito que restos fósiles, semillas y frutas son conocidas de Colombia y otros países. Aunque esto sea prueba irrefutable de que estas plantas crecieron en América en épocas geológicas pasadas, no prueba que los bananos actuales sean de origen americano.

El cultivo del banano en los trópicos de América para la exportación a Estados Unidos y Europa ha sido mucho más intenso e importante que la producción en su área de origen. Es en América tropical también donde se ha avanzado más en el conocimiento de la genética y la fisiología del banano, así como en su producción comercial.

Las *Musáceas* son hierbas gigantes. De los tallos subterráneos brotanseudotallos aéreos, formados por las bases envolventes de las hojas, por cuyo centro crecen los ejes florales.

El tallo subterráneo se compone de cormos o rizomas cortos de crecimiento apical. El primer corno desarrolla unseudotallo aéreo y un eje floral y subterráneamente una o más yemas, que a su vez se desarrollan en cormos. La planta crece así en sentido longitudinal o radial, de modo que en torno al primerseudotallo hay varios menores, chupones, hijos o brotes de diversas formas y edades. Uno o más de ellos producirán flores cuando el primer tallo se seque y desintegre; otros se mantendrán sin desarrollar y son los “hijos de agua”, que se eliminan en el cultivo. Estos chupones se diferencian por el follaje; los que producen frutos llevan hojas angostas al principio, de láminas muy reducidas y luego hojas normales y racimos florales.

El corno es el tallo subterráneo es una estructura cónica o asimétrica, con el eje central curvo y doblado hacia arriba, formado por muchos entrenudos cortos. De los nudos brotan raíces, en grupos de tres o cuatro. En la parte apical del corno aparecen las hojas, que forman al principio un cono sólido. Nacen de una zona meristemática, la única activa en el tallo, situadas en la parte superior y en la que se desarrollan muchas hojas y el escapo floral. La superficie del corno está cubierta, en estado joven, por la epidermis, que es reemplazada conforme se desarrolla la planta por capas corchosas corticales. Las raíces en un corno bien desarrollado, la mayoría sale de la parte superior, debajo de la inserción de las hojas, y disminuye en número hacia la parte inferior.

Las raíces superiores se extienden en sentido horizontal hasta cinco metros de la planta; las inferiores pueden penetrar hasta 1.5 m de profundidad. Las raíces principales se ramifican en secundarias y éstas llevan en los extremos los pelos absorbentes. La zona principal de raíces absorbentes se localiza en el suelo, de 10 a 15 cm de profundidad, en un radio de unos 25 cm o más delseudotallo. Las raíces se originan generalmente en grupos de cuatro; son blancas y cilíndricas en sus primeras etapas. Al avanzar en edad son reemplazadas por tejidos suberizados más profundos.

Elseudotallo es la parte aérea de la planta, formado por las vainas envolventes de las hojas. El verdadero tallo aéreo, que se eleva del corno, termina en la inflorescencia. Ocupa una porción menor del volumen delseudotallo y depende de éste para su

soporte. En un corte transversal el seudotallo muestra la disposición de las vainas foliares, que aparecen como medias lunas compactas, con sus bordes finos ajustados firmemente a las vainas vecinas. La forma y el tamaño del seudotallo varía según el cultivar: es ligeramente cónico, casi cilíndrico y alcanza hasta cinco metros de altura en “Gros Michel”; corto, grueso y marcadamente cónico en “Cavendish enano”.

El tallo floral unos 8 a 12 meses después de la siembra, según el cultivar aparece externamente la inflorescencia al final del tallo floral, órgano que se forma en el ápice del cormo cuando éste ha producido ya una veintena de hoja adultas, se abre paso por el centro del seudotallo y al crecer hacia arriba desarrolla un escapo floral cilíndrico, grueso, de 5 a 9 cm de diámetro, blanco y con nudos de los que salen unas 15 hojas. Tan pronto deja de tener el sostén del seudotallo se inclina hacia abajo por el peso de la inflorescencia.

Las hojas de las musáceas se forman de cuatro partes: vaina, pecíolo, lámina y apéndice, cuyo desarrollo varía según la edad, orden de aparición de la hoja y ciclo de vida de la planta. En las primeras hojas, se observa en los brotes o hijos, la vaina es la parte más extensa; el pecíolo es reducido y la lámina una superficie angosta a ambos lados del nervio central, que termina en un apéndice largo y bien desarrollado. Una hoja desarrollada en la planta adulta, en cambio, tiene la vaina larga y envolvente, que forma parte del seudotallo; el pecíolo es largo y semicilíndrico; la lámina puede alcanzar hasta 4 m de largo por 0.5 m de ancho, es una de las superficies fotosintéticas más grande que se conoce. Su forma general es ovada-oblonga, con el ápice obtuso y un lado ligeramente mayor que el otro.

El apéndice es una prolongación del nervio central de la lámina. Este órgano permite a la hoja nueva abrirse paso por el seudotallo, pues es cónico y de punta muy delgada. Una vez que la lámina está fuera se marchita y cae rápidamente.

El eje de la inflorescencia es la continuación del escapo (León 2000). La inflorescencia puede ser péndula, semipéndula o erecta, con bracteadas, generalmente decíduas, de superficie lisa o surcada, convoluta o más o menos imbricada en la bellota. Los cojines o nódulos florales compuestos por una o dos líneas de flores femeninas o hermafroditas en la parte basal y masculinas en la distal. El perianto está formado por dos tépalos, uno ellos tubular con cinco lóbulos dentados en el ápice, dos de los cuales aparecen intercalados entre los otros tres y el segundo tépalo libre en

forma de quilla y en posición opuesta al primero. Cinco estambres y ocasionalmente un sexto, pero de naturaleza rudimentaria. El ovario es ínfero, trilobular y multiovulado (ICA 1991).

El fruto se desarrolla del ovario de las flores pistiladas por el aumento en volumen de las paredes de las tres celdas del ovario, en particular las opuestas al eje central, que rellena por completo la cavidad de los lóculos. Los óvulos abortan y se ennegrecen y al mismo tiempo los tejidos del pericarpio se engruesan. La parte comestible que resulta del engrosamiento de las paredes del ovario es una masa de parénquima cargada de azúcar y almidón.

El fruto maduro contiene de 12 a 16% de azúcares; en almidón varía de 10 a 18% en los plátanos y alrededor del 6% en los bananos. Es bajo en proteínas, pues no contiene más del 2%; en cambio es rico en vitaminas y minerales. La forma del fruto varía según el cultivar. El color es una característica clonal; predomina el color amarillo. Cultivares: no existe una lista completa de los cultivares de plátanos y banano; sobre los últimos se ha hecho estudios detallados de los cultivados para exportación.

Los plátanos constituyen un grupo menos conocido, aunque en América Latina y África tropical son de mayor importancia en la alimentación local. Los plátanos se originaron de los cruces entre *M. acuminata* y *M. balbisiana*, de los que formulas son AAB o ABB. En el primer grupo AAB se distinguen los que tienen racimos con buen número de frutos pequeños, como “Dominico”, “Maqueño”, “Truncho”, y los que tienen racimos con pocos frutos muy grandes: “Liberal”, “Curraré”, “Hartón”. En el grupo ABB está el clon “Bluggoe”, que recibe en América Latina diferentes nombres: “Mafalo”, “cuatrofilos”, Chamaluco” y “Cachaco”, de frutos medianos que se comen cocinados, verdes o maduros (León 2000).

Además, Vásquez (2003) puntualiza que, las raíces pueden contener inclusiones celulares tales como cristales o metabolitos secundarios. Estos últimos frecuentemente proveen color y pueden presentar autofluorescencia. Las raíces forman conexiones y relaciones con otros organismos, como bacterias y micorrizas para trabajar juntas por el beneficio mutuo.

Belalcázar *et al* (2003) señalan que, todos los órganos que conforman la planta de plátano son importantes y cumplen con una función determinada. Sin embargo, las

raíces y las hojas podrían ser consideradas como los dos órganos más importantes, porque de su comportamiento fisiológico y de su estado fitosanitario, dependen la absorción de agua y elementos nutritivos y la actividad fotosintética, procesos estrechamente relacionados con la producción y rendimiento de un cultivar. Un análisis más detenido, posiblemente nos lleve a considerar que la raíz sea el órgano más importante de una planta de plátano. El color guarda relación con la edad y puede variar de blanco cremoso a pardo amarillento, su consistencia a edad temprana son sumamente frágiles, pero con el tiempo se vuelven más resistentes, pero continúan siendo flexibles. Su grosor y longitud guarda estrecha relación con la estructura y textura del suelo.

2.1.1. Su cultivo y economía

Las exportaciones de banano y plátano ocupan un lugar destacado dentro del conjunto de reglones generadores de divisas de los países productores, y juntos se constituyen en productos básicos de la alimentación de estos pueblos. La intensificación y tecnificación de estos cultivos conlleva a que su protección adquiera cada día mayor importancia, ya que las condiciones ecológicas de las regiones tropicales y subtropicales son ideales para su desarrollo conducen también al incremento de enfermedades y plagas que al encontrar condiciones óptimas los organismos causales pueden llegar a adquirir carácter epidémico incidiendo sobre la economía de las regiones afectadas (Rosero 1987).

Los bananos de cocción y plátanos (*Musa* spp., grupos AAB y ABB) son uno de los principales cultivos amiláceos para la población de países en vías de desarrollo. El plátano se consume como alimento que proporciona energía, y en menor grado como fruta de postre. Se estima que los plátanos y otros tipos de bananos suministran más de 200 calorías (energía alimenticia) por día a unos 60 millones de personas en África (Stover y Simmonds 1987). En América Tropical y el Caribe, el banano tiene un gran significado socioeconómico y nutricional y su exportación genera considerables ingresos y empleos. El banano y el plátano constituyen el cuarto producto alimenticio en importancia a nivel global después del arroz, trigo y maíz, en términos del PIB. Alrededor del 90% de la producción mundial total se consume localmente en los países productores, dejando sólo 10% para la exportación (Dadzie y Orchard 1997).

La producción de bananos y plátano (*Musa spp.*), a pesar de su valor socioeconómico, ha sido afectada por las crecientes presiones de plagas y enfermedades, dentro de los cuales se encuentran los nematodos que afecta al sistema radical (Dochez *et al* 2000).

2.2. Los nematodos y su impacto económico

Viaene y Abawi (1997), Esquivel (1999) y Coyne (1999) señalan que en el reino animal están los nematodos fitoparásitos los cuales forman parte de una voluminosa población de organismos del suelo. Estos organismos vermiformes son redondos en sección transversal, con simetría bilateral, hialinos, no segmentados, pseudocelomados y tripoblastos. Algunas especies tienen dimorfismo sexual y todos tienen un estilete en la parte anterior, que los permite extraer de las células vegetales los nutrimentos. Las órdenes de nematodos fitoparásitos son Aphelenchida, Tylenchida y Dorylaimida. Sin embargo, la mayoría de los nematodos fitoparásitos pertenecen al orden Tylenchida. Los diez géneros más importantes son: *Meloidogyne*, *Pratylenchus*, *Heterodera*, *Ditylenchus*, *Globodera*, *Tylenchulus*, *Xiphinema*, *Radopholus*, *Rotylenchulus* y *Helicotylenchus*. De acuerdo con el hábito de alimentación, están en tres grupos: ectoparásitos, semiendoparásitos y endoparásitos. Causan daños mecánicos al perforar las células, mecánicos destructivos al desplazarse entre los tejidos, enzimáticos al destruir la lámina media, morfológicos y fisiológicos al alterar la forma y fisiología de células y tejidos. Al atacar las raíces, alguno de los síntomas en la parte aérea son: decoloración, poco crecimiento o marchitez. Pueden interactuar con otro tipo de patógenos del suelo, acelerando o incrementando el daño en las plantas hospederas al magnificar el efecto de ambos patógenos. La supervivencia de estos en ausencia del hospedero principalmente puede ocurrir en malezas, residuos de cosecha y suelo. Los nematodos tienen la capacidad de permanecer en estado de anhidrobiosis (permanecer vivos en ausencia de agua), lo cual los hace más resistentes a factores químicos o físicos adversos.

Se ha estimado que en el suelo existe una población de nematodos superior a los 20,000,000 por metro cuadrado. Pero es casi imposible dar un estimado exacto de la población total en el suelo (Sasser y Jenkins 1960).

Solos, o asociados con otros patógenos, los nematodos fitoparásitos pueden ser muy destructores. Las especies de los géneros *Meloidogyne*, *Heterodera*, *Globodera* y *Pratylenchus* dañan los cultivos en muchas partes del mundo, afectando varios cientos de especies de plantas económicamente importantes. *Radopholus similis*, llamado comúnmente “nematodo barrenador”, tiene alrededor de 950 especies vegetales como hospederos (incluyendo banana, cítricos, caña azucarera, café y maíz); al actuar solo produce la muerte progresiva de los cítricos y la enfermedad llamada “puntas negras” (“black head toppling”) en bananos. Acentúa el desarrollo de la marchitez o enfermedad de Panamá, provocada por *Fusarium oxysporum* var. *cubense*. La producción de bananos puede disminuir de 73 t/ha a 30 t/ha por año; en naranjos y pomelos la producción se puede reducir en 70 a 80%. *R. similis* es también la causa del “amarillamiento” del pimentero (*Piper nigrum*) de la Isla de Bangka (Indonesia), que redujo el número de árboles en un periodo aproximado de 20 años de 22 millones a 2 millones (1 millón de árboles por año). Las extensas lesiones y cavidades que este nematodo provoca en raíces y cormos conduce a interacciones complejas con *Fusarium*, *Sclerotium* y otras especies de la microflora del suelo (Williams y Bridge 1985).

Los nematodos fitopatógenos de las raíces interfieren en la absorción del agua, nutrientes, traslocación de minerales y el soporte físico de las plantas. Por lo que intervienen en el balance nutricional de las plantas, lo que puede resultar en varios síntomas de deficiencia de acuerdo a las características químicas y físicas del suelo, disponibilidad de nutrientes, la parte de la planta involucrada, la especie del hospedante y el nematodo mismo (Jenkins y Taylor 1967)

En banano y plátano, un total de 19 géneros de nematodos han sido asociados con daños a su sistema radical y al corno, dentro de los cuales los cinco más importantes son: *Radopholus similis*, *Pratylenchus coffeae*, *Heliocotylenchus multicinctus*, *Meloidogyne* spp. y *Rotylenchus reniformis*. Dentro de estos *Radopholus similis* es el de mayor importancia económica en la producción de plátano. En razón de que los rendimientos de las plantaciones por lo general comienzan a declinar a partir de la segunda generación, por la destrucción del sistema radical, causado por el nematodo (Rodríguez *et al* 1985). En estudios realizados por Román (1978) se informa que *R. similis* es el organismo causal de la enfermedad conocida como “cabeza negra”. Es

una enfermedad que se caracteriza por el ennegrecimiento y deterioro de las raíces y del cormo, lo cual hace que la planta pierda anclaje y se vuelque totalmente. Hutton *et al* (1980) reportan que en Jamaica las pérdidas por el ataque del nematodo son alrededor de un 30%, por lo que considera un factor limitante para el crecimiento, vigor, estabilidad, producción y longevidad del cultivo del plátano.

Araya (2003) señala que lo común es encontrar comunidades poliespecíficas, compuestas por los endoparásitos migratorios *Radopholus similis* y *Pratylenchus coffeae*, el ecto-endoparásito *Helicotylenchus multicinctus* o *H. dyhisteria*, y el endoparásito sedentario *Meloidogyne incógnita* o *M. javanica*. Se establece que la importancia económica es en orden decreciente como sigue: *R. similis* > *Helicotylenchus* spp. > *Meloidogyne* spp. > *Pratylenchus* spp. Por otra parte, *Radopholus similis* es en la mayoría de los países el más abundante, constituyendo más del 70% de la población de nematodos en las raíces. Altas poblaciones de *R. similis* se encuentran en todos los meses del año y zonas productoras de cada país. Los cuatro géneros penetran, se desarrollan y completan su ciclo de vida dentro de las raíces del plátano y banano.

El daño que causan los nematodos se localiza en las raíces y el cormo. Estos penetran las raíces especialmente cerca de la caliptra, pero cualquier parte puede ser invadida. Nematodos adultos y juveniles ocupan una posición intercelular en el parénquima y emigran a través de las células corticales causando lesiones. Las lesiones son rojizas al principio, luego se tornan cafés o negras. En altas infecciones las cavidades pueden extenderse hasta el cilindro vascular de la raíz. En plantaciones infectadas con deficiente control, las pérdidas en rendimiento llegan hasta un 30 – 50%. Las plantas infectadas tienen un anclaje muy pobre resultado del deterioro del sistema radical. La habilidad para absorber agua y nutrientes se reduce, lo que conlleva a la pérdida de peso en los racimos, la duración de los ciclos entre cosechas se alargan y la longevidad de la unidad de producción se reduce.

Todos los estados fenológicos de los cultivares comerciales de plátano y banano son susceptibles a los cuatro géneros de nematodo, pero en condiciones tropicales, *R. similis* es el más frecuente y más abundante en cualquier estado de la planta. Aún los hijos muy pequeños de tan sólo 10 cm de altura pueden ser infectados en sus raíces y

en el caso de *R. similis* es común encontrarlo en los cormos. Por tanto, se sugiere que la infección por *R. similis* ocurre tanto de nematodos procedentes del corno que pasa de la planta madre a las yemas, y de nematodos procedentes del suelo. A la fecha no se dispone de materiales de *Musa* con resistencia para uso comercial.

Sarah *et al* (1996) indica que *R. similis* es un nematodo endoparásito migratorio que completa su ciclo de vida en 20-25 días en los tejidos de la raíz y el corno. Las hembras juveniles y adultas tienen formas móviles que pueden dejar la raíz en caso de condiciones adversas. Los estadios larvales en el suelo pueden fácilmente invadir raíces sanas. La penetración de los nematodos ocurre de preferencia cerca del ápice radical, pero *R. similis* puede invadir cualquier porción de la raíz (Rosero 1987). Al migrar inter- e intracelularmente, se alimenta del citoplasma y células del parénquima cortical, causando la destrucción de estos tejidos; lo que limita la absorción de agua y nutrientes lo cual resulta en la reducción del desarrollo y crecimiento de la planta, además, pérdidas en el peso del racimo e incremento significativo en el período entre dos cosechas sucesivas. Más aún, esta destrucción de las raíces resulta en una tendencia de la planta a desraizarse o volcarse, sobretodo durante vientos y lluvias fuertes, lo que causa severas pérdidas económicas (Gowen y Quénéhervé 1990; Fogain y Gowen 1997; Pocasangre *et al* 2000; Pocasangre 2002).

2.3. Dinámicas poblacionales de nematodos parásitos en plátano

Figuroa (1998) estudió cuatro géneros de nematodos parásitos de plátano en la zona de Matina (Limón-Costa Rica): *Pratylenchus*, *Meloidogyne*, *Helicotylenchus* y *Radopholus*, mostrando la prevalencia de este último, cuya población en 100 gramos de muestra de raíz fresca se incrementó el primer año de 12.167 a 20.421 individuos en dos años.

En tanto que Rosero (1987) señala que cuando los dos géneros de nematodos, *Radopholus* y *Pratylenchus* parasitan en conjunto el plátano, inducen daños devastadores en el sistema radical y provocando el volcamiento de las plantas. Además, Fraga (1978) señala que cuando las poblaciones de *Radopholus* y *Pratylenchus* actúan barrenando las raíces de banano y plátano, disminuye la

población de *Meloidogyne*, mientras que las especies de *Helicotylenchus* se mantienen estables en presencia de esos géneros de nematodos.

2.4. Control Biológico

Hanson y Hilje (1993) definen el control biológico como la regulación de la población de un organismo por medio de otro, y parte del principio de que en la naturaleza todo organismo tiene uno o más antagonistas que lo eliminan o compiten con él. El antagonismo microbial es una importante fuerza contra las enfermedades ya que una supresión general de los organismos causantes de enfermedades es proporcionada por la flora nativa del suelo. Los nematodos fitoparásitos coexisten en la rizosfera con muchos otros organismos de los cuales se han aislado e identificado muchos enemigos naturales de los nematodos y algún grado de control biológico natural ocurren en los agroecosistemas.

Williams y Bridge (1985) mencionan que las medidas de control de nematodos fitopatógenos más importantes, a parte de las inspecciones preventivas y cuarentenarias, son: el tratamiento térmico calor seco y vapor de agua al suelo; el tratamiento con agua caliente para bulbos florales, estolones, tubérculos, rizomas, estacas y cormos de las musáceas; el tratamiento químico, con varios nematicidas fumigantes de amplio espectro, los cuales se usan intensamente; rotación cultural, usando plantas no hospederas o cultivares resistentes, cuando se encuentran disponibles; métodos biológicos usando como agentes varios microorganismos; y programas de control integrado, combinando algunas o todas las opciones mencionadas.

Fraga (1978) señala que en el suelo viven habitualmente hongos, bacterias, protozoos, esporozoarios, oligoquetos, ácaros, colémbolos y nematodos (*Dorylaimoidea*, *Mermithoidea*, *Mononchidae*, *Tripylidae*, *Aphelenchoididae* etc.) que son depredadores o parásitos de nematodos y que actúan normalmente en el suelo. La roturación excesiva del suelo y los tratamientos químicos del suelo destruyen estas poblaciones de agentes biocontroladores.

La primera evidencia del control biológico de nematodos se presentó cuando se aplicó formaldehído al suelo para controlar enfermedades de raíces. Se vio un aumento dramático del nematodo del quiste de cereales, *Heterodera avenae*, debido a la supresión por el formaldehído de hongos que limitaban al nematodo. Desde entonces, los conocimientos con relación al uso de enemigos naturales en el control de fitonematodos se basaron principalmente en observaciones en vez de estudios científicos. Por eso, el control biológico de fitonematodos es un campo abierto a la investigación y potencialmente daría resultados de gran valor práctico.

Sarah (1998) señala que los nematodos parásitos de las plantas tienen muchos enemigos naturales en el suelo y desde hace tiempo se ha estado dirigiendo estudios sobre posibles controles biológicos. Los primeros antagonistas considerados fueron los hongos tramperos (*Arthrobotrys*, *Dactyllela*, *Dactylaria*, etc...). Sin embargo, eran muy difíciles de producir en masa y, además, su eficiencia estaba ligada a características de suelo muy estrictas (pH, materia orgánica, microflora y micro fauna del suelo...). Los diversos esfuerzos industriales intentados no fueron exitosos. Muchos de los programas de investigación actuales conciernen a la bacteria *Pasteuria penetrans*. Sin embargo, las relaciones entre cepas de bacterias y especies de nematodos e incluso biotipos parecían ser altamente específicas. En consecuencia, no es probable que se presente una solución aplicable en los años venideros. Recientemente se desarrolló la fórmula industrial de un hongo parasítico, *Paecilomyces lilacinus*, que parasita huevos, nematodos jóvenes y adultos, y aparentemente están obteniendo resultados prometedores en Filipinas.

González y Fernández (2003), sugieren que el método biológico con el incremento de antagonistas tales como hongos micorrízicos, nematófagos y endofíticos nativos o introducidos, bacterias y otros depredadores naturales en combinación con fertilizantes orgánicos (compost, humus, vermicompost) representan una alternativa muy apreciable para la obtención de un plátano y/o banano ambientalmente “amistoso”.

En el control biológico es bien conocido que la dinámica poblacional tanto de plagas como de agentes de biocontrol y su respuesta a las variables medio ambientales es esencial (Frison, 1998). Por otra parte, Kashajja, Fogain y Speijer (1998) señalan que

los abonos orgánicos contribuyen a reducir la población de nematodos indirectamente al incrementar los agentes biológicos de control. Así también, la incorporación de plantas con acción nematicida (*Thitonia diversiflora*, *Azadirachta indica*, *Chromoleana odorata*) en el suelo a razón de 30 t/ha, esta bajo investigación para su posible control de *R. similis*. Es bien conocido que hongos antagonistas: *Arthrobotrys* spp. y *Paecilomyces pilacinus* y la rizobacteria (*Pseudomonas* spp.) son potencial agentes de control de nematodos. Tales microorganismos necesitan ser estudiados bajo varios agrosistemas para contribuir a la reducción del daño de los nematodos.

Cazorla (2003) puntualiza que, para exhibir efectos supresivos sobre una enfermedad en una planta, un agente de biocontrol necesita distribuirse por toda la raíz, multiplicarse y sobrevivir durante varias semanas en competencia con otros microorganismos procedentes de la microbiota indígena. Además de la microbiota indígena, otros factores pueden influir en la colonización de la raíz: i) las características del antagonista introducido, como las propiedades de su superficie celular, producción de sideróforos o antibióticos, pilis, flagelos o quimiotaxis por los exudados radiculares; ii) la especie, cultivar y fase del crecimiento de la planta hospedadora; y iii) las características físicas y químicas del suelo, como humedad, temperatura, pH, textura del suelo y nutrientes minerales.

2.5. Hongos endofíticos

Son hongos que colonizan los tejidos u órganos internos de una planta sin causar ningún tipo de síntomas. Cuando la colonización de los tejidos le confiere una protección a la planta hospedera contra el ataque de agentes bióticos y abióticos se denominan hongos endofíticos mutualistas (Carroll 1990; Latch 1993).

La mayoría de hongos endofíticos son ascomicetos y están presentes en gran parte de su ciclo de vida dentro del tejido de la planta. Estos pueden brindar dos tipos de beneficios a las plantas: pueden alterar la fisiología de las plantas llevándolas a aumentar su crecimiento y pueden además incrementar la resistencia al estrés causado por factores abióticos (Pocasangre *et al* 2000; Pocasangre 2001).

Recientemente, se ha dado más atención al uso de hongos endofíticos como agentes de control biológico en nematodos fitoparásitos en otros cultivos (Hallmann y Sikora 1994,1996). Pocasangre (2000), sugiere que, el potencial antagonista de los hongos endofíticos puede ser manejado en combinación con otras técnicas del Manejo Integrado de Plagas (MIP), para el control biológico de enfermedades del suelo así como nematodos fitoparásitos en los sistemas de producción agrícola.

Los hongos que ocasionan síntomas visibles en una planta enferma son identificados como un patógeno, a pesar que estos hongos penetran el tejido del hospedero y existen endofíticamente. Por lo cual, es necesario diferenciar que los hongos endofíticos son los que causan infecciones aparentemente asintomáticas. Los hongos endofíticos son mutualistas sí: no causan síntomas de enfermedad en la planta hospedera, son transmitidos a través de la semilla, es ampliamente disperso a través de los tejidos del hospedero, producen metabolitos secundarios como antibiosis o de naturaleza tóxica (Clay *et al* 1988).

Pocasangre (2003), menciona que, recientes investigaciones sobre poblaciones de hongos endofíticos presentes en tejidos internos de raíces de plátano y banano demuestran que el 10% de los hongos endofíticos colectados presentan una alta actividad antagonista sobre el nematodo barrenador *Radopholus similis*. Reducciones de hasta 90% en la población final de *R. similis* en el sistema radical de plantas protegidas con hongos endofíticos han sido reportadas. Adicionalmente al biocontrol de nematodos, plantas protegidas con estos hongos han presentado un incremento en el peso radical y foliar, en comparación con plantas no protegidas. Estos hongos endofíticos tienen la capacidad de crecer en medios artificiales de crecimiento produciendo una alta cantidad de inóculo disponible para inocular y recolonizar tejidos y órganos internos de las raíces de las plantas.

El uso potencial de estos aislados endofíticos en sistemas de producción comercial de plátano y banano, puede realizarse en cuatro estrategias de manejo de fitonematodos:

- 1) El mejoramiento biológico de vitroplantas, que consiste en la protección temprana de estas con hongos endofíticos efectivos, con el objeto de reducir al menos las primeras aplicaciones de nematicidas al momento de la siembra,
- 2) La renovación anual de plantaciones usando material de siembra protegidos con hongos endofíticos.

Mediante esta práctica no solamente se plantaría material de siembra protegido, sino que también se rompería el ciclo reproductivo del nematodo con la renovación anual, 3) Siembras anuales con altas densidades de siembra con material protegido, que también permitiría romper el ciclo reproductivo del nematodo y aumentar los rendimientos por hectárea, 4) Protección de microcormos de 100 – 200 g de peso en bolsas plásticas, lo cual permitiría desarrollar una planta protegida antes de la siembra definitiva en el campo.

Estas cuatro estrategias de manejo de nematodos se basan en la protección temprana del material de siembra con biocontroladores de nematodos, lo cual tiene una aplicación práctica inmediata, debido a que la mayoría de las plantaciones de banano son sembradas con vitroplantas que es el material idóneo para realizar la protección temprana. Estudios tendientes a conocer la eficacia y durabilidad del biocontrol en condiciones de campo tienen que ser realizados antes de emprender escalonados comerciales de estos biocontroladores.

Niere, *et al* (1998) mencionan que, hongos endofíticos sé a creído son potencialmente efectivos agentes de control biológico para el manejo de nematodos parásitos de las plantas. Muchos hongos se han descrito asociados con lesiones de nematodos en las raíces de los bananos que en su mayor parte incrementan la severidad de la enfermedad. No obstante, se ha visto algunos hongos que colonizan los tejidos de las raíces de los bananos son inhibidores de endoparásitos migratorios. Hongos de raíces sanas han sido aislados y probados previamente su habilidad controladora de nematodos a nivel *in vitro* usando cultivos filtrados.

2.5.1. Actividad antagonista de los hongos endofíticos

Sikora (1992) define el termino “antagonista” como un conjunto de microorganismos, que actúan como parásitos, predadores, competidores que repelen, inhiben o matan a los nematodos parásitos de las plantas, insectos y hongos. El más exitoso antagonista usado para el control biológico de nematodos fitoparásitos es: rizobacterias promotoras de sanidad de las plantas, hongos predadores o atrapadores de huevos de parásitos, hongos endomycorrhizas y hongos endofíticos. Similarmente el control biológico de las enfermedades del suelo, naturalmente ocurre por antagonistas como

rhizobacterias, raza de *Fusarium oxysporum* no patogénico y hongos endofíticos que han sido bien documentados. A continuación una corta descripción de las más importantes actividades antagonistas de los hongos endofíticos.

Organismos con efectos antagonistas sobre los fitonematodos están presentes en algunos grupos: Bacterias, hongos, protozoarios, nematodos, anélidos y artrópodos. Ellos son parte de la flora y fauna natural y abundan en muchos suelos.

Rivera (1999) señala que, los mecanismos de interacción antagónica establecidos entre los microorganismos patógenos y los antagonistas en la planta, pueden ser: antibiosis, competencia, parasitismo o depredación.

2.5.1.1. Parasitismo

Cuando una especie, llamada parásito, se beneficia y la otra “el huésped” se perjudica, la relación se denomina parasitismo. Los parásitos pueden ser bacterias, hongos, animales o vegetales, que se alimentan de sustancias producidas por el huésped. El término parasitismo se refiere al hecho de que un microorganismo parasita a otro, en este caso a un patógeno de plantas. El parasitismo consiste en la utilización del patógeno como alimento por su antagonista. Los ejemplos más conocidos de hongos hiperparásitos son *Trichoderma* y *Gliocladium* (Carballo 2002). Rivera (1999), indica que, se ha estudiado el parasitismo de algunos hongos sobre sus congéneres, en interacciones hiperparasíticas sobre fitopatógenos. En este tipo de interacción ellos atacan hifas, estructuras y estructuras de sobrevivencia. Entre los hiperparásitos están *Verticillium chlamydosporium* y *Nematophthora gynophyla* sobre nematodos. También se conoce el efecto de ciertas bacterias como *Pasteuria* o *Bacillus penetrans* en *Meloidogyne* sp. y ciertos virus sobre bacterias (bacteriófagos) y nematodos.

2.5.1.2. Antibiosis

Antibiosis es el antagonismo que resulta cuando un microorganismo produce metabolitos secundarios que son tóxicos para otro microorganismo o que inhiben las actividades celulares vitales. Es un fenómeno muy común, responsable de la actividad biocontroladora de muchos organismos tales como *Pseudomonas* spp, *Bacillus* spp, *Fusarium* spp, o *Trichoderma* spp, que han sido desarrolladas como agentes de control biológico de patógenos. Una variedad de diferentes metabolitos como antibióticos, bacteriocinas, enzimas y compuestos volátiles se han descrito y están involucrados en la supresión de diferentes patógenos (Carballo 2002). Rivera (1999), menciona que antibiosis es una interacción establecida entre dos organismos en la cual una o más metabolitos producida por uno de los organismos involucrados tiene efecto detrimento sobre el otro. La forma más frecuente de afectar es inhibir el crecimiento o la germinación, además de algunas reacciones tóxicas en el interior de la célula.

2.5.2. Inducción de resistencia

La inducción de resistencia esta definida como la resistencia intensificada o fortalecida en una planta con respecto a patógenos como resultado de un tratamiento previo con un patógeno, un patógeno atenuado o un producto químico que, como tal no es un pesticida. La manifestación de la resistencia inducida puede ser localizada o sistémica (Alves 1993; Dantas *et al* 1993). Es localizada cuando la respuesta de la planta se da en el sitio donde se aplica el tratamiento inductor y, sistémica cuando la respuesta es efectiva en todas o en algunas partes de la planta, diferente al sitio de inducción (Deverall y Dan 1995; Riveros y Leopivre 1998).

La inducción de resistencia se presenta cuando se somete al material vegetal a tratamiento con compuestos químicos naturales o sintéticos. Esta resistencia se manifiesta primero localmente en las proximidades del punto de necrosis causado por la infección del patógeno, o el contacto con el compuesto químico, se llama resistencia local adquirida, luego se extiende a las demás zonas de la planta, se denomina resistencia sistémica adquirida o inducción de resistencia sistémica (Moore *et al* 1999). El mismo autor señala que, adicionalmente, las plantas pueden adquirir resistencia frente a una amplia gama de agentes patógenos, tales como virus, bacterias

y hongos en respuesta a una determinada infección o a la concentración que se presente del patógeno.

Los hongos endofíticos contribuyen a inducir cambios en la fisiología de las plantas (inducción de resistencia), en su morfología y función. La infección por estos hongos estimula la producción de exudados de la raíz. Estos exudados pueden producir efectos alelopáticos en competencia bajo condiciones de estrés biótico y la quelatación de iones metales afectando así el secuestro y disponibilidad de estos (estrés abiótico). Esta fase de respuesta simbiótica requiere de mayor investigación en todo tipo de asociaciones posibles respecto a la sustitución y transformación de modificación en la producción de ergo-alcaloides (Malinowski *et al* 2000).

Williams y Bridge (1985) mencionan la forma tradicional de incorporar resistencia a las plantas, al decir que, muchas plantas cultivadas que son particularmente dañadas por una determinada especie de nematodos, tienen algunos fenotipos que presentan resistencia, o algunos de sus ancestros silvestres la poseen. Estos se pueden cruzar con los cultivares susceptibles para incorporar resistencia. Es importante el conocimiento detallado de los rangos de hospederos y de los cultivares resistentes disponibles, ya que algunos nematodos tienen un rango muy amplio de hospederos y además, pueden encontrarse más de una especie en el mismo terreno.

2.6. Suelos supresivos

Cazorla (2003) señala que, durante la década de los 60, comenzaron a analizarse las propiedades de distintos suelos que suprimían determinadas enfermedades en plantas (suelos supresivos). La consecuente reducción de los síntomas de éstas enfermedades era debida, entre otras causas, a la presencia de microorganismos con características particulares.

Varios patógenos que habitan en el suelo, como *Fusarium oxysporum* (causante de los marchitamientos vasculares), *Phytophthora cinnamomi* (que causa las pudriciones de la raíz de muchos árboles frutales y forestales), *Pythium* sp. (ocasiona el ahogamiento de las plántulas) y *Heterodera avenae* (el nematodo enquistado de la avena), se desarrollan bien y causan enfermedades severas en algunos suelos, conocidos como

suelos propicios, pero se desarrollan mucho menos y causan enfermedades mucho más moderadas en otros suelos, conocidos como **suelos supresivos o supresores**. Los mecanismos por medio de los cuales los suelos inhiben el desarrollo de los diferentes patógenos no siempre son claros, pero pueden involucrar factores bióticos y/o abióticos e incluso variar de acuerdo al patógeno. En la mayoría de los casos gracias a la presencia, en esos suelos, de uno o varios microorganismos antagónicos al patógeno. Dichos antagonistas, gracias a los antibióticos que producen, por competencia por el alimento o al parasitar directamente al patógeno, evitan que este último alcance poblaciones suficientemente altas para causar enfermedades severas (Agrios 1998).

Suelos supresivos son aquellos en los que el patógeno no puede establecerse o persistir; o en los que existe el patógeno, pero la cantidad de enfermedad que se desarrolla es inferior a la que correspondería por la cantidad de inóculo y favorabilidad del ambiente. Esta propiedad de los suelos fue mencionada por primera vez por Atkinson hace más de un siglo en relación con la Fusariosis Vascular del Algodonero (*F. o. vasinfectum*), y ha sido descrita extensamente en la literatura de Fitopatología contra enfermedades producidas por hongos (*F. oxysporum*; *Phytophthora cinnamoni*; *Pythium* spp. *Rhizoctonia solani*, etc.) como por nematodos (*Heterodera avenae*, *H. glycines* y *Meloidogyne* spp.). Aunque la supresión sobre una determinada enfermedad puede ser de tipo generalizado, y estar relacionada con el nivel general de actividad microbiana en el suelo durante una(s) fase(s) crítica de la patogénesis (como la germinación de los propágulos, crecimiento rizosférico, etc.) el aspecto que más ha atraído la atención de los estudiosos es la naturaleza en ciertos casos específicos de la supresividad, sobre determinados fitopatógenos. Ejemplos de ellos son la supresividad ejercida sobre: a) *Fusarium oxysporum* por poblaciones no patogénicas de *F. oxysporum* y *Pseudomonas fluorescens*; b) *H. Avenae* por las actividades de *Nematophthora gynophila* y *Verticillium clamydosporium*; o c) *R. solani* por *Trichoderma hamatum*. (Rodríguez-Kábana y Calvet, 1994).

Se ha observado que numerosa clase de microorganismos antagónicos prospera en los suelos supresivos; También se ha observado con más frecuencia que la supresión del patógeno como de la enfermedad se debe a hongos como *Trichoderma*, *Penicillium* y

Sporodesmium o bien a bacterias del género *Pseudomonas*, *bacillus*, etc. (Agrios 1998).

La supresividad a las enfermedades, supresividad natural esta asociada con la actividad microbiología del suelo. Investigaciones recientes indican que la antibiosis (producción de antibióticos por un organismo de biocontrol) juega un importante papel en la reducción de la enfermedad en los suelos supresivos (Carballo 2002).

El fenómeno de supresividad del suelo se debe a la presencia de microorganismos antagonicos, se puede demostrar al pasteurizar suelo a 60 °C durante 30 minutos, lo cual elimina por completo dicho efecto (Agrios 1998).

La existencia de suelos supresivos al nematodo barrenador ha sido observada en ciertos suelos de Centroamérica. Estudios microbiológicos de estos suelos han demostrado que la actividad microbiológica en los suelos supresivos es superior a la de los suelos no supresivos. Esta microflora de los suelos probablemente es una de las razones de la supresividad que presentan estos suelos. Asimismo, la actividad biológica de estos suelos ha sido relacionada con el tipo de explotación de las fincas bananeras, intensivo, semicomercial y orgánico, así como de la edad de la plantación (Pocasangre 2002).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Localización geográfica del estudio

La presente investigación se llevó a cabo en los laboratorios de Nematología e invernaderos del CATIE, ubicado en el cantón de Turrialba en la provincia de Cartago, Costa Rica, localizado a 9° 52' de latitud norte y 83° 38' de latitud oeste y a una altura de 602 m.s.n.m. Zona de vida según Holdridge es de Bosque muy húmedo tropical, con una precipitación anual de 2065 mm, temperatura promedio de 21.6 °C, 87% de humedad relativa y una radiación promedio mensual de 17 $\text{kJ M}^{-2} \text{ día}^{-1}$.

Además, la recolección de muestras se realizó en la Asociación de Plataneros “Margarita” en la zona de Talamanca, localizada a 9° 38' 35" N y 82° 54' 00" O, en parcelas comerciales de plátano, pertenecientes a los miembros de la Asociación Margarita de Sixaola, ubicada en la provincia de Limón, cantón Talamanca en Costa Rica. La zona de vida es considerada como bosque húmedo tropical, con temperaturas anuales entre 24 – 30 °C, una precipitación anual entre 2000 y 5000 mm, evapotranspiración potencial promedio de 1200 – 1500 mm, el brillo solar promedio anual es de 4 – 5 horas luz/día, la humedad relativa promedio es de 87% y altitud de 12 n.s.n.m. Los suelos son aluviales que se forman a partir de coladas de lodo y aluviones viejos que en términos taxonómicos corresponden a inceptisoles y ultisoles; las texturas que se presentan son: francos, franco-arcillosos, franco-arcillo-limosos; el relieve es plano-cóncavo (0 – 5% pendiente); el drenaje es regular. La fertilidad aparente es media y los suelos presentan una profundidad efectiva de 1.85 m.

El estudio se realizó en tres fases:

1. **A nivel de campo:** se efectuaron muestreos periódicos de raíces y suelo para determinar la dinámica poblacional del “nematodo barrenador” en el tiempo y en la zona de Margarita-Sixaola.

2. **A nivel *in vitro***: se identificaron los hongos endofíticos aislados. Estudios de actividad antagonista antibiosis y parasitismo a nivel *in vitro*.
3. **A nivel de invernadero**: se estudió la actividad antagonista a nivel *in vivo* de hongos endofíticos promisorios contra el “nematodo barrenador” *R. similis*.

3.2. Dinámica poblacional de *Radopholus similis*

El estudio se realizó en tres fincas que presentaron un gradiente de supresividad al “nematodo barrenador” *R. similis* claramente establecido, en análisis de muestras anteriores realizadas por CORBANA, las cuales se describen en la Tabla 1.

Tabla 1 Información general de los suelos de tres fincas con diferentes gradientes de supresividad a *R. similis*

Propietario de finca	Localidad	Cultivar sembrado	Categoría de supresividad	Número de <i>R. similis</i> por 100 gramos de raíces
Víctor Mayorga	Sixaola	Curraré	Supresivo	0
Mardoqueo Benavides	Sixaola	Curraré	Moderadamente supresivo	6,800
Pastor Rosales	Sixaola	Curraré	No supresivo	40,000

Las tres fincas se encuentran en la zona de Sixaola-Talamanca y utilizan la misma tecnología de producción: preparación del terreno: subsolada y rastra de dientes, siembra de cormos brotados convencionales (rebrotos), densidades entre 2000 y 2500 plantas/ha., la variedad utilizada es “Curraré”, aplicación de herbicida para el control de malezas o control manual, construcción y mantenimiento de drenajes, fertilización. Para el control de Sigatoca negra y otras enfermedades se realiza el deshoje, despunte y control químico; para manejo de población de plantas el deshoje, control de picudo y nematodos con insecticida-nematicida. Cosecha y manejo de poscosecha: embolse encinte (Cámara Nacional de Productores de Plátano-Aso Margarita 2001).

3.2.1. Determinación de la supresividad de los suelos mediante el método directo

Para determinar la supresividad de los suelos en estudio por el método directo se utilizó el estudio de la dinámica de poblaciones de los fitonematodos en el sistema radical en cuatro muestreos consecutivo con intervalos de dos meses. Las fechas de los muestreos fueron 05 de febrero del 2003, 02 de abril del 2003, 03 de junio del 2003 y 05 de agosto del 2003. Para esto se obtuvo una “muestra compuesta” de raíces extraídas de diez plantas al pie del “hijo de sucesión”, distribuidos al azar en plantaciones comerciales de plátano (*Musa* sp. AAB) variedad “Curraré”.

Las raíces se colectaron cavando un hoyo de 0.13 x 0.13 x 0.30 m, frente al hijo de sucesión, cuando de la planta madre aparece externamente la inflorescencia al final del tallo floral, la “bellota o chira” que se abre paso por el centro del seudotallo (Calvo y Araya s.f.).

Estas muestras fueron etiquetadas y llevadas al laboratorio, en donde las raíces de cada muestra se lavaron con agua del grifo y se separaron raíces funcionales y raíces no funcionales (raíces vivas y raíces muertas respectivamente). Fueron procesadas por el método de macerado en licuadora, 10 segundos a baja velocidad y 10 segundos a alta velocidad; se tamizó en tres tipos de tamices, ubicados en orden de: 1.00 mm (n° 18), 0.15 mm (n° 100) y 0.043 mm (n° 325), se obtuvo una suspensión de nematodos de 200 ml, se sometió a agitación para homogenizar y se tomaron 2 ml de la suspensión que se colocaron en un nematocimetro, donde se agregó una gota de “azul de Metileno” (5 g/l de agua destilada) como colorante, luego se realizó el conteo; este método es el resultado de combinar la técnica usada por Taylor Loegering, con la de Christie y Perry, utilizado en los laboratorios de Nematología de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA) Costa Rica y en Centroamérica (Araya 2003). Los nematodos se clasificaron estimando su población en 100 gramos de raíz fresca. Así se obtuvo un promedio de los cuatro intervalos, y determinó la dinámica de la población del nematodo en cada tipo de suelo.

3.2.1.1. Protocolo para la extracción de nematodos del sistema radical de plátano

Para la extracción de nematodos se utilizó la metodología de macerado y filtrado utilizada en el Laboratorio de Nematología de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA S.A.), que es una adaptación al método Taylor y Loegering, utilizado en Centroamérica y Costa Rica (Araya 1999).

Se seleccionaron raíces funcionales y se cortaron en secciones transversales de 2 – 3 cm de longitud. Se tomó al azar 100 g del material y se vertieron en una licuadora comercial, se aforo a 200 ml con agua corriente y se licuaron a velocidad baja y alta, ambas por 10 seg. El contenido se tamizó en un juego de cribas 1.00 mm (n° 18), 0.15 mm (n° 100) y 0.043 mm (n° 325). Se efectuó un lavado para facilitar que los nematodos fueran separados del tejido vegetal resultante con la ayuda de una pizeta. Los nematodos fueron colectados en cribas No. 325 y traspasados a recipientes plásticos con capacidad volumétrica de 250 ml y se almacenaron bajo condiciones de laboratorio.

Para identificar y cuantificar la población de nematodos se tomaron alícuotas de 2 ml después de homogenizar la suspensión y se transfirieron a micro cámaras de conteo. Se realizaron dos conteos de nematodos por alícuota un microscopio invertido Welman con un aumento de 40x. A partir de los nematodos cuantificados por alícuota, se estimó la cantidad total de nemátodos por 100 g de raíz a través de una extrapolación con relación al volumen total. Asimismo, los nematodos se identificaron hasta nivel género.

3.3. Método indirecto de supresividad

El método indirecto utilizado para medir el grado de supresividad de los tres suelos evaluados: supresivo, medianamente supresivo y no supresivo, consistió en eliminar los microorganismos presentes en los suelos mediante autoclavado de los los 3 suelos en estudio por una hora a 121 °C y 1.2 bar de presión. Estos suelos fueron dejados por un período de 3 días en aeración antes de ser utilizados en los ensayos experimentales. A continuación se describen los 6 tratamientos utilizados, en la Tabla 2.

Tabla 2. Descripción de los tratamientos utilizados para determinar la supresividad de los suelos mediante el método indirecto.

Tratamiento	Descripción
T1	Suelo supresivo autoclavado
T2	Suelo supresivo sin autoclavar
T3	Suelo medianamente supresivo autoclavado
T4	Suelo medianamente supresivo sin autoclavar
T5	Suelo no supresivo autoclavado
T6	Suelo no supresivo sin autoclavar

La unidad experimental consistió en un recipiente plástico de 250 cm³ de volumen que contenía 100 gramos de suelo. Dos días después de establecido el experimento se inoculó cada unidad experimental con una suspensión de 500 nematodos conteniendo diferentes estadios larvales de *R. similis* y tres días después de la inoculación se realizaron las extracciones de los nematodos mediante el método de Bearmann modificado.

3.3.1. Cultivo aséptico de *Radopholus similis*

La población original de *R. similis* provenía de las plantaciones de plátano de la Asociación Margarita. La reproducción y mantenimiento de los nematodos se realizó en discos de zanahoria usando el protocolo descrito por Speijer y De Waele 1997. Estos cultivos se dejaron aproximadamente seis semanas en una cámara oscura, a una temperatura de 27°C. Los nematodos móviles que se encontraban en la superficie de los Petri (35mm) fueron colectados para su transferencia a nuevos discos de zanahoria.

3.4. Aislamiento de hongos endofíticos de suelos supresivos de Margarita-Sixaola.

El aislamiento de los hongos endofíticos se efectuó a partir de raíces sanas colectadas en parcelas de plantaciones de plátano en Margarita – Sixaola, en la finca de suelos supresivos. Las raíces se cortaron en secciones de 1 cm, se introdujeron y se agitaron por 5 minutos en hipoclorito de sodio al 3% y se lavaron con agua esterilizada por 3 veces. Para remover el exceso de agua las secciones de las raíces fueron colocadas sobre papel toalla esterilizado en autoclave. El tejido interno fue cortado en pequeños pedazos de aproximadamente 1 a 1.5 cm de largo. Posteriormente, estos pedazos se colocaron en medio de cultivo papa-dextrosa-agar al 10% (PDA 10%), conteniendo 150 ppm de estreptomicina y penicilina, y se incubaron a 25 °C en la oscuridad, y una semana después, éstos aislados se transfirieron sucesivamente a medio de cultivo papa-dextrosa-agar al 100% (PDA 100%) para su purificación hasta su identificación y clasificación.

3.5. Evaluación de la actividad antagonista de hongos endofíticos a nivel *in vitro*

3.5.1. Prueba de parasitismo

Los 15 hongos endofíticos seleccionados fueron transferidos a platos Petri conteniendo PDA al 100%. Dependiendo de la rapidez del crecimiento micelial, se dejaron crecer de 2 a 5 días, hasta que alcanzaron un diámetro de 4 cm aproximadamente. Cuando las colonias adquirieron el tamaño de 4 cm, se inoculó una suspensión de 100 nemátodos estériles contenidos en una alícuota de 0.25 ml de agua estéril por plato Petri. El co-cultivo se incubó en condiciones de oscuridad y a una temperatura de 27°C. Este fue observado a las 24 horas después de la inoculación mediante un microscopio a una resolución 10x. Asimismo, la acción parasítica de los aislados sobre *R. similis* fue captada mediante fotografías hechas mediante una cámara Olympus C35AD-2. Las variables evaluadas en esta prueba fueron número de nematodos vivos, muertos e inmóviles. El testigo consistió en inocular 0.25 ml de la suspensión de nematodos en platos Petri con PDA 100%.

3.5.2. Pruebas de antibiosis

Cinco discos de PDA conteniendo micelio de los hongos endofíticos fueron extraídos del plato Petri, mediante un barreno de aluminio de 5 mm de diámetro. Estos fueron transferidos en una solución líquida de Czapek Dox (CD) contenidos en Erlenmeyers de 250 ml previamente esterilizados. Para evitar posibles problemas de fotosensibilidad, los frascos fueron forrados totalmente con papel aluminio. Posteriormente, se colocaron en una banda agitadora a una velocidad de 95 rpm durante 15 días. Para obtener la solución de los metabolitos secundarios generados por los hongos, el contenido de los Erlenmeyers fue filtrado bajo condiciones estériles. Se efectuaron 2 filtrados. El primer filtrado se efectuó a través de papel Wattman número 5. Para la segunda filtración, se recolectó el primer filtrado con una jeringa estéril, a la cual se le adaptó un filtro desechable marca Syringe de 0.22 μ m y se procedió a efectuar la segunda filtración, depositando la solución resultante en viales de 100 ml previamente estériles. La Figura 2 resume el protocolo utilizado para la obtención de los extractos crudos.

Del extracto puro (100%) se efectuaron diluciones de 25, 50 y 75 por ciento. Estas soluciones fueron almacenadas bajo condiciones de oscuridad a 4 \pm 2.5 $^{\circ}$ C hasta su utilización.

La efectividad de los extractos resultantes en cuanto a su capacidad nematicida fue determinada mediante el co-cultivo de 100 nemátodos (contenidos en 0.25ml de agua) con cada una de las distintas concentraciones (0.25; 0.50; 0.75 y 1.0).

Se colocaron alícuotas de 2 ml de cada concentración en cajas desechables, marca Costar, de 6 celdas. De cada caja fueron utilizadas 4 celdas, de manera que cada una contuviera una concentración (25, 50, 75 y 100%). Inmediatamente después de la inmersión de los nemátodos en los extractos, se procedió a efectuar la primera lectura de nemátodos vivos y muertos mediante un microscopio invertido, marca Wilovert con un aumento 40x. Posteriormente se efectuaron lecturas a las 8, 16 y 24 horas.

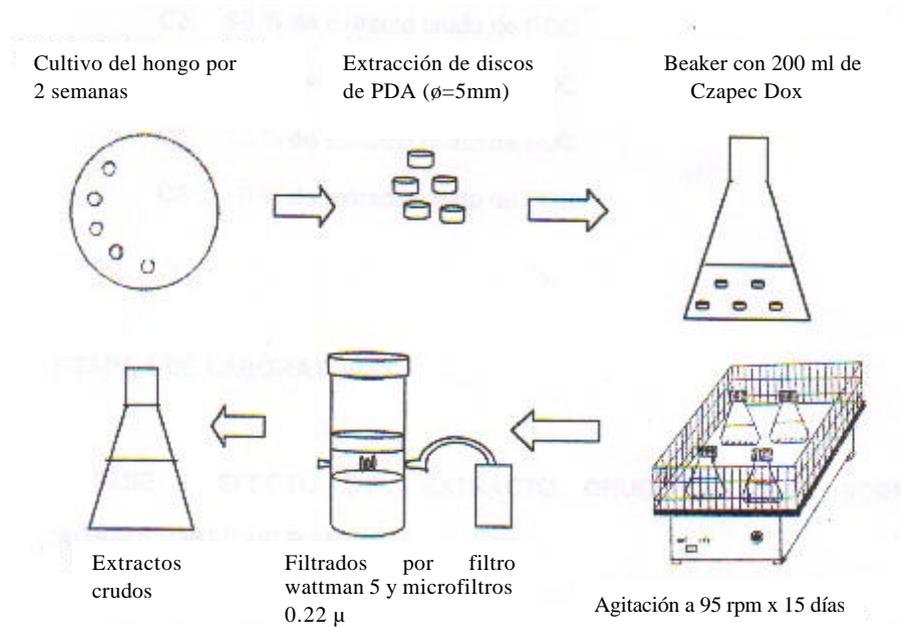


Figura 2. Metodología utilizada para obtener los extractos crudos de los hongos endofíticos

3.6. Evaluación de la actividad antagonista de aislados endofíticos promisorios a nivel de invernadero

En esta fase se estudió 4 aislados de hongos endofíticos promisorios de los géneros *Tichoderma* y *Fusarium*, de mejor comportamiento en las pruebas *in vitro* de parasitismo y antibiosis, recolectados en la finca de suelo supresivo a *R. similis*, en 8 tratamientos y 8 repeticiones, con rebrotes de microcormos de plátano (*Musa* sp. AAB) variedad “Curraré”(Coto *et al*; Marcelino y González; y Rojas y vargas 2002) y vitroplantas de banano (*Musa* sp. AAA) variedad “Gran Enano”.

Los tratamientos consistieron en probar 4 aislados de hongos endofíticos promisorios: S2 *Trichoderma*, S7 *Fusarium*, S9 *Fusarium* y S10 *Trichoderma*, más 500 nematodos *R. similis* por tratamiento, así también dos testigos “probados” de *Tichoderma* (T12) y *Fusarium* (T5), que tuvieron una destacada actividad antagonista sobre *R. similis* (Zum Felde 2002), así como un tratamiento testigo sin hongos endofíticos con 500 *R. similis*, y un tratamiento sin hongos endofíticos y sin nematodos como testigo absoluto.

3.6.1. Protocolo de evaluación de la reproducción de *R. similis* en la prueba *in vivo*

3.6.1.1. Preparación de la suspensión de esporas

Los hongos endofíticos élite se dejaron crecer en PDA 100% durante una semana. Bajo condiciones asépticas, se procedió a remover las esporas con la aplicación de 25 ml de agua estéril. Se efectuó un rayado mediante una espátula de tres centímetros de ancho y bordes redondeados, que facilitaron el raspado del micelio del hongo. La solución resultante del rayado del Petri fue filtrada por medio de una gasa y decantada en un beaker de 250 ml. Este proceso se llevo a cabo para obtener una solución de esporas. De cada solución resultante se efectuaron conteos para medir la concentración de esporas mediante un hematocímetro de Neubauer. La suspensión de esporas fue ajustada a una concentración de $1,5 \times 10^6$ esporas/ml.

3.6.1.2. Inoculación de rebrotes de microcormos y vitroplantas con hongos endofíticos

El sistema radical de plantas de plátano y banano fue inmerso en una suspensión de esporas a una concentración de $1,5 \times 10^6$ esporas/ml contenida en un beaker de 2000 ml de capacidad. Los rebrotes de microcormos y las vitroplantas se dejaron sumergidas, agitándolas levemente, por un tiempo de cinco minutos. Inmediatamente, se sembraron en una macetera, conteniendo un litro de suelo húmedo, previamente estéril, compuesto por una mezcla de tierra y arena (relación 1:1). Las plantas se dejaron por ocho semanas bajo condiciones de invernadero, a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, con una frecuencia de riego diario. No se efectuó ningún plan de fertilización debido a la naturaleza del estudio.

3.6.1.3. Inoculación del material vegetativo con *Radopholus similis*

Cuando los nematodos fueron observados en colonias grandes en la superficie de platos Petri y el perímetro de los discos de zanahoria, se removieron con agua destilada y fueron decantados en Erlenmeyers con la ayuda de una pipeta. La solución obtenida del lavado fue aforada a un volumen conocido y se procedió a

determinar la concentración de nematodos por ml. La solución fue ajustada a una suspensión de 500 nematodos / 6 ml de agua en un Erlenmeyer de 2000 ml.

A las dos semanas de la inoculación de esporas, en el sistema radical de los rebrotes de cormos y de las vitroplantas, se efectuó una inoculación con 500 nematodos por planta. La inoculación se efectuó con la aplicación de 6 ml de la suspensión mediante una pipeta Ependorf calibrada. Estos se inocularon en tres agujeros hechos en la circunferencia del área radical de la planta. Para asegurar que la aplicación de nematodos fuera homogénea en cada planta, la suspensión fue agitada continuamente. El protocolo del bioensayo es presentado en la Figura 3.

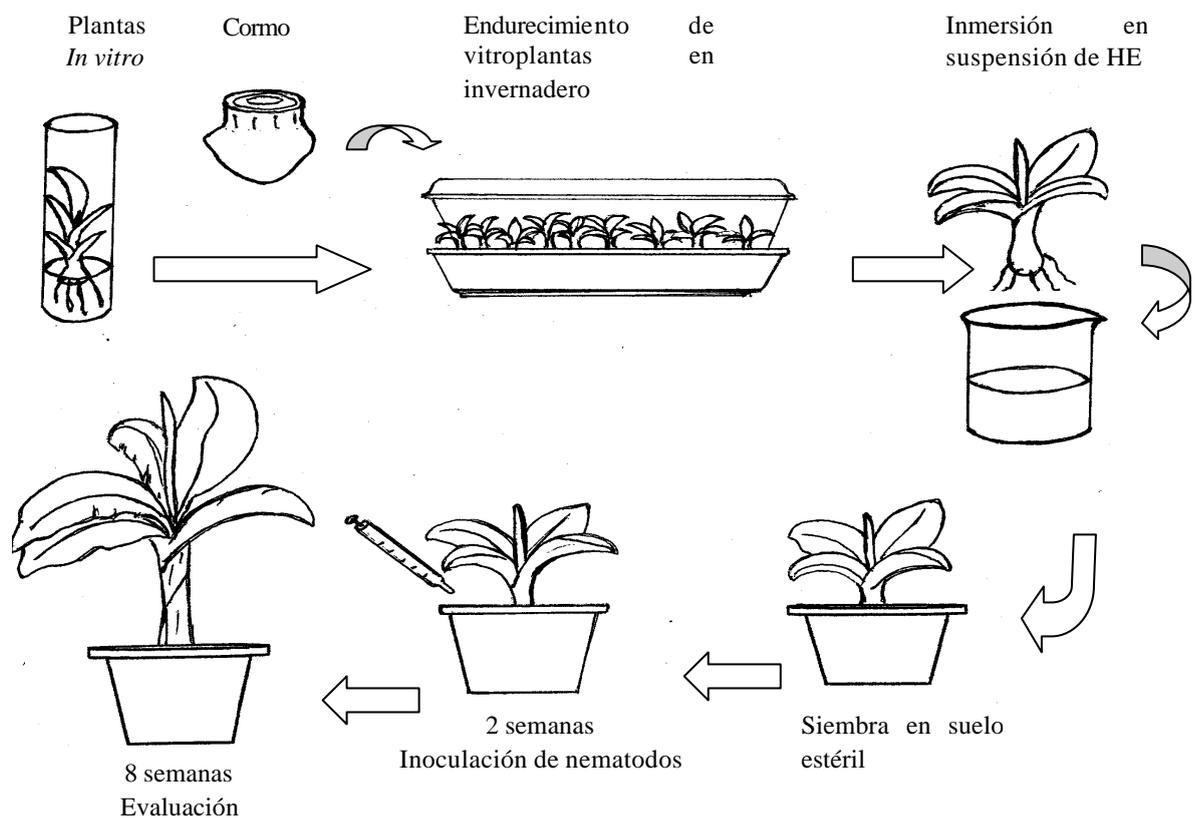


Figura 3. Protocolo utilizado en el bioensayo para determinar la actividad antagonista de los hongos endofíticos sobre *Radopholus similis*. Diagrama realizado por Carlos Cañizares.

3.6.1.4. Evaluación del experimento

Antes de evaluar las plantas, se midieron la altura (cm) y diámetro basal del pseudotallo, y el número de hojas. Las plantas fueron trasladadas al laboratorio de raíces del CATIE, donde fueron removidas de las macetas. Se procedió a un lavado del sistema radical con un caudal de agua con poca presión para evitar el desprendimiento y pérdida de las raíces finas.

Posteriormente, las plantas se colocaron en papel toalla para remover el exceso de humedad. Las raíces fueron cuantificadas y separadas del pseudotallo mediante un bisturí, y se colocaron en recipientes plásticos debidamente rotulados.

Posteriormente, el pseudotallo y las raíces fueron separados y se procedió inmediatamente a pesarlos en una balanza analítica de 0,01 g de precisión. Las raíces fueron almacenadas en agua, de manera que el tejido se mantuviera turgente para una adecuada extracción de nemátodos.

La morfología de las raíces fue analizada mediante el software WinRhizo®. Las raíces de cada planta se colocaron lo más extendidamente en bandejas de 10 x 30 cm, donde fueron escaneadas para el análisis de las variables diámetro promedio (mm), longitud total (cm), área superficial (cm²) y longitud/volumen (cm/m³).

Para determinar la población final de *R. similis* en el sistema radical total de cada planta, se utilizó la metodología de macerado y filtrado utilizada en el laboratorio de Nematología de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA), descrita en el acápite 2.5 del artículo 1, con diferencia que el volumen total de raíces fue procesado. Los nemátodos se cuantificaron según su estadio: J1-J2, J3-J4 y adultos, en alícuotas de 2 ml. La población total final se estimó a través de una extrapolación con relación al volumen total de las raíces procesadas.

3.7. Diseño experimental

3.7.1. Actividad antagonista *in vitro*

Se estudiaron 15 aislados de hongos endofíticos, preseleccionados por su rápido crecimiento y abundante esporulación, para los que se evaluara el potencial antagonista contra el nematodo barrenador *R. similis*.

Las variables a evaluadas fueron:

- ?? Parasitismo y
- ?? Antibiosis (metabolitos secundarios).

El modelo estadístico consistirá de un Análisis de Varianza para un Diseño Irrestrictamente Aleatorizado (**DIA**) con 4 repeticiones:

$Y_{ij} = \mu + T_j + \epsilon_{ij}$, donde:

Y_{ij} = variable a ser medida;

μ = media general;

T_j = efecto de tratamiento (hongos endofíticos promisorios); y

ϵ_{ij} = error experimental.

3.7.2. Actividad antagonista *in vivo*:

Para esta fase se obtuvieron 4 aislados de hongos endofíticos promisorios, de mejor comportamiento en las pruebas de parasitismo y antibiosis, así estudiar su actividad antagonista sobre el nematodo barrenador *R. similis*.

Las variables a considerar en este estudio fueron:

- ?? Tasa de reproducción del nematodo barrenador *R. similis*.
- ?? Número de nematodos en 100 gramos de suelo.
- ?? Peso fresco de las raíces.

?? Número de raíces por planta.

?? Altura delseudotallo.

?? Diámetro delseudotallo.

?? Peso fresco delseudotallo.

Diseño de tratamientos, un factorial $2 \times 8 = 16$ tratamientos, lo que corresponde a rebrotes de microcormos de plátano y vitroplantas de banano; 8 repeticiones.

Se generaron los siguientes tratamientos:

Descripción de los tratamientos: para cormos de plátano

Tratamiento **1** = H.E. aislado (*Trichoderma*) **S2** + 500 nematodos.

Tratamiento **2** = H.E. aislado (*Fusarium*) **S7** + 500 nematodos.

Tratamiento **3** = H.E. aislado (*Fusarium*) **S9** + 500 nematodos.

Tratamiento **4** = H.E. aislado (*Trichoderma*) **S10** + 500 nematodos.

Tratamiento **5** = H.E. aislado (*Fusarium*) **T5** + 500 nematodos (Testigo probado)

Tratamiento **6** = H.E. aislado (*Trichoderma*) **T12** + 500 nematodos (Testigo probado)

Tratamiento **7** = sin hongos endofíticos + 500 nematodos (Testigo 0)

Tratamiento **8** = sin hongos endofíticos y sin nematodos (**Testigo absoluto**).

Descripción de los tratamientos: para vitroplantas de banano.

Tratamiento **1** = H.E. aislado (*Trichoderma*) **S2** + 500 nematodos.

Tratamiento **2** = H.E. aislado (*Fusarium*) **S7** + 500 nematodos.

Tratamiento **3** = H.E. aislado (*Fusarium*) **S9** + 500 nematodos.

Tratamiento **4** = H.E. aislado (*Trichoderma*) **S10** + 500 nematodos.

Tratamiento **5** = H.E. aislado (*Fusarium*) **T5** + 500 nematodos (Testigo probado)

Tratamiento **6** = H.E. aislado (*Trichoderma*) **T12** + 500 nematodos (Testigo probado)

Tratamiento **7** = sin hongos endofíticos + 500 nematodos (Testigo 0)

Tratamiento **8** = sin hongos endofíticos y sin nematodos (**Testigo absoluto**).

Se planteó este diseño de tratamientos por bloques, en razón de facilitar el tomar los datos en el tiempo.

Área física de la investigación: 35 m² (veinticinco metros cuadrados).

El tamaño de la unidad experimental consistió en la macetera plástica de 650 cm³, con un 2 x 8 x 8 = 128 unidades experimentales, distribuidas en un área de 35 m².

Microcormos de plátano (*Musa* sp. AAB) y vitroplantas de banano (*Musa* sp. AAA) de estado IV 10-15 cm de altura.

3.7.3. Modelo estadístico

$Y_{ijk} = \mu + B_k + P_i + T_j + (CT)_{ij} + \epsilon_{ij}$, donde:

Y_{ijk} = variable a ser evaluada;

μ = media general;

B_k = efecto del bloque (repetición);

P_i = efecto de la procedencia de la planta (Vitroplantas y rebrotes de campo).

T_j = efecto de tratamiento (hongos endofíticos promisorios);

$(PT)_{ij}$ = efecto de la interacción procedencia y tratamientos; y

ϵ_{ij} = error experimental.

3.7.4. Análisis estadísticos

El diseño experimental que se utilizó para todos los ensayos donde el ambiente no pueda ser controlado, fueron Bloques Completamente Aleatorizados (**DBCA**). Todos los datos fueron analizados mediante el análisis de la varianza (**PROC GLM, SAS** para Windows), los conteos de los nematodos fueron transformados antes de realizar el análisis estadístico utilizando $\ln(x + 1)$, o bien otro tipo de transformación, como raíz cuadrada que normalice los datos. Los promedios fueron comparados mediante una prueba de rango múltiple de **DUNCAN** ($P < 0.05$).

Para el método indirecto de supresividad se efectuó una prueba de **t de students** de comparación de medias de tratamientos.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Dinámica poblacional del nematodo barrenador *Radopholus similis*

Está ampliamente documentado que son muchas las especies de fitonematodos asociados al sistema radical del banano. Sin embargo, las cuatro especies de nematodos más frecuentemente encontrados en la mayoría de plantaciones de banano y plátano son *Radopholus similis*, *Pratylenchus coffeae*, *Helicotylenchus multicinctus* y *Meloidogyne incognita*. Adicionalmente a estos 4 géneros principales se han reportado en menor grado 43 otros géneros asociados al sistema radical de musáceas (Gowen y Queneherve, 1998).

Los resultados presentados en la Figura 4 demuestran que la composición de la población de fitonematodos presentes en el sistema radical de plantas provenientes de suelos supresivos, medianamente supresivos y no supresivos fue bastante similar. En los tres suelos estudiados, *R. similis* se encontró con mayor frecuencia. Sin embargo, otras especies de fitonematodos fueron encontradas asociados al sistema radical de plátano, siendo *Pratylenchus coffeae*, *Helicotylenchus multicinctus*, *Meloidogyne incognita* los más frecuentes. Resultados similares fueron encontrados por Pocasangre *et al* (2001) quienes encontraron que en plantaciones comerciales de suelos supresivos de Motagua, en Guatemala, *R. similis* fue la especie más frecuente, sin embargo, *Pratylenchus coffeae*, *Helicotylenchus multicinctus* y *Meloidogyne incognita* fueron encontrados parasitando el sistema radical de banano.

En la presente investigación se determinó la supresividad o no supresividad de los suelos en forma directa mediante los estudios de densidades de fitonematodos presentes en el sistema radical de plátano en los tres suelos en estudio: supresivo, medianamente supresivo y no supresivo. Estas densidades de nematodos fueron registradas en cuatro períodos consecutivos. Los resultados presentados en la Tabla 3 demuestran que existieron diferencias significativas en las densidades de nematodos en el sistema radical entre plantas provenientes de suelos supresivos y suelos medianamente supresivos y no supresivos en los cuatro períodos de muestreo. Sin embargo, no se detectaron diferencias entre suelos medianamente supresivos y no supresivos. En las cuatro evaluaciones efectuadas se encontró menor cantidad de

fitonematodos en las raíces de suelos supresivos en comparación con suelos moderadamente supresivos y no supresivos. Estos resultados demuestran la consistencia del comportamiento supresivo a fitonematodos que presentan estos suelos de Sixaola durante un año de evaluación. La estabilidad del efecto supresivo a fitonematodos en banano ha sido estudiada por varios años por Pocasangre *et al* (2001) y zum Felde (2002), quienes han encontrado que durante 5 años de estudios consecutivos los suelos supresivos del Valle del Motagua en Guatemala han mantenido su efecto supresivo a fitonematodos.



Figura 4. Composición de fitonematodos presentes en tres gradientes de suelo, durante cuatro períodos de muestreo en plantaciones de plátano “Curraré.”

Con relación al porcentaje de raíces funcionales y raíces no funcionales, se determinó en los cuatro muestreos que el mayor porcentaje de raíces funcionales se encontró en suelos supresivos en comparación con raíces provenientes de suelos medianamente supresivos y no supresivos. El porcentaje de raíces funcionales en suelos supresivos varió de 71 a 91%, mientras que en suelos no supresivos osciló entre 47 y 55% (Tabla 3). Estos resultados demuestran que la condición de salud del sistema radical fue sustancialmente superior en suelos supresivos que en no supresivos. Este mejoramiento de la sanidad radical encontrado en suelos supresivos puede ser explicado por dos teorías. La primera es debido a que el daño del sistema radical en plantas provenientes de suelos supresivos fue inferior porque la densidad de nematodos presentes en el sistema radical fue también significativamente inferior que

en plantas de suelos no supresivos. La segunda teoría está relacionada a la mayor diversidad de hongos endofíticos asociados al sistema radical en plantas de suelos supresivos que no supresivos (Tabla 5) y posiblemente estos microorganismos confieren una protección a las plantas contra el ataque de nematodos y otros patógenos del suelo.

Tabla 3. Composición de fitonematodos encontrados entre gradientes de suelo, en cuatro períodos de muestreo en plantaciones de plátano “Curraré”.

Período de Muestreo	Gradientes de suelo	Número total Fitonematodos	Raíces funcionales	Raíces No funcionales
Primero	Supresivo	1162 c	73%	27%
	Medianamente Supresivo	7425 a	53%	47%
	No supresivo	4500 b	47%	53%
Segundo	Supresivo	338 b	71%	29%
	Medianamente Supresivo	5325 a	56%	44%
	No supresivo	5300 a	52%	48%
Tercero	Supresivo	1112 b	86%	14%
	Medianamente Supresivo	2113 a	63%	37%
	No supresivo	2292 a	62%	38%
Cuarto	Supresivo	430 b	91%	9%
	Medianamente Supresivo	1691 a	65%	35%
	No supresivo	1665 a	55%	45%

En cada variable las cifras seguidas de una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativa (> 0.0001), aplicando la prueba de Duncan.

4.2. Método indirecto de supresividad del suelo sobre *Radopholus similis*

En la presente investigación se determinó la supresividad o no supresividad a *R. similis* de los tres suelos en estudio en forma indirecta. La Tabla 4 y Figura 5 contienen los resultados de cuatro experimentos para medir la supresividad por el

método indirecto. En general, se pudo detectar diferencias significativas en la recuperación de nematodos entre suelos supresivos y moderadamente y no supresivos en los cuatro muestreos. Por ejemplo, los suelos supresivos sin esterilizar presentaron menor cantidad de nematodos extraídos que suelos moderadamente supresivos y no supresivos. La recuperación de extracción de *R. similis* en suelos supresivos no estériles varió de 19 a 97 nematodos, mientras que, en suelos no supresivos de 43 a 194 nematodos. Por otro lado, en las cuatro pruebas realizadas no se encontró diferencias significativas entre suelos moderadamente supresivos y no supresivos. Estos resultados pueden explicarse debido a que la microbiota benéfica presente en suelos supresivos puede ser la responsable de este biocontrol natural que está presente en estos suelos. Resultados similares fueron encontrados por Pocasangre (2002), quien encontró que la extracción de nematodos en suelos supresivos fue significativamente inferior que en suelos no supresivos.

Por otra parte en suelos esterilizados tanto en suelos supresivos como no supresivos la tasa de recuperación de extracción de *R. similis* fue superior que en suelos no esterilizados. Por ejemplo, la cantidad de extracción en suelos supresivos esterilizados osciló entre 40 y 126, mientras que en suelos no supresivos esterilizados esta cantidad varió entre 55 y 216 *R. similis*. Esta mayor cantidad de nematodos extraída puede ser explicado debido a que parte de la microbiota benéfica presente tanto en suelos supresivos como no supresivos es eliminada mediante la esterilización, por lo tanto el efecto supresor se reduce sustancialmente.

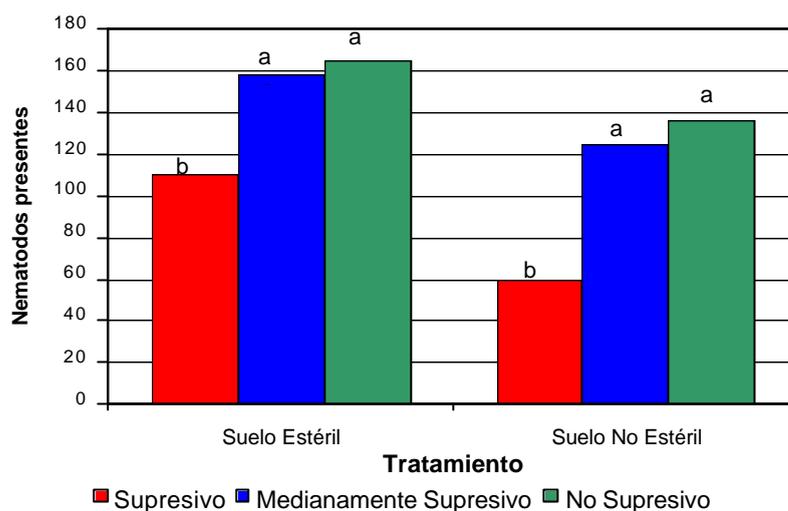


Figura 5. Extracción de nematodos en suelo esterilizado y no esterilizado después de tres días de inoculado *Radopholus similis*. Las barras con una misma letra no tienen diferencia estadística significativa (> 0.0001), aplicado la prueba de Duncan.

Tabla 4. Extracción de nematodos en suelo esterilizado y no esterilizado después de tres días de inoculado 500 nematodos *Radopholus similis* por unidad experimental

Localidad	Tipo Suelo	1 ^{er} Muestreo	2 ^{do} Muestreo	3 ^{er} Muestreo	4 ^{to} Muestreo
Suelo esterilizado					
Sixaola-Margarita	Supresivo	40 a	109 b	126 b	101 b
Sixaola-Margarita	Medianamente supresivo	69 a	176 a	247 a	191 a
Sixaola-Margarita	No supresivo	55 a	159 a	216 a	173 a
Suelo no esterilizado					
Sixaola-Margarita	Supresivo	19 b	75 b	97 b	77 b
Sixaola-Margarita	Medianamente supresivo	53 a	125 a	210 a	108 a
Sixaola-Margarita	No supresivo	43 a	112 a	194 a	178 a

En cada variable las cifras seguidas de una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas (> 0.0001), aplicado la prueba de Duncan.

4.3. Aislamientos de hongos endofíticos

Aislamientos de hongos endofíticos asociados a tejidos internos de raíces de diferentes cultivares de banano en diferentes países han sido ampliamente documentado por varios autores (Speijer y Sikora, 1993, Schuster *et al.*, 1995, Pocasangre, 2000, Niere, 2001). En la presente investigación se realizaron aislamientos de hongos endofíticos provenientes de raíces de 3 diferentes gradientes de supresividad a *R. similis*. La Tabla 5 contiene los resultados de los aislamientos de hongos endofíticos provenientes de los 3 suelos en estudio. Un total de 62 hongos endofíticos fueron aislados de tejidos internos de raíces provenientes de suelos supresivos y solamente 33 aislados provenientes de suelos no supresivos. Los géneros mas frecuentemente encontrados fueron *Fusarium* y *Trichoderma*. Resultados similares fueron encontrados por Pocasangre *et al.* (2002), quienes encontraron que 17 aislados endofíticos provenientes de la finca supresiva Maya en comparación de solamente 4 aislados provenientes de la finca no supresiva El Real. Posteriores estudios sobre suelos supresivos de Guatemala realizados por zum Felde (2002) demostraron que los géneros mayormente encontrados fueron *Fusarium* y *Trichoderma*. Esta biodiversidad de hongos endofíticos asociadas al sistema radical de plátano de las fincas supresivas de Sixaola podrían ser los biocontroladores naturales responsables de la supresividad de estos suelos a los fitonematodos.

Tabla 5. Aislamientos de hongos endofíticos provenientes de suelos supresivos medianamente supresivos y no supresivos de Sixaola, Costa Rica

Localidad	Género	Suelo Supresivo	Suelo Medianamente Supresivo	Suelo No Supresivo
Sixaola-Margarita	<i>Fusarium</i>	24	10	10
Sixaola-Margarita	<i>Trichoderma</i>	29	18	16
Sixaola-Margarita	Desconocido	19	14	7
	Total	62 (45%)	42 (31%)	33 (24%)

4.4. Actividad antagonista de los aislados endofíticos a nivel *in vitro*

4.4.1. Prueba de Parasitismo

Los 15 aislados endofíticos provenientes de suelos supresivos de Sixaola, que presentaron mejor crecimiento y mejor capacidad de formar mayor cantidad de inóculo medido por las unidades formadoras de colonias (cfu), fueron seleccionados para la prueba de parasitismo para conocer el potencial antagonista de los aislados endofíticos sobre *R. similis*. Los resultados presentados en la Tabla 6 demuestran que existieron diferentes grados de parasitismo entre los aislados endofíticos evaluados. El porcentaje de parasitismo varió de 3 a 78%. El mejor aislado Endofítico perteneciente al género *Trichoderma* (S2) presentó mayor porcentaje (78%), así como el menor porcentaje de parasitismos (3%). Estos resultados demuestran que dentro de un mismo género existen aislados que difieren significativamente en su actividad parasítica, por lo cual es indispensable realizar screening *in vitro* de aislados antes de seleccionar un prospecto antagonista. Resultados similares fueron encontrados por zum Felde (2002), quien, trabajando con aislados endofíticos pertenecientes a *Trichoderma* y *Fusarium*, encontró porcentajes de parasitismo que oscilaron entre 50 y 100 %.

Observaciones realizadas al microscopio demostraron que la actividad parasítica del hongo Endofítico se presenta mediante la adhesión de micro- y macro-esporas del hongo al cuerpo del nematodo y por recubrimiento del cuerpo del nematodo por el micelio del hongo (Figura 6). Estos mismos mecanismos de acción fueron reportados por Soto (2003), quien, trabajando con aislados endofíticos de *Trichoderma* spp. y *Fusarium* spp., pudo determinar que 24 horas después del cocultivo entre *R. similis* y los hongos tanto la adhesión de microsporas al cuerpo del nematodo como el recubrimiento completo del cuerpo del nematodo por el micelio del hongo causaban la muerte del nematodo.

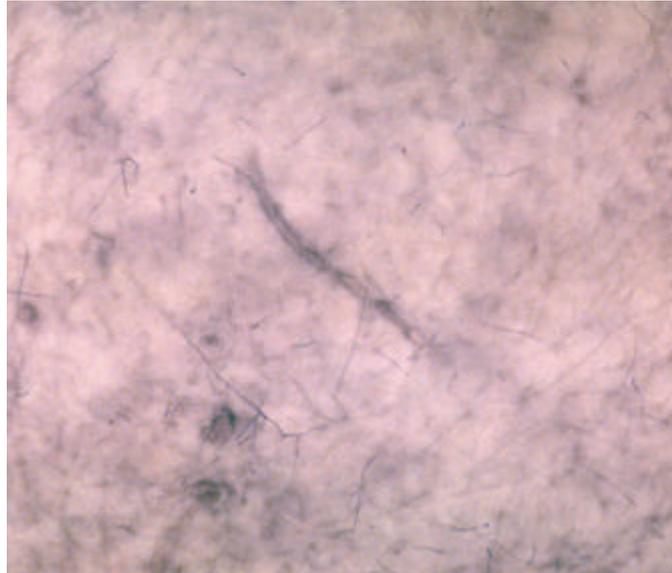


Figura 6. *Radopholus similis* parasitado por micelio del aislado *Trichoderma* S10

Tabla 6. Actividad parasítica de aislados de hongos endofíticos sobre el nematodo barrenador *Radopholus similis*, a las 24 horas.

Localidad	Código	Género	Porcentaje de parasitismo
Sixaola-Margarita	S2	<i>Trichoderma</i>	78 a
Sixaola-Margarita	S7	<i>Fusarium</i>	56 b
Sixaola-Margarita	S4	<i>Trichoderma</i>	38 c
Sixaola-Margarita	S15	<i>Trichoderma</i>	37 cd
Sixaola-Margarita	S9	<i>Fusarium</i>	33 d
Sixaola-Margarita	S14	<i>Trichoderma</i>	28 e
Sixaola-Margarita	S10	<i>Trichoderma</i>	26 e
Sixaola-Margarita	S11	<i>Fusarium</i>	14 f
Sixaola-Margarita	S3	<i>Fusarium</i>	13 fg
Sixaola-Margarita	S5	<i>Fusarium</i>	13 fg
Sixaola-Margarita	S6	Desconocido	12 fg
Sixaola-Margarita	S8	<i>Trichoderma</i>	12 fg
Sixaola-Margarita	S13	<i>Trichoderma</i>	12 fg
Sixaola-Margarita	S1	Desconocido	8 g
Sixaola-Margarita	S12	<i>Trichoderma</i>	3 h
	To	Control	0 i

En cada variable las cifras seguidas de una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas (> 0.0001), aplicado la prueba de Duncan.

4.4.2. Prueba de antibiosis (metabolitos secundarios)

Está completamente comprobado que ciertos hongos endofíticos que han sido evaluados por repetidas veces en condiciones *in vitro* pueden producir sustancias tóxicas que pueden causar la inmovilización y mortalidades superiores al 90% en *Meloidogyne* spp., *Pratylenchus* spp. y *R. similis* (Schuster *et al.*, 1995, Hallman y Sikora, 1996, zum Felde, 2003)

En la presente investigación, la capacidad de producción de metabolitos secundarios de los aislados endofíticos fue evaluada para conocer su actividad biocontroladora sobre *R. similis*. La Tabla 7 demuestra que existieron diferencias significativas entre los aislados endofíticos sobre la mortalidad de *R. similis* 24 horas después de la exposición del nematodo a la suspensión metabólica. La mortalidad varió de 10 a 98% de mortalidad de *R. similis*, siendo el aislado *Fusarium* S9 el cual presentó mayor actividad nematocida. Por otra parte, la sustancia metabólica tuvo un efecto directo sobre la mortalidad de *R. similis*: concentraciones de 100% de la suspensión metabólica causaron una mayor mortalidad que las otras concentraciones. Sin embargo, concentraciones de 25% del aislado *Fusarium* S9 produjeron mortalidades de 55% de *R. similis*, 24 horas después de la exposición. Estos resultados sugieren una alta toxicidad de los metabolitos secundarios producidos por este hongo. Hallmann y Sikora (1996), trabajando con metabolitos secundarios producidos por hongos endofíticos, demostraron que especies de *Fusarium oxysporum* son los aislados que tienen mayor capacidad de producir sustancias tóxicas para nematodos.

Tabla 7. Efecto antagonista de cuatro concentraciones de metabolitos secundarios sobre *Radopholus similis*. Promedio de mortalidad a las 24 horas/ 100 nematodos.

Tratamiento	Género de aislado endofítico	Concentración 100%	Concentración 75%	Concentración 50%	Concentración 25%
S9	<i>Fusarium</i>	98 a	97 a	77 a	55 a
S2	<i>Trichoderma</i>	90 a	81 ab	39 b	25 b
S5	<i>Fusarium</i>	82 ab	63 bc	52 b	10 c
S6	Desconocido	72 b	56 c	53 b	14 bc
S14	<i>Trichoderma</i>	47 c	16 de	4 d	4 c
S4	<i>Trichoderma</i>	43 cd	29 de	19 cd	14 bc
S12	<i>Fusarium</i>	34 cde	28 de	15 cd	8 c
S10	<i>Trichoderma</i>	30 de	33 d	15 cd	7 c
S3	<i>Fusarium</i>	27 ef	20 de	9 cd	4 c
S13	<i>Trichoderma</i>	23 efg	22 de	18 cd	11 c
S8	<i>Trichoderma</i>	22 efg	23 de	19 cd	11 c
S11	<i>Fusarium</i>	21 efg	18 de	21 c	9 c
S7	<i>Fusarium</i>	13 fg	11 e	16 cd	10 c
S15	<i>Trichoderma</i>	11 g	21 de	15 cd	12 c
S1	Desconocido	10 g	9 e	10 cd	12 c
To	Control	0 h	0 f	0 e	0 d

En cada variable las cifras seguidas de una misma letra no tienen diferencias estadística significativa (> 0.0001), aplicado la prueba de Duncan.

4.5. Actividad antagonista de los aislados endofíticos a nivel *in vivo*

Tomando de referencia la actividad biocontroladora a *R. similis* de los 15 aislados endofíticos evaluados, se seleccionaron cuatro aislados endofíticos que presentaron mayor porcentaje de parasitismo y de mortalidad de *R. similis* en las pruebas *in vitro*. Asimismo se incluyeron los aislados T12 correspondiente al género *Trichoderma* y el aislado T5 correspondiente a *Fusarium* por su conocida actividad biocontroladora contra *R. similis* encontrada por zum Felde (2002) y reconfirmada por Soto (2003). Microcormos de plátano del cultivar Curraré y vitroplantas del cultivar Gran Enano

fueron protegidas con los seis hongos endofíticos para determinar su actividad antagonista a *R. similis* en condiciones de invernadero.

Los resultados presentados en la Tabla 8 y Figura 7 demuestran que plantas de plátano protegidas con hongos endofíticos presentaron reducciones significativas en la población final de *R. similis* en comparación con plantas no inoculadas con hongos endofíticos. El aislado *Fusarium* S9 provocó una reducción de 88 % y el aislado *Trichoderma* S10 de 79 %. Ambos aislados endofíticos superaron a los prospectos de suelos supresivos de Guatemala, *Trichoderma* T12 y *Fusarium* T5.

Estos resultados demuestran que el potencial antagonista presente en suelos supresivos está relacionado con la presencia de aislados endofíticos que son capaces de causar mortalidades de *R. similis* e impedir su reproducción en el sistema radical de plátano. zum Felde (2002) y Soto (2003), trabajando con aislados endofíticos provenientes de suelos supresivos de Guatemala encontraron reducción en la reproducción de *R. similis* en el sistema radical de Gran Enano superiores a 83 %. Los mismos autores también encontraron que los aislados más efectivos para el biocontrol de *R. similis* pertenecen a los géneros *Fusarium* y *Trichoderma*. El potencial antagonista de aislados endofíticos perteneciente a especies no patógenicas de *Fusarium* contra *R. similis* ha sido ampliamente documentado por varios autores (Pocasangre 2000, Pocasangre *et al* 2000, Niere, 2001, zum Felde, 2002 y Soto, 2003).

Los resultados presentados en la Tabla 9 y Figura 7 demuestran que plantas de banano protegidas con hongos endofíticos presentaron reducciones hasta de 86% en la población final de *R. similis* en el sistema radical en comparación con plantas no protegidas. Por otra parte los aislados *Fusarium* S9 y *Trichoderma* S10 fueron los que mayor reducciones provocaron, 86 y 76% respectivamente. Estos resultados comprueban la consistencia del biocontrol de estos aislados tanto en cultivares de plátano como de banano.

El potencial antagonista de hongos endofíticos para el control de *R. similis* en diferentes cultivares y genomas de banano fueron estudiados por Pocasangre (2000), quien encontró que hongos endofíticos eran capaces de reducir hasta entre 79 a 90%

la población final de *R. similis* en el sistema radical de plantas de los cultivares e híbridos: Gran Enano (AAA), Williams (AAA), Gros Michel (AAA) FHIA 01(AAAB), FHIA 23 (AAAA), lo cual demuestra que el efecto antagonista de los hongos endofíticos no está limitado a un grupo genético de *Musa* en particular.

Por otra parte, es importante destacar que la cantidad de *R. similis* recuperada del suelo de las maceteras donde se sembraron plantas protegidas con hongos endofíticos tanto en plátano como en banano fue significativamente inferior que en los suelos que fueron sembradas plantas control. Por otro lado, el aislado *Fusarium* S9 presentó la menor cantidad de nematodos en el suelo tanto plátano como banano. Estos resultados sugieren que existe un efecto biocontrolador a nivel del suelo y que posiblemente los hongos endofíticos estimulen a la planta a liberar exudados que pueden ser tóxicos para los nematodos presentes en el suelo. Este efecto biocontrolador es importante tomando en consideración que *R. similis* es un nematodo migratorio que puede salir del sistema radical y buscar colonizar nuevos sitios parasíticos en el sistema radical y durante la migración puede ser inmovilizado por los exudados de las raíces o por sustancias tóxicas producidas por los hongos. Resultados similares fueron encontrados por Pocasangre (2000), quien encontró que la población final de *R. similis* en el suelo donde sembraron plantas protegidas con hongos endofíticos presentaban reducciones significativas en la población final de *R. similis* en comparación con suelos de plantas control.

Con relación a la promoción de crecimiento que los hongos endofíticos pueden ejercer sobre las plantas la Tabla 8 y Figuras 8 y 9 demuestran que plantas de plátano protegidas con hongos endofíticos presentaron mejor crecimiento radical que plantas testigo. Tanto en plátano como en banano los aislados *Fusarium* S9 y *Trichoderma* S10 presentaron los mejores pesos del sistema radical. Lo cual demuestra que ambos aislados no solamente tienen un efecto biocontrolador del nematodo, sino que también promueven el crecimiento radical de las plantas. Con relación al peso del follaje existieron diferencias significativas solamente en banano, plantas protegidas con los aislados *Fusarium* S9 y *Trichoderma* S10 presentaron los mejores pesos foliar que plantas control. En el caso de plátano, no se detectaron diferencias, posiblemente por la variabilidad del material de las plantas originadas por microcormos de 200 a 300 gramos. En el caso de banano se detectaron diferencia

posiblemente por la uniformidad de vitroplanta utilizadas, lo cual permitió expresar el efecto de promoción de crecimiento de los hongos endofíticos. El potencial de promoción de crecimiento de aislados endofíticos pertenecientes a especies de *Fusarium* fue estudiado por Reissinger (1995), quien encontró que en bananos de altura de África (*Musa AAB*) plantas inoculadas con *Fusarium oxysporum* aislado V4W5 promovió significativamente el crecimiento radical y foliar de plantas en comparación con plantas control.

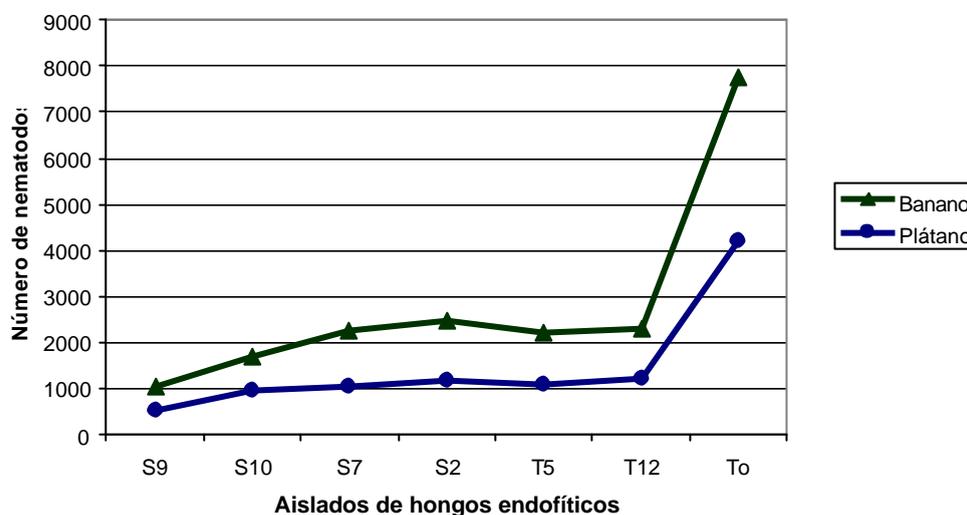


Figura 7. Efecto de seis aislados endofíticos sobre la reproducción de *Radopholus similis* en el sistema radical dos cultivares de plátano y banano después de dos meses de inoculados con nematodos.

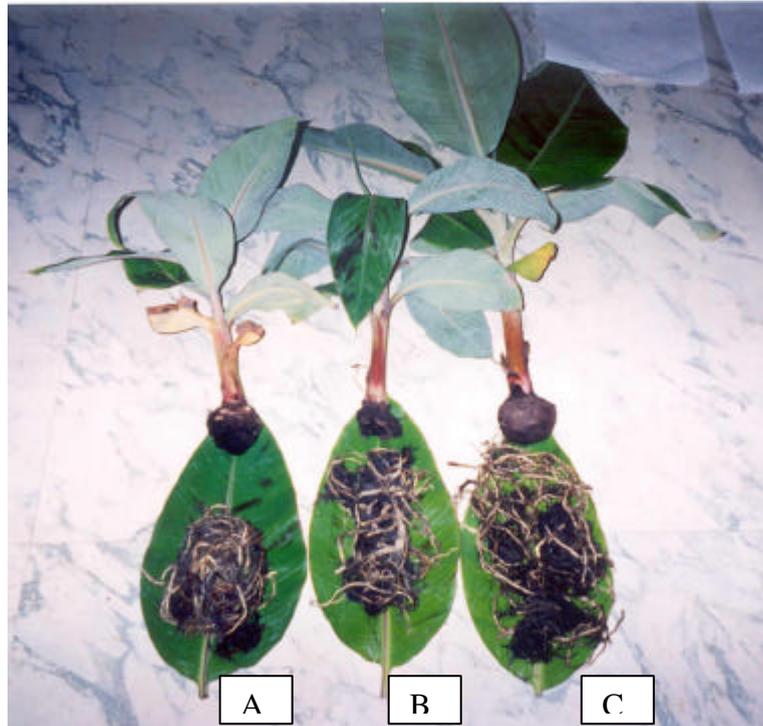


Figura 8. Efecto de la promoción de crecimiento del aislado *Fusarium* S9 sobre plantas de plátano: A. Planta sin hongo endofítico con nematodos, B. Planta sin hongo endofítico sin nematodos, C. Planta con hongo endofítico con nematodos.

Tabla 8. Efecto de seis hongos endofíticos sobre la reproducción *Radopholus similis* en el sistema radical de plantas de plátano “Curraré” (*Musa* sp. AAB) a dos meses de inocular con el nematodo.

Aislado	Genero Hongo Endofítico	Número de Nematodos raíz	Peso de Raíz	Número de Nematodos suelo	Peso de follaje
S9	<i>Fusarium</i>	500 d (-88%)	101.00 a	74 c (-89%)	400.99 ns
S10	<i>Trichoderma</i>	863 cd (-79%)	84.20 ab	158 bc (-77%)	316.60 ns
*T12	<i>Trichoderma</i>	1200 bc (-71%)	80.60 b	232 ab (-66%)	377.11 ns
*T5	<i>Fusarium</i>	1075 cd (-74%)	88.50 ab	296 a (-56%)	380.22 ns
S7	<i>Fusarium</i>	1025 cd (-76%)	79.00 b	294 a (-57%)	346.60 ns
S2	<i>Trichoderma</i>	1150 cd (-73%)	60.10 c	295 a (-57%)	372.75 ns
To	Control	4188 a	62.20 c	685 a	337.55 ns
TA	Control		75.99 bc		342.74 ns

*: Hongos Endofíticos de suelo supresivo Guatemala usados como control probado.

En cada variable las cifras seguidas de una misma letra no tienen diferencias estadísticas significativas (> 0.0001), aplicando la prueba de Duncan.

Tabla 9. Efecto de seis hongos endofíticos sobre la reproducción *Radopholus similis* en el sistema radical de vitroplantas de banano “Gran Enano” (*Musa* sp. AAB) a dos meses de inocular con el nematodo.

Aislado	Genero Hongo Endofítico	Número de Nematodos raíz	Peso de Raíz	Número de Nematodos suelo	Peso de follaje
S9	<i>Fusarium</i>	525 d (-86%)	54.70 a	79 d (-88%)	83.10 a
S10	<i>Trichoderma</i>	750 cd (-79%)	43.20 b	285 b (-57%)	77.60 ab
*T12	<i>Trichoderma</i>	1100 cd (-69%)	38.60 bcd	186 b (-72%)	74.00 ab
*T5	<i>Fusarium</i>	1138 cd (-68%)	30.00 d	205 b (-69%)	55.90 bc
S7	<i>Fusarium</i>	1225 bc (-66%)	32.20 cd	291ab (-56%)	51.40 c
S2	<i>Trichoderma</i>	1338 b (-63%)	41.20 bc	374 ab (-43%)	58.50 bc
To	Control	3575 a	41.60 bc	660 a	72.00 abc
TA	Control		47.90 ab		70.40 abc

*: Hongos Endofíticos de suelo supresivo de Guatemala usados como control probado. En cada variable las cifras seguidas de una misma letra no tienen diferencias estadística significativa (> 0.0001), aplicado la prueba de Duncan.

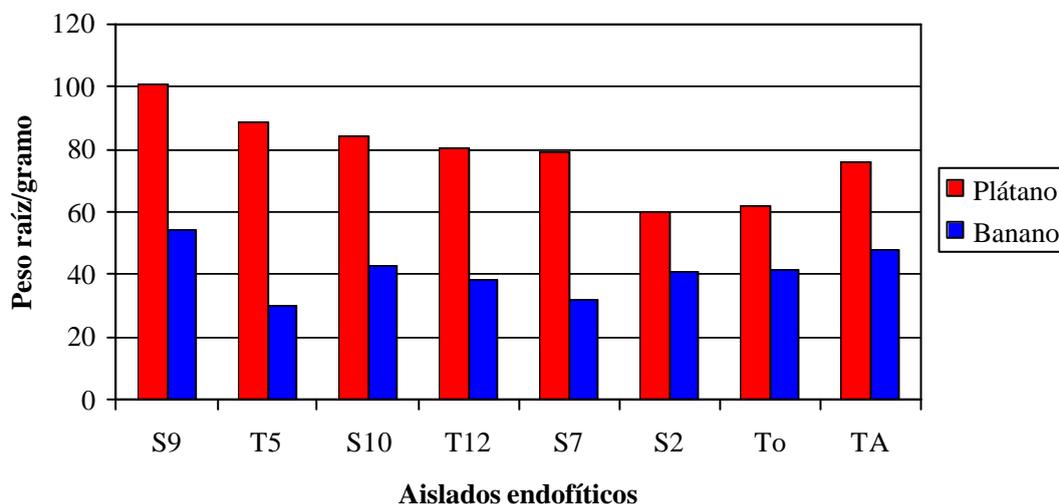


Figura 9. Efecto de seis aislados de hongos endofíticos en peso del sistema radical de dos cultivares: plátano (*Musa* sp. AAB) y banano (*Musa* sp. AAA), después de dos meses de inoculado el nematodo en la prueba *in vivo*.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

1. La composición de las poblaciones de nematodos asociados al sistema radical de plátano fue similar en suelos supresivos, moderadamente supresivos y no supresivos. *Radopholus similis* fue la especie predominante en los tres suelos estudiados seguido de *Pratylenchus coffeae*, *Helicotylenchus multicinctus* y *Meloidogyne incognita*.
2. El método directo de supresividad medido por la densidad de poblaciones de nematodos en el sistema radical demostró diferencias significativas entre la cantidad de nematodos presentes en raíces provenientes de suelos supresivos en comparación con suelos moderadamente supresivos y no supresivos. Sin embargo, no se detectaron diferencias entre moderadamente supresivo y no supresivo.
3. El estudio de dinámica de poblaciones de fitonematodos en el tiempo demostró que los suelos supresivos mantienen su efecto supresor a fitonematodos durante el periodo en estudio. Por otro lado, los suelos medianamente supresivos no mostraron ningún efecto supresor a fitonematodos.
4. El método indirecto de supresividad demostró que en suelos no esterilizados la cantidad de fitonematodos extraídos fue significativamente inferior en suelos supresivos que en suelos medianamente supresivos y no supresivos. Asimismo, la estabilidad de la supresividad se mantuvo consistente durante las cuatro evaluaciones consecutivas.
5. Los resultados de las pruebas de parasitismo demostraron que existen diferentes gradientes de parasitismo entre los aislados endofíticos evaluados sobre *R. similis*. El porcentaje de parasitismo varió entre 3 y 78%.

6. Los resultados de las pruebas de antibiosis demostraron que existen diferentes gradientes de mortalidad entre los aislados endofíticos evaluados sobre *R. similis*. El porcentaje de mortalidad varió entre 10 y 98%.
7. Microcormos de plátano del cultivar Curraré protegidos con hongos endofíticos presentaron reducciones significativas en la población final de *R. similis* en el sistema radical en comparación con plantas no protegidas. El gradiente de reducción varió entre 71 y 88 %.
8. Los aislados de *Fusarium* S9 y *Trichoderma* S10, provenientes de suelos supresivos de Sixaola, fueron los que presentaron mayor reducción en la población final de *R. similis* en el sistema radical, oscilando entre 88% y 79 % respectivamente, superando a los aislados *Fusarium* T5 y *Trichoderma* T12 provenientes de suelos supresivos de Guatemala que registraron reducciones entre 74 y 71% respectivamente.
9. Vitroplantas de banano del cultivar Gran Enano protegidas con hongos endofíticos presentaron reducciones significativas en la población final de *R. similis* en comparación con plantas no protegidas. El grado de biocontrol varió entre 63 y 88%. Al igual que en plátano, los aislados *Fusarium* S9 y *Trichoderma* S10 presentaron reducciones entre 88 y 79%, respectivamente, superando a los aislados endofíticos de Guatemala.
10. Plantas de plátano y banano protegidas con hongos endofíticos presentaron mayor peso radical y foliar que planta control. Plantas inoculadas con el aislado *Fusarium* S9 experimentaron incrementos en peso del sistema radical entre 38% y 24%, en plátano y banano respectivamente.

5.2. RECOMENDACIONES

1. Se recomienda realizar investigaciones con plantas protegidas con hongos endofíticos en condiciones de campo con el objeto de evaluar la actividad antagonista de los aislados prospectos *Fusarium* S9 y *Trichoderma* S10, así como conocer la durabilidad de la protección que estos hongos confieren a las plantas
2. Es importante realizar estudios sobre el mecanismo de acción de los hongos endofíticos responsable del biocontrol de fitonematodos, especialmente sobre parasitismo y antibiosis.
3. Se recomienda realizar estudios de split root system con los aislados prospecto *Fusarium* S9 y *Trichoderma* S10 con el objeto de determinar si estos hongos pueden inducir resistencia a fitonematodos.
4. Es importante evaluar la actividad antagonista de los aislados *Fusarium* S9 y *Trichoderma* S10 en otros cultivos donde fitonematodos son un problema en la producción

5. BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Agrios, G.N. 1998. Fitopatología. Control de las enfermedades de las plantas. Trad. M. Guzmán Ortiz. México. Limusa. 193-194 p.
- Amin, N. 1994. Untersuchungen über die Bedeutung endophytischer Pilze für die biologische Bekämpfung des wandernden Endoparasiten *Radopholus similis* (Cobb) Thorne an Bananen. Ph.D. Thesis, University of Bonn, 112 pp.
- Alves, E.J. 1993. programa de melhoramiento genetico da banana e do plátano na EMBRAPA/CNPMPF; planejamento, implatacao e progressos. Revista Brasileira de Fruticultura, Cruz das Almas. 15(3):83-94,993.
- Araya, M; Centeno, M; Carrillo, W. 1995. Densidades poblacionales y frecuencias de los nematodos parásitos del banano (*Musa* AAA) en nueve cantones de Costa Rica. CORBANA 20(43): 3-6.
- Araya, M. 1999. Metodología usada en el laboratorio de Nematología de CORBANA s.a. para la extracción de nematodos de las raíces del banano (*Musa* sp. AAA). 16 p.
- Araya, A. 2000. *Musa* sp. (en línea). Consultado el 22 oct. 2003. Disponible en http://www.mag.go.cr/tecnologia/tec_platano.htm.
- Araya, M. 2003. Situación actual del manejo de nematodos en banano (*Musa* AAA) y plátano (*Musa* AAB) en el Trópico Americano. In Taller: manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas. (2003, Guayaquil, Ecuador). Programa y resúmenes. sl. MUSALAC/INIBAP/FUNDAGRO. pp. 31-33.

- Baker, RR.; Dunn, PE. eds. 1990. New direction in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases; proceedings of a UCLA colloquium, Frisco, Colorado, 1989. New York, Alan R. Liss. 837 p.
- Baker, RR.; Paulitz, TC. 1996. Teorical basis for microbial interactions leading to biological control of soil-borne plant pathogens. In: Managing soil-borne plant pathogens (1996). Minnesota, USA. Robert May. ed. The American Phytopathological Society. p. 50-79.
- Belalcázar, S; Rosales, FE; Pocasangre, LE. 2003. Formación y desarrollo de las raíces de plátano (*Musa* AAB Simmonds). In Symposium Internacional Sistema radical del banano: hacia un mejor conocimiento para su manejo productivo (2003, San José Costa Rica). Programa y resúmenes. San José Costa Rica. pp. 42.
- Bridge, J. 1993. Worldwide distribution of the major nematode parasites of banana and plantain. In biological and integrated control of highland banana and plantain pest and diseases.(Eds. By C.S. Gold and B. Gemmill). Cotonou, Benin. pp.:185-198.
- Calvo, C; Araya, M. s.f. Muestreo de nematodos en banano *Musa* AAA. CORBANA. La Rita, Guápiles, CORBANA, Costa Rica. (Plegable).
- Cámara Nacional de Productores de Plátano. 2001. Aplicación y renovación de 1200 ha. de plátano para exportación en la Zona Atlántica.. Asociación de Productores de Plátano Margarita-Sixaola, Limón, Costa Rica. 49 p.
- Carballo, M. 2002. Control biológico y bioplaguicidas. Turrialba, Costa Rica, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Notas para publicar. SN.
- Carroll, GC. 1990. Fungal endophytes in vascular plants: Mycological research opportunities in Japan. Trans. Mycol. Soc. Japan, 31:103-116.

- Cazorla, FM. 2003. Pseudomonas por los suelos: Biocontrol en la rizósfera. (en línea). Madrid, España. Consultado 8 nov. 2003. disponible en <http://www.ciencias.uma.es/publicaciones/encuentro61/pseudomonas.html>.
- Chávez, C; Araya, M. 2001. Frecuencia y densidades poblacionales de los nematodos parásitos de las raíces del banano (*Musa* AAA) en Ecuador. *Nematropica* 31(1): 25-36.
- Clay, K.1988. Fungal endophytes of grasses: A defensive mutualism between plant and fungi. *Ecology*, 69: 2-9.
- Coto, J; Aguilar, JF; Krigsvold, D. 2002. Producción de cormos de plátano para siembra directa en campo. In Rosales, FE; Pocasangre, L. Oferta tecnológica de banano y plátano para América Latina y el Caribe. Una contribución de MUSALAC a la investigación y desarrollo de las Musáceas. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y Plátano, Montpellier, Francia. INIBAP/MUSALAC/CEDAF. pp. 47-48.
- Coyne, M. 1999. Microbiología del suelo: un enfoque exploratorio. La mesofauna: nematodos. Trad. M. Rasskin. Madrid, España. Editorial Paraninfo. p. 52.
- Dadzie, BK; Orchard, JE. 1997. Evaluación rutinaria postcosecha de híbridos de bananos y plátanos: criterios y métodos. Montpellier, Francia, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y el Plátano, 63p. (Guías técnicas INIBAP 2).
- Dantas, JLL; Shepherd, W; Dos S. Soares Filho, ZJ; Cordeiro, S; DoO. E Silva, EJ; Alves, A; Da S. Sous y Oliveira. 1993. Programa de melhoramento genético da bananeira em execução no CNPMF/EMBRAPA: Abanicos obtidos, Cruz das Almas: EMBRAPA-CNPMF . 43 p. (EMBRAPA/CNPMF. Documentos, 47).
- Davide, RG. 1996. Overview of nematodes as a limiting factor in *Musa* production. In : New frontiers in resistance breeding for nematode, Fusarium and Sigatoka.

- Eds. Frison, E.A.; Horry, J.P.; De Waele, D. INIBAP, Montpellier France,. pp. 27-31.
- Deverall, B; Dan, E. 1995. Induced resistance in legumes. *In*: P. Hammerschmidt; J. Kuc. eds. Induced resistance to disease in plants. The Netherlands, Kluwer. Academic publisher. pp 152-168.
- 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.
- Durán, LF; Krigsvold, D. 2002. Evaluación de la reacción de genotipos de Musáceas al ataque de nematodos. *In* Rosales, FE; Pocasangre, L. Oferta tecnológica de banano y plátano para América Latina y el Caribe. Una contribución de MUSALAC a la investigación y desarrollo de las Musáceas. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y Plátano, Montpellier, Francia. INIBAP/MUSALAC/CEDAF. pp. 49-50.
- Esquivel H, A. 1999. Los nematodos como agentes causales de las enfermedades en las plantas. *In* German Rivera Coto. Conceptos introductorios a la Fitopatología. 1. ed. San José, Costa Rica. EUNED. pp.107-126.
- Figueroa M, A. 1998. Dinámicas poblacionales de cuatro géneros de nematodos parásitos en plátano (*Musa* AAB, Subgrupo plátano, cv. Curraré). *In* Sandoval F, JA; Vargas V, R. editores. La divulgación científica al servicio del productor bananero nacional, San José, Costa Rica, Corporación bananera Nacional CORBANA, pp. 46-50.
- Fogain, R; Gowen, SR. 1997. Damage to roots of *Musa* cultivars by *Radopholus similis* with and without protection of nematicides. *Nematopica*, 27 (1): 27-32.
- Fraga, CP. 1978. Introducción a la nematología agrícola. Actualización y revisión: Rodríguez M, M; Sisler de, G. 2 ed. Editorial Hemisferio Sur. 119 p.

- Frison, EA. 1998. Integrated pest management: an overview. *In* Frison, EA; Gold, CS; Karamura EB and Sikora, RA., editors. 1999. Mobilizing IPM for sustainable banana production in Africa. Proceeding of workshop on banana IPM held in Nelspruit, South Africa, 23-28 November 1998. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France. p. 14.
- González R, JB; Fernández G, E. 2003. Manejo alternativo de nematodos en musáceas. *In* Taller Manejo convencional y alternativo de la Sigatoca negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de las Musaceas. (2003, Guayaquil, Ecuador). Programa y resúmenes. sl. MUSALAC/INIBAP/FUNDAGRO. pp.36-37.
- Gowen, SR. 1995. Bananas pests. *In*: Gowen, SR. ed. Bananas and Plantain. Chapman and Hall, London, UK. pp. 382-402.
- Gowen, S; Quénehervé, P. 1990. Nematode parasite of banana, plantain and abaca. *In* plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Eds. Luc, M., Sikora, R.A. and Bridge, J. CAB International. pp. 431-460.
- Hallmann, J; Sikora, RA. 1994. Influence of *Fusarium oxysporum*, a mutualistic fungal endophyte, on *Meloidogyne incognita* infection of tomato. *Journal of Plant Disease and Protection*, 101(5):475-481.
- 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.
- Hanson, P; Hilje, L. 1993. Control biológico de insectos, Turrialba, CR. Centro Agronómico Tropical de investigación y Enseñanza (CATIE). 40 p. (Serie Técnica. Informe Técnico / CATIE no. 208).
- Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), 1991. el cultivo del plátano (*Musa* AAB Simmonds).

- Kashaija, IN; Fogain, R; Speijer, PR. 1998. Habitat management for control of banana nematodes. *In* Frison, EA; Gold, CS; Karamura EB and Sikora, RA., editors. 1999. Mobilizing IPM for sustainable banana production in Africa. Proceeding of workshop on banana IPM held in Nelspruit, South Africa, 23-28 Noviembre 1998. International Network for the Improvement of Banana and Plantain, Montpellier, France. p. 115.
- Jeger, MJ; Waller, JM; Johanson, A; Gowen, SR. 1996. Monitoring in banana pest management. *Crop Protection*, 15 (4): 391-397.
- Jenkins, WR; Taylor, DP. 1967. *Plant Nematology*. New York, Reinhold Publishing Corporation. 270p.
- Jones, DR; Diekmann, M. 2000. Quarantine and the safe movement of *Musa* germoplasm. *In*: Disease of Banana, Abaca and Enset ed. DR. Jones. CAB international, Wallingford, Oxon, UK, pp. 409-423.
- Latch, GCM. 1993. Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts. Biotic stress tolerance imparted to grasses by endophytes. *Agriculture, Ecosystems and Environments*, 44:143-156.
- León, J. 2000. *Botánica de los cultivos tropicales*. 3 ed. San José, Costa Rica, Editorial Agroamérica. 522 p.
- Lescot; L. 2000. Importancia de los plátanos de cocinar en África: Oportunidades para las zonas subtropicales. *Infomusa* 9(1): 25-28.
- Malinowski DP; Belesky, DP. 2000. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science*. 40(4):923-940.
- Marcelino, LA; González,V. 2002. manejo de cormitos de plátano AAB, para la producción de plantas en viveros. *In* Rosales, FE; Pocasangre, L. Oferta tecnológica de banano y plátano para América Latina y el Caribe. Una

- contribución de MUSALAC a la investigación y desarrollo de las Musáceas. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y Plátano, Montpellier, Francia. INIBAP/MUSALAC/CEDAF. pp. 67-69.
- Marín, D.H.; Barker, K.R.; Kaplan, D.T.; Sutton, T.B.; Opperman, C.H. 1999. Aggressiveness and damage potential of Central American and Caribbean Populations of *Radopholus* spp. in banana. *Journal of Nematology*. 31(4):377-385.
- Marín, D.H. 2003. Investigaciones en el progreso y perspectivas a futuro en el manejo del sistema radicular. *In* Symposium Internacional Sistema radical del banano: hacia un mejor conocimiento para su manejo productivo (2003, San José Costa Rica). Programa y resúmenes. San José Costa Rica. pp. 23-24.
- Moens, T; Araya, M; Swennen, R; De Waele, D. 2003. Biodegradación acelerada de nematocidas después de aplicaciones repetidas en una plantación comercial de banano. *In* Taller Manejo convencional y alternativo de la Sigatoca negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de las Musáceas. (2003, Guayaquil, Ecuador). Programa y resúmenes. sl. MUSALAC/INIBAP/FUNDAGRO. Pp. 35-36.
- Moore, N.Y.; Pegg, K.G.; Smith, L.J.; Langdon, P.W.; Bentley, S.; Smith, M.K. 1999. Fusarium wilt of banana in Australia. *In* banana Fusarium wilt management: Towards sustainable cultivation. pp 64-75.
- Niere, B.I.; Speijer, P.R.; Gold, C.S.; Sikora, R.A. 1998. Fungal endophytes from bananas for the biocontrol of *Radopholus similis*. *In* Frison, E.A.; Gold, C.S.; Karamura, E.B.; Sikora, R.A. Editors. Mobilizing IPM Sustainable Banana Production in Africa, Montpellier, France, International Network for the Improvement of Banana and Plantain. pp. 313-318.
- Petrini, O.; Sieber, T.N.; Toti, L.; Viret, O. 1992. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins*. 1:185-196.

- Pinochet, J. 1986. A note on nematode control practice on bananas in Central America. *Nematropica*, 16 (2):197-203.
- Pocasangre, L; Sikora, RA; Vilich, V; Schuster, RP. 2000. Encuesta sobre los hongos endofíticos del banano de América Central y el cribado para el control biológico del nematodo barrenador (*Radopholus similis*), *INFOMUSA* 9(1): 3-5.
- Pocasangre, L; Sikora, RA; Vilich, V; Schuster, RP. 2000. Survey of banana endophytic fungi from Central America and screening for biological control of *Radopholus similis*. *Acta Horticulturae*, 531: 283-289.
- Pocasangre, L. 2000. Biological enhancement of banana tissue culture plantlets with endophytic fungi for the control of the burrowing nematode *Radopholus similis* and the Panamá disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*). Ph. D. Tesis. Universidad de Bonn. 95 p.
- Pocasangre, L.; Sikora, RA; Araya, M. 2001. Estado actual de la situación nematológica en los bananos y plátanos en América Latina. *PROMUSA*. *INFOMUSA*. Vol. 10(2):1-12.
- Pocasangre, L. 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, L; Rosales, FE. editores. 2002. inducción de resistencia y uso de tecnologías limpias para el manejo de plagas en plantas. Memoria del taller internacional realizado en CATIE, Turrialba Costa Rica, 27-30 de agosto, pp. 33-39.
- Pocasangre, L. 2003. Nuevas estrategias para el manejo de nematodos en musáceas. *In* Taller Manejo convencional y alternativo de la Sigatoca negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de las Musáceas. (2003, Guayaquil, Ecuador). Programa y resúmenes. sl. MUSALAC/INIBAP/FUNDAGRO. p.38.
- Reissinger, A. 1995. Untersuchungen zur Wirkung endophytischer Pilze aus Bananenwurzeln auf *Radopholus similis*. Diplomarbeit, University of Bonn, 76.

- Rivera C, G. 1999. Conceptos introductorios a la fitopatología. Combate de enfermedades de plantas. Organismos antagónicos. 1. ed. San José, Costa Rica. EUNED. p. 223.
- Riveros, AS; Leopivre, P. 1998. Mecanismos de defensa asociados con la resistencia total en la interacción *M. figensis* –*Musa*. In: Seminario internacional sobre producción de plátano. Memorias del 4 al 8 de mayo de 1998. Quindío. Armenia, Colombia. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA, Universidad del Quindío, Servicio Nacional de Aprendizaje SENA, Quindío. Comité Departamental de Cafeteros de Quindío. pp 59-62.
- Rodríguez G, M; Morales Ch; JL; Chavarría C, JA. 1985. Producción de plátanos (*Musa* AAB, ABB), Turrialba, Costa Rica, Departamento de Producción Vegetal. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 74 p.
- Rojas R, S; Vargas, A. 2002. Rebrotos enteros nueva opción de reproducción de semilla en el cultivo de plátano de alto rendimiento. In Rosales, FE; Pocasangre, L. Oferta tecnológica de banano y plátano para América Latina y el Caribe. Una contribución de MUSALAC a la investigación y desarrollo de las Musáceas. Red Internacional para el Mejoramiento del Banano y Plátano, Montpellier, Francia. INIBAP/MUSALAC/CEDAF. pp. 27-28.
- Roman, J. 1978. Nematodos del bananero y el platanero. Fitonematología tropical. Universidad de Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico. pp. 93-115.
- Rosero R, A. 1987. Banano y plátano: enfermedades y plagas. 1 ed. Medellín, Colombia. Edición AUGURA. 68 p.
- Sandoval F, JA. 1998. Micropropagación de Musáceas. In Sandoval F, JA; Vargas V, R. editores. La divulgación científica al servicio del productor bananero nacional, San José, Costa Rica, Corporación bananera Nacional CORBANA, pp. 25-30.

- Sarah, JL. 1989. Bananas nematodes and their control in Africa. *Nematropica*, 19 (2): 199-217.
- Sarah, JL; Pinochet, J; Stanton, J. 1996. El nematodo barrenador del banano *Radopholus similis* Cobb. Plaga de *Musa* – Hoja divulgativa No. 1. Red internacional para el mejoramiento del banano y plátano, Montpellier, Francia.
- Sarah, JL. 1998. Las prácticas culturales como medio de control de nematodos en banano. *In* Rosales, FE; Tripon, SC; Cerna, J. editores. 1999. 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. Red internacional para el mejoramiento del banano y el plátano, Montpellier, Francia, pp. 138-151.
- Sarah, JL. 2000. Nematode pathogens: Burrowing nematode. *In* Disease of banana, abaca and enset. D.R Jones. Edited, CABI International, Wallingford, Oxon, UK, pp 295-303.
- Sasser, JN; Jenkins, WR. 1960. Nematology: Fundamentals and recent advances with emphasis on plant parasitic and soil forms. North Carolina Press. p. 339-415.
- Schipke, LG; Ramsey, MD. 1994. Control of banana burrowing nematode (*Radopholus similis*) by fenamiphos applied through micro-irrigation in North Queensland. *Australia Journal of Experimental Agricultural* 34:109-114.
- Schuster, RP; Sikora, RA; Amin, N. 1995. Potential of endophytic fungi for the biological control of plant parasitic nematodes. *Proceeding of the International Symposium on Plant Protection, Faculty of Agriculture, University of Gent. Belgium. Journal.* 60(3b). pp 1047-1052.
- Sikora, RA. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for biological control of plant parasitic nematodes. *Annu. Rev. Phytopathology*, 30:245-270.

- Sikora, RA; Schuster, RP. 1998. Novel approaches to nematode IPM. *In* Frison, EA; Gold, CS; Karamura, EB; Sikora, RA. Editors. Mobilizing IPM Sustainable Banana Production in Africa, Montpellier, France, International Network for the Improvement of Banana and Plantain. pp. 127-136.
- Sikora, RA. 2002. Characterization and importance of microbial biodiversity in agricultural soil-ecosystems for plant root health. *In* Riveros, AS; Pocasangre, L; Rosales, FE. 2002. inducción de resistencia y uso de tecnologías limpias para el manejo de plagas en plantas. Memoria del taller internacional realizado en CATIE, Turrialba Costa Rica, 27-30 de agosto, pp. 11-12.
- Soto, JC. 2003. Evaluación de cuatro hongos endofíticos élite provenientes de suelos supresivos para el control del nematodo barrenador del banano *Radopholus similis*. Tesis Lic. Universidad de Tolima. Tolima, Colombia. 120 p.
- Speijer, PR. 1993. Interrelationships between *Pratylenchus goodeyi* Sher & Allen of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Schl. Emd. Snyder & Hans. In roots of two banana cultivars. Ph. D. Thesis, University of Bonn, 200 pp.
- Speijer; PR; Sikora, RA. 1993. Influence of a complex involving *Pratylenchus goodeyi* and a non-pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* on banana root health. *In: Biological and Integrated Control of Highland Banana and Plantain Pest and Diseases*. Eds. Gold, CS; Gemmill, B. Cotonou, Benin. pp. 231-239.
- Speijer, PR; De Waele, D. 1997. Screening of *Musa* Germoplasm for resistance and tolerance to nematodes. *Inibap Technical Guidelines*. Montpellier, France. IPGRI/INIBAP. 47 p.
- Stover, RH; Simmonds, NW. 1987. Bananas 3era ed. Longmans Scientific and Technical, Harlow, Essex, UK. 468 p.
- Triviño G, C. 2003. Manejo de nematodos en musáceas del Ecuador. *In* Taller Manejo convencional y alternativo de la Sigatoca negra, nematodos y otras plagas

- asociadas al cultivo de las Musáceas. (2003, Guayaquil, Ecuador). Programa y resúmenes. sl. MUSALAC/INIBAP/FUNDAGRO. pp. 33-34.
- Vásquez, N. 2003. Anatomía y morfología de raíces de monocotiledóneas y dicotiledóneas. *In* Symposium Internacional Sistema radical del banano: hacia un mejor conocimiento para su manejo productivo (2003, San José Costa Rica). Programa y resúmenes. San José Costa Rica. pp. 30-31.
- Viaene, N; Abawi, G. 1997. Nematodos y patógenos del suelo. *In* Taller internacional sobre salud de suelos (9-14 noviembre 1997), El Zamorano, Honduras. pp. 24-31.
- Williams, TD; Bridge, J. 1985. Nematodos fitoparásitos. Manual para patólogos vegetales. Recopilado por Commonwealth Mycological Institute C.A.B. p.246.
- Wong, WC. 1986. *In vitro* propagation of banana (*Musa* spp.): Initiation, proliferation and development of shoot-tip culture on defined media. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 6:159-166.
- Yates, IE; Bacon, CW; Hinton, DM. 1997. Effects of endophytic infection by *Fusarium moniliforme* on corn growth and cellular morphology. *Plant Diseases* 81:723-728.
- Zum Felde, AKV. 2002. Screening of Endophytic Fungi from Banana (*Musa*) for Antagonistic Effects towards the Burrowing Nematode, *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. Thesis Mag. Sc. Bonn, Germany. Universität Bonn. 53 p.
- Zum Felde, A; Pocasangre, L; Sikora, RA; Mancilla, R. 2002. Estudios sobre poblaciones de hongos endofíticos provenientes de suelos supresivos al nematodo barrenador *Radopholus similis* en plantaciones comerciales de banano en Bandegua. *In* 2do encuentro de investigadores en Agricultura Orgánica (2,2002, CATIE, Turrialba) Memoria, Turrialba, Costa Rica, Proyecto Agroforestal CATIE/GTZ, pp. 73.

ANEXOS

Anexo 1. Análisis de variancia para la dinámica de población de Fitonematodos presentes en el sistema radical de plantaciones de plátano en tres gradientes de suelo y cuatro muestreos.

Periodo de muestreo	Género de nematodos	GL	C M	F calc.	Pr > F	C V
Primero	<i>Radopholus similis</i>	2	1.448	104.59	<.0001**	3.34%
	<i>Pratylenchus coffeae</i>	2	0.866	21.88	<.0001**	6.96%
	<i>Helicotylenchus multicinctus</i>	2	21.365	428.97	<.0001**	11.83%
	<i>Meloidogyne incognita</i>	2	7.486	8.57	0.0019*	67.23%
Segundo	<i>Radopholus similis</i>	2	3.977	107.35	<.0001**	5.84%
	<i>Pratylenchus coffeae</i>	2	3.168	11.79	0.0004*	19.28%
	<i>Helicotylenchus multicinctus</i>	2	10.363	10.42	0.0007*	64.72%
	<i>Meloidogyne incognita</i>	2	5.908	6.33	0.0070ns	66.41%
Tercero	<i>Radopholus similis</i>	2	0.309	11.10	0.0005*	5.19%
	<i>Pratylenchus coffeae</i>	2	0.217	29.61	<.0001**	3.33%
	<i>Helicotylenchus multicinctus</i>	2	2.923	18.35	<.0001**	20.95%
	<i>Meloidogyne incognita</i>	2	6.127	20.55	<.0001**	54.60%
Cuarto	<i>Radopholus similis</i>	2	0.942	126.03	<.0001**	2.86%
	<i>Pratylenchus coffeae</i>	2	0.474	11.45	0.0004*	9.17%
	<i>Helicotylenchus multicinctus</i>	2	7.650	71.99	<.0001**	22.81%
	<i>Meloidogyne incognita</i>	2	6.435	76.88	<.0001**	45.02%

Anexo 2. Composición de fitonematodos presentes en el sistema radical de plantaciones de plátano var. “Curraré” en tres gradientes de suelos durante cuatro periodos de muestreo.

Periodo de muestreo	Tipo de suelo	Género de Fitonematodo			
		<i>R. similis</i>	<i>P. coffeae</i>	<i>H. multicinctus</i>	<i>M. incignita</i>
Primero	Supresivo	1163 c	338 b	0 b	25 b
	Medianamente supresivo	7425 a	1363 a	800 a	188 a
	No supresivo	4500 b	1038 a	788 a	225 a
Segundo	Supresivo	338 b	175 c	13 b	75 b
	Medianamente supresivo	5325 a	1663 a	325 a	325 a
	No supresivo	5300 a	963 b	550 a	77 b
Tercero	Supresivo	1113 b	254 c	40 b	76 a
	Medianamente supresivo	2113 a	518 a	55 b	39 a
	No supresivo	2293 a	408 b	410 a	5 a
Cuarto	Supresivo	430 b	102 b	37 b	47 a
	Medianamente supresivo	1691 a	313 a	5 c	3 b
	No supresivo	1665 a	179 b	218 a	2 b

Promedios para cada periodo de muestreo. En cada variable las cifras seguidas de una misma letra no tienen diferencia estadística significativa ($Pr < .0001$) aplicando la prueba de Duncan

Anexo 3. Tratamiento: suelos esterilizado y no esterilizado, periodo de experimento, en el método indirecto de supresividad a *Radopholus similis*.

Fuente de Variación	GL	SC	CM	F	Pr > F
Suelos Est. y No Est.	5	223425.4010	44685.0802	27.48	< .0001**
Periodo de exper.	3	4576.0573	152338.68	93.68	< .0001**
Tratamiento x Periodo	15	66373.5365	4424.9024	2.72	< .0001**

Coefficiente de variación. 32.73%

Anexo 4. Comparaciones entre suelos esterilizados y no esterilizados en el método indirecto de supresividad a *Radopholus similis*.

CONTRASTES	GL	SC	CM	F	Pr > F
Suelo Estéril vrs No Estéril	1	45849.421	45849.421	26.89	< .0001**
SSNE vrs MSNE NSNE	1	79259.380	79259.380	46.48	< .0001**
SSE vrs MSE NSE	1	94164.083	94164.083	55.23	< .0001**

Coefficiente de variación: 32.73 %.

Anexo 5. Comparación de tratamientos de los periodos de experimentos en el método indirecto de supresividad a *Radopholus similis*.

F V	CM	F	Pr > F	C V %
Periodo 1	2274.78	5.17	0.0009*	45.01
Periodo 2	10691.32	6.28	0.0002*	32.65
Periodo 3	26488.68	10.87	< .0001**	27.17
Periodo 4	18525.0	9.24	< .0001**	32.42

Anexo 6. Actividad parasítica de hongos endofíticos promisorios sobre el nematodo barrenador *Radopholus similis*, evaluado a las 24 horas.

FV	GL	SC	CM	F	Pr > F
Hongos endofíticos	15	25081.82	1672.12	135.96	< .0001**
Error	48	590.33	12.30		
Total	63	25672.15			

Coefficiente de variación: 14.53%

Anexo 7. Antibiosis de hongos endofíticos promisorios en cuatro concentraciones de extractos crudos sobre el nematodo barrenador *Radopholus similis*.

FV	GL	SC	CM	F	Pr > F
Hongos endofíticos	14	1112.32	79.45	121.91	< .0001
Concentración (100, 75, 50 y 25%)	3	279.13	93.04	142.77	< .0001
Tratamiento x Concentración	42	210.30	5.01	7.68	< .0001
Tiempo (0, 8, 16 y 24 horas)	3	1089.32	363.12	557.17	< .0001
Tratamiento. x Tiempo	42	504.45	12.01	18.43	< .0001
Concentración x Tiempo	9	112.57	12.51	19.19	< .0001
Tratamiento x Concentración x Tiempo	126	201.10	1.60	2.45	< .0001
Error	540	351.92	0.65		
Total	959	4111.39			

Coefficiente de variación. 24.43%.

Anexo 8. Efecto en la prueba *in vivo* de los hongos endofíticos élite en la promoción de crecimiento de rebrotes de microcormos de plátano var. “Curraré” y la reproducción del nematodo barrenador *Radopholus similis*.

Variable	SC	CM	F	Pr > F
Altura de planta	100.57	14.37	1.50	0.1859 ns
Diámetro de planta	0.79	0.11	1.58	0.1602 ns
Número de hojas	9.25	1.32	1.83	0.1000 ns
Número de raíz	781.0	111.57	0.90	0.5100 ns
Peso de raíz	9998.75	1428.39	5.67	< .0001**
Peso del follaje	35934.5	5133.5	0.95	0.4785 ns
Peso total	43220.86	6174.41	0.95	0.4746 ns
Nematodos en la raíz	68.69	9.81	677.18	< .0001**
Nematodo /g. Raíz	15.01	2.14	120.47	< .0001**
Nematodo - sustrato	47.12	6.73	21.07	< .0001**

(*) = p < 0.05

(**) = p < 0.01

Anexo9. Efecto en la prueba *in vivo* de los hongos endofíticos élite en la promoción de crecimiento de vitroplantas de banano var. “Gran Enano” y la reproducción del nematodo barrenador *Radopholus similis*.

Variable	SC	CM	F	Pr > F
Altura de planta	213.625	30.52	5.53	< .0001 **
Diámetro de planta	0.76	0.11	2.51	0.0257 *
Número de hojas	15.56	2.27	4.47	0.0050 *
Número de raíz	206.11	29.44	3.63	0.0027 *
Peso de raíz	3580.73	511.53	5.25	0.0001 **
Peso del follaje	7128.17	1018.31	2.60	0.0215 *
Peso total	18894.97	2699.28	3.34	0.0048 *
Nematodos en la raíz	68.47	9.78	440.58	< .0001 **
Nematodo /g. Raíz	19.84	2.83	112.43	< .0001 **
Nematodo - sustrato	45.39	6.48	45.57	< .0001 **

(*) = P < 0.05

(**) = P < 0.01