



CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL
DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA

ESCUELA DE POSGRADO

**Uso de extractos acuosos de raquis de banano y *Tagetes* spp.
enriquecidos con bacterias y hongos endofíticos para el control
biológico de *Radopholus similis* (Cobb) Thorne**

por

Freddy Mauricio Llive Condor

Tesis sometida a consideración de la Escuela de Posgrado
como requisito para optar por el grado de

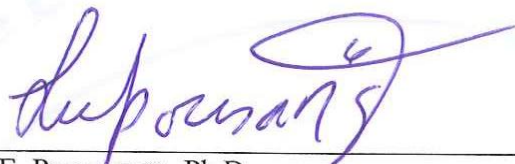
Magister Scientiae en Agricultura Ecológica

Turrialba, Costa Rica, 2009

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por la División de Educación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del Estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE EN AGRICULTURA ECOLÓGICA

FIRMANTES:



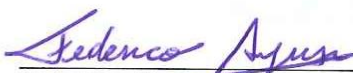
Luis E. Pocasangre, Ph.D.
Consejero Principal



Charles Staver, Ph.D.
Miembro Comité Consejero




Fernando Casanoves, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



Federico Ayuso, M.Sc.
Miembro Comité Consejero



Miguel Quesada, M.Sc.
Miembro Comité Consejero



Glenn Galloway, Ph.D.
Decano de la Escuela de Posgrado



Freddy Mauricio Llive Condor
Candidato

DEDICATORIA

A Dios nuestro señor

A la Virgencita del Quinche y Dolorosa

A mis Padres

A mi Tía Rosita

A mi amada esposa Yuliney Perdomo

A mis Hermanos

A mis Sobrinos

A mi Familia

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme el milagro de la vida y las bendiciones que he recibido.

A la Virgen del Quinche y Dolorosa por ser las madres espirituales que me ha acompañado y protegido toda la vida.

A mis padres Jorge Llive y Sara Condor, por darme la vida y brindarme incondicionalmente su apoyo en todo momento, enseñándome que con esfuerzo, sacrificio, entrega, comprensión y sobretodo amor se puede llegar muy lejos.

A mi Tía Rosita por ser mi segunda madre y ser una persona muy valiosa en mi vida.

A mi esposa preciosa Yuliney Perdomo (Osita) por amarme, acompañarme y apoyarme incondicionalmente todo este tiempo, por todos los bellos momentos compartidos en Costa Rica y sobretodo por ser un ejemplo de perseverancia, entrega y amor por la naturaleza.

A mis hermanos Wilson, Doris, Verónica, por ser el espejo en el cual me he reflejado en la vida, ser mis amigos y sobretodo por sus consejos.

A mis sobrinos Mayra, Santiago, Sarita, Ronny y Samanta, por ser esa luz que iluminan nuestra familia.

Al Dr. Luis Pocasangre, por su valiosa colaboración, entrega y dedicación con mi trabajo, apoyándome incondicionalmente cada momento que requería.

Al Dr. Fernando Casanoves, por su gran colaboración en la revisión de los datos y sobretodo por su amistad.

A mis asesores por acompañarme este proceso de formación y aportar sabiamente con su conocimiento enriqueciéndome en cada una de las conversaciones y discusiones.

A mis amigas Patricia R., Jhenny S. y Diana G., por su amistad y apoyo incondicional, por hacer que estos dos años sean divertidos y por convertimos en los “cuatro mosqueteros”.

A Cindy C., Manrique G., Arturito, José C., Beatris E., por apoyarme en este proceso de formación, ser unos grandes amigos y sobretodo entregar su conocimiento de manera desinteresada.

A mis colegas de la promoción 2008-2009, por su amistad y las experiencias vividas durante los dos años, sobretodo a los compañeros de Agricultura Ecológica.

A mis alma mater Zamorano y CATIE por formarme profesionalmente.

BIOGRAFÍA

El autor nació en la ciudad de Quito, Ecuador el 24 de enero de 1983. Se graduó como bachiller en el colegio Técnico Agropecuario Genoveva German. Sus estudios universitarios los realizó en la Escuela Agrícola Panamericana El Zamorano, Honduras, donde obtuvo el título de Ingeniero Agrónomo, en la Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria, en el año 2005. Durante los años 2006 y 2007 laboró como Instructor teórico-práctico en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos y Reproducción *in vitro* de Zamorano, Honduras; donde estuvo a cargo del modulo de enseñanza a estudiantes de segundo y tercer año de ingeniería; además estuvo a cargo de la conservación *in vitro* de la flor nacional de Honduras *Rhincholaelia digbyana*. Entre otras actividades se desempeñó como asistente en cursos de horticultura y como capacitador en cursos de propagación *in vitro* de ornamentales y orquídeas. También ha sido asesor de anteproyectos y tesis de ingeniería. En el 2008 ingresó a la Maestría de Agricultura Ecológica en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), donde culminó sus estudios en diciembre de 2009.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
BIOGRAFÍA.....	V
CONTENIDO.....	VI
RESUMEN.....	X
SUMMARY.....	XII
ÍNDICE DE CUADROS.....	XIV
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XV
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivos del estudio.....	3
1.1.1 <i>Objetivo general</i>	3
1.1.2 <i>Objetivos específicos</i>	3
1.2 Hipótesis del estudio.....	3
2 MARCO CONCEPTUAL.....	5
2.1 Los nematodos en el cultivo de banano (<i>Musa</i> spp.).....	5
2.2 Impacto económico de los nematodos en el cultivo de banano (<i>Musa</i> spp.).....	6
2.3 Daños ocasionados por el nematodo barrenador <i>Radopholus similis</i>	6
2.4 Métodos de control para nematodos.....	7
2.4.1 <i>Control cultural</i>	7
2.4.2 <i>Control químico</i>	8
2.4.3 <i>Control biológico</i>	9
2.5 Los extractos botánicos y su uso contra los fitonematodos.....	10
2.6 Propiedades de los <i>Tagetes</i> spp.....	11
2.7 Raquis de banano, usos y sus propiedades.....	13
2.8 Bibliografía.....	15
3 Artículo I.....	21

Efecto de diferentes concentraciones de extractos maduros y frescos de <i>Tagetes</i> spp. y raquis de banano sobre el biocontrol del nematodo barrenador <i>Radopholus similis</i>	21	
3.1	Introducción	21
3.2	Materiales y métodos	22
3.2.1	<i>Localización del estudio</i>	22
3.2.2	<i>Material vegetal</i>	22
3.2.3	<i>Metodología para obtención de extractos acuosos licuados</i>	23
3.2.4	<i>Bioensayo del efecto de extractos maduros y frescos a diferentes niveles de concentración sobre el crecimiento de la planta de banano</i>	25
3.2.4.1	Protección de vitroplantas con extractos maduros y frescos	25
3.2.4.2	Evaluación de los extractos acuosos sobre el material vegetal	26
3.2.5	<i>Bioensayo de penetración de Radopholus similis en vitroplantas protegidas con extractos maduros y frescos a diferentes niveles de concentración</i>	27
3.2.5.1	Proliferación monoxénica de <i>Radopholus similis</i>	27
3.2.5.2	Inoculación de vitroplantas con <i>Radopholus similis</i>	28
3.2.5.3	Extracción y evaluación del porcentaje de penetración de <i>Radopholus similis</i>	29
3.2.6	<i>Ensayo de biocontrol de Radopholus similis en vitroplantas protegidas con extractos maduros y frescos a diferentes niveles de concentración</i>	29
3.3	Diseño experimental para los ensayos de toxicidad, penetración y biocontrol.	30
3.4	Resultados	32
3.4.1	<i>Bioensayo del efecto de extractos maduros y frescos a diferentes niveles de concentración sobre el crecimiento de la planta de banano</i>	32
3.4.2	<i>Bioensayo de penetración de Radopholus similis en vitroplantas protegidas con extractos maduros y frescos a diferentes niveles de concentración</i>	34
3.4.3	<i>Ensayo de biocontrol de Radopholus similis en vitroplantas protegidas con extractos maduros y frescos a diferentes niveles de concentración</i>	35
3.5	Discusión.....	37
3.6	Conclusiones	40
3.7	Bibliografía	41
4	Artículo II.	45

Biocontrol del nematodo barrenador <i>Radopholus similis</i> mediante extractos acuosos de <i>Tagetes</i> spp. y raquis de banano combinados con microorganismos endofíticos.....	45
4.1	Introducción 45
4.2	Materiales y métodos 47
4.2.1	<i>Material experimental</i> 47
4.2.2	<i>Preparación de suspensiones de microorganismos endofíticos</i> 48
4.2.3	<i>Metodología para obtención de extractos acuosos licuados</i> 48
4.2.3.1	Elaboración de extractos acuosos licuados combinados con microorganismos 49
4.2.3.2	Elaboración de extractos acuosos licuados con órganos de <i>Tagetes</i> spp. 50
4.2.4	<i>Ensayo in vitro de extractos de Tagetes spp. y raquis de banano enriquecidos con microorganismos sobre el biocontrol de R. similis</i> 52
4.2.5	<i>Ensayo de biocontrol de Radopholus similis en vitroplantas protegidas con extractos acuosos de Tagetes spp. y raquis de banano enriquecidos con microorganismos endofíticos</i> 53
4.2.6	<i>Ensayo in vitro de extractos de hojas, raíz, tallo y flores de Tagetes spp.</i> 54
4.2.7	<i>Bioensayo de penetración de Radopholus similis en vitroplantas protegidas con extractos acuosos de hojas, raíz, tallos y flores de Tagetes spp.</i> 55
4.3	Diseño experimental para los ensayos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> 55
4.3.1	<i>Ensayos in vitro</i> 55
4.3.2	<i>Ensayos in vivo</i> 56
4.4	Resultados 58
4.4.1	<i>Ensayo in vitro de extractos de Tagetes spp. y raquis de banano enriquecidos con microorganismos sobre el biocontrol de R. similis</i> 58
4.4.2	<i>Ensayo de biocontrol de Radopholus similis en vitroplantas protegidas con extractos acuosos de Tagetes spp. y raquis de banano enriquecidos con microorganismos endofíticos</i> 59
4.4.3	<i>Ensayo in vitro de extractos de hojas, raíz, tallo y flores de Tagetes spp.</i> 64
4.4.4	<i>Bioensayo de penetración de Radopholus similis en vitroplantas protegidas con extractos acuosos de hojas, raíz, tallos y flores de Tagetes spp.</i> 66
4.5	Discusión..... 68

4.5.1	<i>Bioensayos de extractos de hojas, tallos, raíz y flores de Tagetes spp. sobre el biocontrol de R. similis</i>	68
4.5.2	<i>Bioensayos de extractos de Tagetes spp. y raquis de banano enriquecidos con microorganismos endofíticos para el control de R. similis</i>	70
4.6	Conclusiones	73
4.7	Recomendaciones generales.....	74
4.8	Bibliografía	75

RESUMEN

Extractos acuosos de *Tagetes* spp. y raquis de banano en forma individual, mezclados y combinados con microorganismos endofíticos fueron estudiados en dos etapas para el biocontrol de *Radopholis similis* en vitro plantas de banano cv. “Gran enano”. En la primera etapa se evaluó el efecto de extractos acuosos maduros y frescos de *Tagetes* spp y raquis de banano de forma individual y combinada para medir su efecto en la penetración y biocontrol de *R. similis* así como su efecto en la promoción de crecimiento. Mientras que para la segunda etapa se determinó el efecto de extractos de *Tagetes* spp. y raquis de banano enriquecidos con cuatro hongos y cuatro bacterias endofíticas en condiciones *in vitro* e *in vivo* para el control de *R. similis*; adicionalmente se evaluó el efecto individual de órganos de la planta de *Tagetes* spp. a nivel *in vitro* e *in vivo*. En la primera etapa se determinó que extractos de *Tagetes* spp. y raquis de banano reducen la penetración de *R. similis*, encontrándose catorce tratamientos que presentan reducciones entre el 70 a 90%. Extractos frescos fueron más efectivos que extractos maduros. Para biocontrol, catorce tratamientos demostraron reducir las poblaciones de *R. similis*, siendo estadísticamente similares al control químico y diferentes del testigo con nematodos. Los extractos acuosos de *Tagetes* spp. y raquis de banano solos y mezclados en todos los ensayos promovieron el desarrollo y crecimiento de la planta y no se registraron efectos toxicológicos.

En la segunda etapa se demostró en fase *in vitro*, que extractos de *Tagetes* spp. fueron más efectivos que extractos de raquis de banano para inmovilizar *R. similis* a las 8, 16 y 24 horas de evaluación encontrándose que a las 24 horas se produjo una inmovilización de *R. similis* de 95 y 100% que fue superior al Terbufos 10GR (44%). En condiciones de invernadero tanto extractos de *Tagetes* como de raquis redujeron la población de *R. similis* en el sistemas radical entre 68 a 89%. Los tratamientos raquis-bacteria (20 y 25%) y *Tagetes*-hongo (10 y 20%) fueron los más efectivos, con biocontroles mayores al 82%. A nivel *in vitro* los extractos de órganos de *Tagetes* spp. redujeron la movilidad de *R. similis* siendo los extractos de raíces y flores los que presentaron mayor inmovilización a las 24 horas alcanzando porcentajes hasta 92%. A nivel de invernadero los extractos de órganos de *Tagetes* spp. redujeron la penetración de *R. similis* entre 55 y 81%, siendo estadísticamente similar al

control químico. Además extractos de raíz y flor fueron los que presentaron mayor promoción de crecimiento de la planta.

Palabras clave: *Radopholus similis*, extractos acuosos, *Tagetes* spp., raquis de banano, microorganismos endofíticos, biocontrol, promoción de crecimiento.

SUMMARY

Aqueous extracts of *Tagetes* spp. and banana rachis along as well as in combinations with endophytic microorganism were evaluated in two phases for the biocontrol activity to *Radopholus similis* in tissue culture plants of the Grande Niane. In the first phase it was evaluated the effect of fresh and fermentated aqueous extracts of *Tagetes* spp. and banana rachis along and combined for their effect on the penetration and biocontrol of *R. similis*, as well as the plant growth promotion. In the second phase it was evaluated the effect of extract of *Tagetes* spp. and banana rachis enhanced with 4 endophytic bacteria and 4 endophytic fungi, which were tested *in vitro* and *in vivo* for the biocontrol of *R. similis*. In addition, the effect of the extract of different parts of the *Tagetes* spp. plant was also evaluated. In the first phase 14 treatments of extract of *Tagetes* spp. and banana rachis reduced the penetration of *R. similis* up to 70 and 90 %. It was detected that fresh aqueous extract were more effective than fermentated. Regarding to biocontrol assay, 14 treatments reduced the population of *R. similis* at the same level of the chemical control and statistically different than the control plants inoculated with nematode. In all the experiments extract of *Tagetes* spp. and banana rachis alone or combined increase the plant growth promotion and no toxic effect were detected.

In the second phase *in vitro* assay it was demonstrated that aqueous extract of *Tagetes* spp. were more effective than extract of banana rachis for immobilization of *R. similis* at 8, 16 and 24 hours of evaluation. It was found that at 24 hours 95% to 100% of *R. similis* was paralyzed by the extract and only 44% of the nematodes were affected by the chemical control (Terbufos 10GR). In greenhouse conditions the extract of *Tagetes* spp. and banana rachis reduced the population of *R. similis* in the root system up to 68 to 89% and the treatment of rachis enhanced with 20 a 25% of bacteria and *Tagetes* spp. with fungi 10 to 20% were the most effective reaching biocontrol activity higher than 82%. *In vitro* conditions extract of organs of plant of *Tagetes* spp. provoke the immobilization of *R. similis* and extract from roots and flowers were more efficient than leaves and stems. It was found that at 24 hours of exposition 92% of *R. simillis* was immobilized. In greenhouse conditions the organs extract of *Tagetes* spp. reduced the penetration of *R. similis* between 55 to 85% and no difference

with the chemical control was found. Besides the biocontrol activity extract of roots and flower presented the higher effect on the plant growth promotion.

Keywords: *Radopholus similis*, aqueous extracts, *Tagetes* spp., banana rachis, endophytic microorganism, biocontrol, growth promotion.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Principales géneros y especies de nematodos presentes en el cultivo del banano, ordenadas por su grado de agresividad.	5
Cuadro 2. Descripción de los tratamientos de extractos maduros y frescos de <i>Tagetes</i> spp. y raquis de banano evaluados en los bioensayos	25
Cuadro 3. Efecto de los extractos maduros y frescos sobre el desarrollo vegetativo de vitroplantas de banano cv. “Gran Enano”, después de seis semanas en invernadero.....	33
Cuadro 4. Efecto de los extractos maduros y frescos sobre la penetración de <i>R. similis</i> en vitroplantas de banano cv. “Gran Enano”, después de tres semanas en invernadero	35
Cuadro 5. Efecto de los extractos maduros y frescos sobre el control de <i>R. similis</i> en vitroplantas de banano cv. “Gran Enano”, después de seis semanas de inoculadas.....	36
Cuadro 6. Descripción de los tratamientos de extractos de <i>Tagetes</i> spp. y raquis de banano enriquecidos con microorganismos endofíticos evaluados in vitro e in vivo	51
Cuadro 7. Descripción de los tratamientos de extractos de órganos de <i>Tagetes</i> spp. evaluados en condiciones in vitro e in vivo.....	52
Cuadro 8. Efecto en el tiempo de los extractos de <i>Tagetes</i> spp. y raquis de banano solos y enriquecidos con microorganismos sobre el control de <i>R. similis</i> en condiciones in vitro....	60
Cuadro 9. Tabla de análisis de varianza para el estudio de las interacciones en un arreglo factorial incompleto para la variables numero de nematodos	61
Cuadro 10. Efecto de los extractos de <i>Tagetes</i> spp. y raquis enriquecidos con microorganismos endofíticos sobre el control de <i>R. similis</i> en vitroplantas de banano cv. “Gran Enano”	63
Cuadro 11. Efecto en el tiempo de los extractos de hojas, tallo, raíz y flor de <i>Tagetes</i> spp. sobre el control de <i>R. similis</i> en condiciones in vitro.....	66
Cuadro 12. Efecto de los extractos de hojas, tallo, raíz y flor de <i>Tagetes</i> spp. sobre la penetración de <i>R. similis</i> en condiciones de invernadero.....	68

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de obtención de extractos acuosos licuados de <i>Tagetes</i> spp. y raquis.	24
Figura 2. Protección de vitroplantas de banano con extractos maduros y frescos.	26
Figura 3. Protocolo de evaluación de vitroplantas utilizadas en el ensayo de toxicidad.....	26
Figura 4. Proceso de preparación de los discos de zanahoria para la reproducción de <i>R. similis</i>	27
Figura 5. Proceso de inoculación en los discos de zanahoria de <i>R. similis</i>	28
Figura 6. Proceso de extracción de nematodos utilizados en el bioensayo de penetración....	29
Figura 7. Proceso de extracción de nematodos utilizados en el ensayo de biocontrol de <i>R. similis</i>	30
Figura 8. Protocolo de preparación de suspensiones de microorganismos.	48
Figura 9. Protocolo de elaboración de extractos acuosos de <i>Tagetes</i> spp. y raquis enriquecidos con microorganismos.....	50
Figura 10. Protocolo de elaboración de extractos acuosos de hojas, raíz, tallo y flores de <i>Tagetes</i> spp.	50
Figura 11. Metodología utilizada en el ensayo in vitro de extractos acuosos de <i>Tagetes</i> spp. y raquis enriquecidos con microorganismos endofíticos para el control de <i>R. similis</i>	53
Figura 12. Metodología utilizada en el ensayo in vitro de extractos acuosos de hojas, tallos, raíz y flores de <i>Tagetes</i> spp. para el control de <i>R. similis</i>	54
Figura 13. Efecto de los tratamientos en el tiempo sobre la parálisis/inmovilización de <i>R. similis</i>	58
Figura 14. Efecto de los tratamientos de órganos de <i>Tagetes</i> spp. en el tiempo sobre la movilidad de <i>R. similis</i>	62
Figura 15. Efecto de los tratamientos de órganos de <i>Tagetes</i> spp. en el tiempo sobre la movilidad de <i>R. similis</i>	64
Figura 16. <i>Radopholus similis</i> a las 24 horas de evaluación (A: nematodos con extracto de raíz y B: nematodos con extracto de flor).....	65

1 INTRODUCCIÓN

El cultivo del banano (*Musa* spp.) es considerado como el cuarto cultivo de importancia a nivel mundial y el primero a nivel de frutas (Arias et ál. 2004). En el mercado internacional es la fruta fresca más exportada del mundo en cuanto a volumen, representando el 12 % del total de frutas producidas; además ocupa el segundo lugar después de los cítricos en términos de valor, alcanzando ventas anuales que sobrepasan los 2,5 millones de dólares (Brooks 2004, Espinal et ál. 2006, FAO 2006).

El banano conjuntamente con el trigo, arroz, maíz y tubérculos (yuca y papa) constituye un alimento básico a la seguridad alimentaria de millones de personas alrededor del mundo. Este no solo representa un producto de consumo importante para los países importadores, sino que además por estar distribuido en las regiones tropicales y subtropicales tiene una importancia fundamental para las economías de muchos países de bajos ingresos, sobre todo del área Latinoamericana en la que se encuentran varios de los países exportadores (Arias et ál. 2004, FAO 2006).

En Latinoamérica se tiene establecido que los bajos rendimientos han sido causados por problemas fitosanitarios ocasionados por Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) y seguidos por fitonematodos; las pérdidas económicas pueden oscilar entre 10 al 60% en plantaciones comerciales a nivel mundial (Sarah et ál. 1996, Brooks 2004, Pocasangre et ál. 2006).

Los nematodos fitoparásitos son los responsables del volcamiento de plantas y acortamiento de la vida útil de las plantaciones comerciales, se considera como el principal causante de estos daños al nematodo barrenador *Radopholus similis*, que se encuentra ampliamente distribuido en Latinoamérica, Asia y África, atacando principalmente las variedades del subgrupo Cavendish (Sarah 1989, Marín et ál. 2002, Gonzáles y Fernández 2003, Araya 2004b). Desafortunadamente al ser *R. similis* un nematodo endoparásito migratorio, puede completar su ciclo de vida dentro de las raíces, esto ha provocado que su control sea cada vez mas difícil, el cual generalmente se basa en dos, tres y hasta cuatro aplicaciones de nematicidas por año, constituyendo uno de los costos más altos del manejo del cultivo (entre 350 a 500 dólares/ha/año), además representa una continua amenaza para la

salud humana y el medio ambiente (Araya 2003, Pocasangre et ál. 2004, Araya 2004b, Pocasangre et ál. 2006)

El método más utilizado hasta la fecha es el uso del control químico, el cual es a base de productos sintéticos no fumigantes como órgano fosforados o carbamatos (Sarah et ál. 1996), los cuales están catalogados dentro del grupo de plaguicidas como productos altamente tóxicos (Pocasangre et ál. 2006); lamentablemente esta ha sido hasta el momento la única alternativa económica para reducir los niveles de poblaciones de fitonematodos en plantaciones de banano y plátano (Araya 2003).

La creciente necesidad de buscar otras alternativas que sean menos toxicas y más amigables con el ambiente, ha motivado a los investigadores a realizar experimentos con microorganismos endofíticos como hongos y bacterias; los primeros han demostrado reducir hasta un 90% las poblaciones de *R. similis* (Pocasangre et ál. 2004), mientras que los otros se han obtenido un efecto de biocontrol de hasta un 85% (Núñez 2006).

Otra de las estrategias es el uso de enmiendas de origen orgánico como lombricompost y bokashi, además del uso de cultivos de cobertura, que permiten mejorar las condiciones del suelo, aportando materia orgánica y gran cantidad de flora microbiana (Sarah 1998, Ayuso 2000). Existen pocos estudios en campo que demuestren la efectividad de los extractos para el control de nematodos; pese a esto la literatura documenta que varias plantas entre ellas el *Tagetes* spp. sirven como repelentes (Russo et ál. 2005) y controladores de nematodos (Lehman 1979). Para el caso de extractos de raquis, no se han reportado estudios de efecto alguno con nematodos, únicamente se tiene conocimiento que los lixiviados de compostaje de raquis de banano son utilizados como excelentes controladores de enfermedades fungosa y bacteriales, como el mildiu en rosas, Sigatoka negra en musáceas (Larco et ál. 2004) y Moko en plátano y banano (CIAT 2004). Por lo tanto, la presente investigación tiene por objeto determinar el efecto de extractos acuosos de raquis de banano y *Tagetes* spp. enriquecidos con bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nematodo *Radopholus similis*.

1.1 Objetivos del estudio

1.1.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de extractos maduros y frescos de *Tagetes spp.* y raquis de banano sobre el biocontrol del nematodo barrenador *Radopholus similis*.

Estudiar el efecto controlador que tienen los extractos acuosos de raquis de banano y *Tagetes spp.* de forma individual y combinados con microorganismos endofíticos sobre el nematodo barrenador *Radopholus similis*.

1.1.2 Objetivos específicos

- a. Evaluar el efecto individual y combinado de los extractos acuosos de *Tagetes spp.* y raquis de banano sobre el control de *Radopholus similis* en plantas inoculadas con el patógeno en el invernadero.
- b. Evaluar el efecto de extractos acuosos frescos y maduros de *Tagetes spp.* y raquis de banano sobre el control de *Radopholus similis* en plantas inoculadas con el patógeno en el invernadero.
- c. Determinar el efecto de los extractos de *Tagetes spp.* y raquis de banano enriquecidos con cuatro hongos y cuatro bacterias endofíticas en condiciones de laboratorio e invernadero sobre el control de *Radopholus similis* en plantas inoculadas con el patógeno en el invernadero.
- d. Determinar el efecto de extractos de hojas, raíz, tallo y flores de *Tagetes spp.* en condiciones de laboratorio e invernadero sobre el control de *Radopholus similis*.

1.2 Hipótesis del estudio

- a. El uso de extractos acuosos de *Tagetes spp.* y raquis de banano tienen un efecto de biocontrol sobre el nematodo barrenador *Radopholus similis*.

- b. Extractos frescos de *Tagetes* spp. y raquis de banano tiene un mayor efecto controlador sobre *R. similis* que los extractos maduros.
- c. La combinación de hongos y bacterias endofíticos pueden enriquecer los extractos acuosos de *Tagetes* spp. y raquis de banano para un mejor control de *Radopholus similis*.
- d. Extractos elaborados con diferentes órganos de la planta de *Tagetes* spp. tienen un efecto de control sobre *Radopholus similis*.

2 MARCO CONCEPTUAL

2.1 Los nematodos en el cultivo de banano (*Musa spp.*)

Los nematodos son considerados como organismos que pertenecen al reino animal, multicelulares, que se han logrado adaptar a gran variedad de ecosistemas (Christie 1986). La forma de alimentarse de estos parásitos obligados es mediante la perforación de las membranas celulares absorbiendo todo su contenido, esto lo realizan porque tiene como aparato bucal una especie de estilete que facilita el proceso (Smart y Perry 1968).

Hasta el momento se han reportado para musáceas 146 especies de nematodos parásitos o asociados, distribuidos en 43 géneros, siendo los fitonematodos más devastadores y ampliamente distribuidos los del género *Radopholus spp.* y *Pratylenchus spp.* (Wardlaw 1961, Araya et. ál 1995). Las especies de nematodos que se encuentran en la mayoría de los campos de producción de banano son las que se mencionan a continuación (Cuadro1). Los fitonematodos en la mayoría de regiones tropicales del mundo donde se cultivan bananos y plátanos, son considerados como uno de los parásitos más importantes que afectan las cosechas, provocando altas pérdidas económicas (Sarah 1989, Speijer y De Waele 1997). El principal daño que causan los nematodos al cultivo es el volcamiento de la planta, que conlleva a la pérdida de la fruta y a un acortamiento de la vida útil de las plantaciones (Araya 1995, Brooks 2004).

Cuadro 1. Principales géneros y especies de nematodos presentes en el cultivo del banano, ordenadas por su grado de agresividad.

Género y especie	Tipo de nematodo
<i>Radopholus similis</i>	endoparásito migratorio
<i>Helicotylenchus multincinctus</i>	ecto y endoparásito migratorio
<i>Meloidogyne incognita</i>	endoparásito sedentario
<i>Meloidogyne javania</i>	endoparásito sedentario
<i>Pratylenchus coffeae</i>	endoparásito migratorio
<i>Rotylenchulus reniformis</i>	semi-endoparásito

Fuentes: Tarté y Pinochet (1981), Sarah et ál. (1996) y Araya (2003).

2.2 Impacto económico de los nematodos en el cultivo de banano (*Musa spp.*)

El cultivo del banano es considerado como producto de gran importancia económica, social, ambiental y político, considerándose que esta industria, es un importante recurso de ingreso y empleo para muchos países exportadores, mayormente en Latinoamérica y el Caribe, así como también Asia y África (Espinal et ál. 2006, FAO 2006).

La presión del mercado por tener productos uniformes de buen tamaño y apariencia perfecta, ha contribuido a que la mayor parte de las empresas exportadoras utilicen variedades genéticamente iguales de alta producción y alto rendimiento, que son mucho más demandantes de insumos externos y muy susceptibles a plagas y enfermedades (Martínez et ál. 2007). Este es el caso de los tres cultivares comerciales Grande Naine, Valery y Williams, los cuales son completamente susceptibles a nematodos como *Radopholus similis*, *Pratylenchus coffeae*, *Helicotylenchus multicinctus* y *Meloidogyne incognita*, dificultando de esta manera su control (Sarah 1989).

El daño que causa *R. similis* se localiza básicamente en la parte interna de la raíz, motivo por el cual varias de las estrategias de manejo (químicas, biológicas, culturales) pueden no ser efectivas para controlar las poblaciones, esta deficiencia puede causar pérdidas en rendimiento que van desde un 25 a 60% (Araya 2003, Brooks 2004, Pocasangre et ál. 2004). Datos superiores fueron los encontrados por Sarah et ál. (1996) en África, específicamente en Costa de Marfil, donde el ataque de *R. similis* ha causado pérdidas acumulativas de hasta un 75 % durante tres ciclos de producción, esto debido a la reducción de peso del racimo, volcamiento y deficiencia de raíces.

2.3 Daños ocasionados por el nematodo barrenador *Radopholus similis*

Radopholus similis es el nematodo barrenador endoparásito migratorio de mayor importancia en la producción de *Musa spp.* tanto en el trópico y subtrópico, donde se encuentra distribuido en casi todas las plantaciones comerciales de banano de América Latina, Asia y África (Sarah 1989, Sarah et ál. 1996).

En Latinoamérica es común encontrarlo en los suelos de las plantaciones comerciales tanto de plátano como de banano, el daño principal que causa *Radopholus similis* se localiza

en la raíz, aunque también se lo ha encontrado en el cormo (Sarah et ál. 1996). El lugar por donde penetra es la parte terminal de la denominada como caliptra; al migrar ínter e intracelularmente, se alimenta del citoplasma y de las células del parénquima cortical, destruyendo paredes celulares y causando cavidades y túneles que se necrosan y pueden extenderse a toda la región parenquimática (Wardlaw 1961, Christie 1986).

Radopholus similis no daña el cilindro vascular, aunque en ocasiones cuando las raíces se encuentran completamente infestadas penetra a estos tejidos (Araya 2004b). La necrosis de la raíz y del rizoma se incrementa por la acción de otros organismos del suelo, ya que al principio las lesiones que causa son de color rojizo y no sobrepasan los 10 cm de longitud, los microorganismos que pueden ingresar por los orificios son hongos y bacterias, siendo los más comunes *Cylindrocarpon musae*, *Acremonium stromaticum* y *Fusarium* spp. (Sarah et ál. 1996).

2.4 Métodos de control para nematodos

2.4.1 Control cultural

Las prácticas culturales incluyen desde la preparación del suelo, hasta el manejo agrotécnico de las plantaciones; además es de especial importancia la procedencia del material de siembra, ya que esta es una de las principales formas de diseminación de enfermedades (Sarah et ál. 1996, Gonzáles y Fernández 2003). La mejor forma de iniciar una plantación en zonas vírgenes libres de *R. similis* y *Pratylenchus* spp. es utilizando materiales libres de patógenos provenientes de la propagación *in vitro* y que hayan sido cultivados en un sustrato libre de nematodos (Araya 2003), ya que una vez introducido el nematodo en las plantaciones es imposible erradicarlo, ya que las poblaciones pueden aumentar con mayor o menor rapidez después de la siembra (Sarah et ál. 1996).

Las poblaciones de nematodos se pueden ver reducidas a niveles imperceptibles realizando una práctica simple como dejar el terreno en barbecho durante un periodo prolongado de tiempo (un año). Sarah et ál. (1996) menciona que en África esta técnica que ha dado buenos resultados al usar como cultivo en barbecho una especie no hospedera de nematodos como *Chromolaena odorata*.

El uso de cultivos mixtos o asociados también pueden considerarse como una estrategia factible para la reducción de las poblaciones de nematodos como *R. similis*, esto lo demostró De Waele et ál. (2006), quienes evaluaron el efecto de seis especies de plantas asociadas al cultivo del banano; los resultados que obtuvieron demostraron que *Geophila repens*, *Arachis pintoi*, *Sorghum bicolor* y *Tagetes erecta* poseen un efecto positivo para reducir el ataque de nematodos en plantaciones, razón por la cual proponen utilizar estas especies como cultivos de cobertura, cultivos de rotación o cultivos intercalados dentro de las plantaciones de banano.

La técnica de inundación del campo es una estrategia bastante efectiva pero poca practica, sobretodo en regiones donde la limitante es el agua. Esta técnica consiste en inundar el campo por un período de 6 ó 7 semanas, para obtener poblaciones similares de nematodos como la práctica de barbecho (Sarah et ál.1996).

2.4.2 Control químico

Los nematodos pueden ser controlados en gran medida con productos químicos, pero estos a su vez tiene un efecto negativo por ser contaminantes del medio ambiente, causar intoxicaciones a los agricultores y además su costo es bastante alto (Roman et ál 1983, Dochez et ál. 2000). Actualmente esta alternativa química es la más usada, llegando aplicarse de 2 a 4 veces al año en los campos de las plantaciones comerciales tanto de banano como de plátano (Araya 2004b, Pocasangre et ál. 2004).

La mayor parte de los nematicidas no fumigantes se encuentran formados por moléculas del grupo de los organofosforados y carbamatos, dentro de los cuales se encuentran el Mocap, Nema-cur, Furadan, Counter, Vydate, Rugby (Moens et ál. 2003, Jackson et ál. 2003). Una de las razones por las cuales los productores siguen utilizando los agroquímicos es por el efecto inmediato que ven los resultados; este efecto es el aumento en la producción y en el tamaño del racimo; para demostrar esto Vargas y Araya (2005), evaluaron el efecto del número de aplicaciones químicas de la segunda a la cuarta generación, los resultados que obtuvieron demostraron que mientras mayor es el número de aplicaciones hay un aumento significativo en el peso del racimo (1,16 kg) a la cosecha, además el número de raíces funcionales y totales infectadas es mínimo. Un factor primordial que restringe estas prácticas

de aplicaciones constantes es la biodegradación acelerada de los nematicidas, esto lo demostraron Moens et ál. (2003), quienes evaluaron el efecto de 5 aplicaciones de los 6 nematicidas más comunes en Latinoamérica, los resultados que encontró es que a pesar del alto peso de los racimos y raíz funcional, Furadan mostró un alto nivel de biodegradación acelerada con respecto a Counter y Ruby; con una alta correlación entre nematodos en 100 g de raíces y el porcentaje de raíz funcional.

No obstante una de las principales limitaciones de aumentar el número de aplicaciones de nematicidas es que a medida aplicamos más agroquímicos, estamos modificando la microflora y microfauna del suelo, y además estamos alterando los procesos tróficos, eliminando con ello varios microorganismos antagonistas de nematodos fitoparasíticos (Araya 2003), razón por la cual tanto Moens et ál. (2003) como Araya (2004a), mencionan que el uso repetitivo de nematicidas tiende a incrementar el daño causado por nematodos, mientras que con una rotación adecuada de productos no solo permite que la población de nematodos se reduzca, sino también ayuda a controlar el desarrollo de la biodegradación acelerada.

2.4.3 Control biológico

El control biológico representa una alternativa ideal para la obtención de bananos y plátanos ambientalmente sostenibles; Sikora (1992) menciona que se han desarrollado y estudiado una serie de métodos de control no químico para enfrentar las plagas y enfermedades; estos que van desde la sanidad de cultivos, rotación, selección de plantas y recientemente el empleo de microorganismos benéficos del suelo que son antagonistas de los nematodos.

Los nematodos al encontrarse en la rizosfera, deben coexistir con gran diversidad de microorganismos, muchos de ellos antagonistas, los cuales en muchos de los casos han podido ser aislados para estudiarlos detenidamente (Sikora 1992). Entre los microorganismos que tiene mayor efecto supresivo podemos encontrar a las bacterias y hongos endofíticos (Pocasangre 2003)

Los hongos endofíticos han demostrado reducir desde un 60 hasta un 95% las poblaciones de *R. similis* (Pocasangre et ál. 2004), dentro de los géneros estudiados se encuentran *Trichoderma* spp., *Fusarium* spp. no patogénico (Pocasangre et ál. 2000, Cañizares

2003, Meneses 2003, Pocasangre et ál. 2004, Menjivar 2005, Chávez 2007) y *Paecilomyces* spp. (Ufer 1997, Vargas et ál. 2006). Pocasangre et ál. (2004), resaltan que luego de más de siete años de investigación, ha sido demostrado que poblaciones naturales de hongos endofíticos asociados con la rizosfera de plantaciones tienen una alta actividad antagonista sobre los fitonematodos, encontrándose reducciones de hasta 90% de poblaciones finales de nematodos. Las bacterias por su parte han demostrado tener un efecto de biocontrol de hasta un 85%, esto cuando se han evaluado géneros como *Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp. (Núñez 2006, Vargas et ál. 2006, Chávez 2007).

Los altos índices de biocontrol que ejercen tanto hongos y bacterias indican que sería un buen complemento para aumentar las tasas de control, por tal motivo Chávez (2007) evaluó la combinación bacteria-bacteria, bacteria-hongo y hongo-hongo; los resultados que obtuvo demostraron que existe compatibilidad entre las combinaciones, además los porcentajes de biocontrol oscilaron entre 88 a 93%.

En la actualidad existen productos biológicos como agentes de control de nematodos; en el mercado se puede conseguir los que son a base *P. lilacinus*, entre estos se encuentran Biocon[®], Nemachek[®], Bioact[®] y Melocon[®], Blue Circle[™] (*Burkholderia cepacia*), un hongo, como el Paecil[™] (*Paecilomyces lilacinus*), o los productos esterilizados de la fermentación de un hongo, como el DiTera[™] (*Myrothecium verrucaria*) (zum Felde 2002, zum Felde et ál. 2006, Morales 2006).

2.5 Los extractos botánicos y su uso contra los fitonematodos

En la naturaleza existe una gama muy amplia de plantas que producen una diversidad de metabolitos secundarios tóxicos. La forma de aprovechar estos metabolitos o sustancias tóxicas es mediante la preparación de extractos o infusiones a partir de sus tejidos (Verduzco et ál. 1996, Montes et ál.1997). Los extractos vegetales se pueden preparar de diferentes formas y utilizando diferentes solventes como agua, alcohol, éter etílico, aceites, cetonas y benceno (Rodríguez y Lagunes 1992). Ramírez et ál. (2001) señalaron que los extractos botánicos obtenidos a partir de solvente orgánicos son mucho más efectivos que los extraídos a base de agua. A pesar que Lagunes y Villanueva (1994) señalan que en efecto existe una menor presencia de metabolitos en extractos acuosos, esta es la técnica más sencilla que

pueden usar los agricultores para obtener productos naturales para el control de plagas o enfermedades.

Las plantas y sus derivados han mostrado efectos controladores contra ácaros, roedores, nematodos, bacterias, virus, hongos e insectos (Grainge y Ahmed 1988). Chitwood (1992) menciona que plantas con actividad nematicidas contienen una gran variedad de compuestos fitoquímicos en los que destaca acetilenos, alcaloides, ácidos carboxílicos, ácidos grasos, compuestos fenólicos y terpenoides. La familia Asterácea es una de las más reconocidas controladora de nematodos, un claro ejemplo son los estudios realizados por Tsay et ál. (2004) donde demuestran que de 56 especies y 43 géneros de Asteráceas el 60% presentó un efecto nocivo ante el nematodo *Meloidogyne incognita*. Siddiqui y Alam (1988) señalan que los extractos en agua de diferentes partes de *Tagetes lucida*, a diferentes grados de concentración en ensayos de laboratorio, fueron altamente nocivos para *Meloidogyne incógnita*, *Rotylenchulus reniformis*, *Tylenchorhynchus brassicae*, *Hoplolaimus indicus*, *Helicotylenchus indicus* y *Tylenchus filiformis*. En este ensayo la mortalidad de los nematodos aumentó con el incremento en la concentración y el período de exposición.

Investigaciones realizadas por Guzmán y Davide (1992) documentan que extractos crudos de *Anthocephalus chinensis*, *Eichornia crassipes* y *Allium cepa* son toxicas para nematodos *Meloidogyne incognita* y *Radopholus similis* en condiciones de laboratorio. Por su parte Araya (2009) utilizó infusiones y biofermentos de *Datura suaveolens* para el control de *Radopholus similis* en evaluaciones realizadas en maceteros y campo, en maceteros el efecto las infusiones y biofermentos no tuvieron una respuesta positiva en la reducción del nematodo; en campo la infusión demostró tener un efecto positivo en la reducción no solo de *Radopholus similis* sino también de *Helicotylenchus* spp. obteniéndose una reducción de nematodos totales de un 39%.

2.6 Propiedades de los *Tagetes* spp.

Los *Tagetes* spp. Son especies originarias de Mesoamérica, específicamente de la región Centroamericana, donde se encuentran la mayor diversidad genética (Dole y Wilkins 1999). Esta planta pertenece a la familia Compositae (Asterácea) y posee alrededor de 56 especies las cuales en un 40% se encuentran en México; es conocida en varios países con

diferentes nombres como: flor de muerto, marigold, clavel de muerto, cempasúchil, San Diego (Sabillón y Bustamante 1996). Botánicamente es una planta herbácea anual, de 25 cm a 1 m de altura, erecta, ramificada, de hojas opuestas, oblongas de 5 a 15 cm de largo, con flores amarillas de 5 a 13 cm de alto y de frutos negros (Sabillón y Bustamante 1996, Dole y Wilkins 1999).

Esta planta es conocida no solo por su belleza estética, sino también por su los múltiples beneficios que brinda al ser considerada como una planta con características plaguicidas. Los compuestos alelopáticos que posee pueden ser liberados por volatilización, exudados radiculares, lixiviación desde las plantas o residuos y por descomposición de residuos; los compuestos que emana son generalmente metabolitos secundarios que actúan como defensa química ante enfermedades y parásitos (Halbrendt 1996). Dentro de los metabolitos secundarios que poseen los *Tagetes* spp. se encuentran las estructuras policetilénicas y los derivados de tiophenos, de los cuales el más representativo es el α -Tertienilo que es un compuesto toxico para los nematodos (López y Estévez 1992, Vasudevan et ál. 1997). Además Chagonda et ál. (1999) determinaron que existe una variación cuantitativa en aceites esenciales destilados de *T. minuta* en las fases vegetativas y reproductivas en floración; en estados reproductivos encontraron aceites ricos en dihydrotagetone (32%), tagetone (16,7%) y beta-ocimene (13,3%); y en estados vegetativos encontraron niveles más altos de tagetenone y tagetone (27,1 y 31,2% respectivamente), mientras que dihydrotagetone y beta-ocimene eran más bajos (13,6 y 6,1%).

Experimentos realizados para evaluar el efecto repelente de *Tagetes* spp. demuestran que no importa la forma como se lo utilice (fermentado, fresco, barrera) el efecto siempre ocurre, así lo demostraron Russo et ál. (2005) al utilizar plantas completas de *Tagetes* spp. para el control de áfidos en lechuga, el experimento constó en evaluar el efecto de la planta como cultivo intercalado y en extracto natural, al finalizar los datos demostraron que no existió diferencia estadística al usar una o la otra forma. En experimentos en laboratorio realizados por Riga et ál. (2005), en los cuales se evaluó el efecto de extractos de semillas de *Tagetes erecta* y *Tagetes patula* para el control de *H. Sacchi*, *M. hapla* y *P.penetrans*, inoculados en semillas de rábano, maíz y tomate demostraron que ambas especies controlaron las poblaciones de nematodos.

Por otra parte, los estudios realizados por Lehman (1979) demostraron que existe un efecto de especie en el control de nematodos con marigold, él utilizó *T. patula*, *T. erecta* y *T. minuta* para el control de *Pratylenchus penetrans*, obteniendo resultados de control de 99, 55 y 63% respectivamente. Además, De Waele et ál. (2006) encontraron que existe menor número de nematodos como *R. similis*, *H. multincinctus* y *Meloidogyne* spp. al momento de sembrar plantas de banano en asocio con *Tagetes erecta*.

El interés que existe por esta especie ha motivado a que empresas desarrollen productos comerciales a base de *Tagetes* spp. para el control de nematodos de jardines ornamentales; este es el caso del NemaGold®, que es un producto procedente de extractos de la planta de *Tagetes erecta* (marigold) y algas marinas. Este se comercializa como bioestimulante y controlador de varios nematodos del suelo, teniendo una acción de contacto, sistémica y de repelencia (Horticom 2005).

2.7 Raquis de banano, usos y sus propiedades

El raquis del banano, también conocido como pinzote, es un material rico en fibra (8% de su peso) y además tiene un alto contenido de celulosa y lignina. En Costa Rica se producen alrededor de 114 millones de pinzotes por año, esto equivale a 33,3 millones de kilogramos de fibra, lo que constituye una gran cantidad de material con potencial para la elaboración de papel (Alfaro 2004).

En el campo agrícola uno de los usos que se ha encontrado para los residuos de raquis de plátano o banano provenientes de las exportadoras es la elaboración de compost y lombricompost. De este material se puede lograr un sustrato rico en nutrientes y además se puede obtener un subproducto que es el lixiviado. Los lixiviados de compost se obtienen por lo general de la adición de agua al compost aeróbico maduro, de donde resulta un líquido oscuro e inodoro, que posee nutrientes solubles y microorganismos benéficos (Larco 2004b). Para obtener el lombricompost de raquis de banano o plátano se puede utilizar la metodología desarrollada por Larco (2004a), la cual consiste en utilizar 20 kg de raquis que fue picado en pequeños trozos, luego colocarlos en un sacó de fibra y enterrados a 60 cm del suelo durante cuatro semanas, con la finalidad de eliminar látex, sustancias fenólicas y quinonas propias de la oxidación de estos materiales que son tóxicas para las lombrices. Una vez terminado este

proceso, el material se colocó en una canoa de madera recubierta de plástico, se le adicionó 5% de estiércol vacuno y una dilución al 1% de melaza para acelerar el proceso de descomposición, estos materiales estuvieron en pre-composteo por 15 días con el objetivo de alcanzar las condiciones ideales para que las lombrices inicien la descomposición del material. Los lixiviados a partir de raquis de plátano y banano han demostrado ser enmiendas ricas en potasio, ácidos fúlvicos utilizados en el control de *Mycosphaerella* spp. y *Mycosphaerella fijiensis* (Larco et ál. 2004, Escobar y Castaño 2005), en ácidos húmicos utilizados como bioestimulantes (Russo et ál. 1995) y extractos frescos en *Ralstonia solanacearum* (Arenas et ál. 2004).

De los estudios realizados hasta el momento con el uso de raquis de banano, los más representativos son: el control de *Mycosphaerella* spp. descrito por Escobar y Castaños (2005), los cuales encontraron que el uso de una concentración de 0,5% de ácidos fúlvicos puede representar una opción viable y no contaminante para el manejo de la enfermedad en plátano. Por su parte Álvarez et ál. (2002) mencionan que el uso de aplicaciones al 5% de ácidos fúlvicos provenientes de lixiviados de plátano reducen la severidad del mildiu polvoso en el cultivo de rosas. Además Arenas et ál. (2004) señalan que en Colombia los lixiviados han contribuido a reducir la incidencia de Moko hasta en un 31,6%; siendo esta una de las estrategias más accesibles para los productores orgánicos de esa región.

2.8 Bibliografía

- Alfaro, C. 2004. Reutilizar desechos de banano para elaboración de plástico. Boletín de Ciencia y Tecnología No. 22 (en línea). CORBANA. Consultado 28 oct. 2009. Disponible en <http://www.conicit.go.cr/boletin/boletin22/coorbana.shtml>
- Álvarez, E.C; Grajales, J; Villegas, J; Loke. 2002. Control del mildew polvoso (*Sphaerotheca panosa* var. *rosae*) en rosa, usando un lixiviado de compost del raquis de plátano (*Musa* AAB) (en línea). Informe Anual, CIAT. Consultado 18 sep. 2009. Disponible en http://www.ciat.cgiar.org/ipm/pdfs/cassava%20_pathology.pdf
- Araya, M. 2003. Situación actual del manejo de nematodos en banano (*Musa* AAA) y plátano (*Musa* AAB) en el trópico americano. In Rivas, G; Rosales, F. Eds. Taller Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas. Guayaquil, Ecuador (11-13 de agosto 2003). INIBAP. MUSALAC. Montpellier, FR. p. 79-102.
- Araya, M. 2004a. La biodegradación acelerada de nematicidas no fumigantes en plantaciones comerciales de banano (*Musa*AAA). In XVI Reunión Internacional de ACORBAT (26 de septiembre al 1 de octubre de 2004), Oaxaca de Juárez, Oaxaca, MX. p. 113-124.
- Araya, M. 2004b. Los fitonematodos del banano (*Musa* AAA subgrupo Cavendish cultivares Grande Naine, Valery y Williams) su parasitismo y combate. In XVI Reunión Internacional de ACORBAT (26 de septiembre al 1 de octubre de 2004), Oaxaca de Juárez, Oaxaca, MX. p. 84-105.
- Araya, M. 2009. Efecto de *Datura suaveolens* (reina de la noche) en el control de *Radopholus similis* y el crecimiento de plantas de banano (*Musa* AAA cv. Grande Nanine) cultivadas en macetas y campo. Informe anual 2008. Sandoval, J.A. ed. CORBANA. p. 24-25.
- Araya, M.; Centeno, M; Carrilli, W. 1995. Densidades poblacionales y frecuencias de los nematodos parásitos del banano (*Musa* AAA). Revista CORBANA 20(43):3-6.
- Arenas, A; López, D; Álvarez, E; Llano, G; Loke, J. 2004 Efecto de prácticas ecológicas sobre la población de *Ralstonia solanacearum* Smit, causante del Moko en plátano. Fitopatología Colombiana 28(2): 76-80.
- Arias, P; Dankers, C; Liu, P; Pilkauskas, P. 2004. La economía mundial del banano 1985-2002. FAO. Roma, IT. 95 p.
- Ayuso Rodríguez, F. 2000. Influencia de enmiendas orgánicas y un hongo endomicorrícico sobre el nematodo *Radopholus similis*, en banano *Musa* (AAA). Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 114p.
- Brooks, F. 2004. Banana Nematodes (en línea). Pests and disaeses of American Samoa, Number 9. Consultado 15 oct. 2009. Disponible en http://www.ctahr.hawaii.edu/adap2/ASCC_LandGrant/Dr_Brooks/BrochureNo9.
- Cañizares Monteros, C.A. 2003. Estudio sobre poblaciones de hongos endofíticos provenientes de suelos supresivos al nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorne en plantaciones comerciales de plátano en la zona de Talamanca, Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 75 p.

- Chagonda, L.S; Makanda, C; Chalchat, J.C. 1999. Essential oils of four wild and semi-wild plants from Zimbabwe: *Colospermum mopane* (Kirk ex Benth) Kirk ex Leonard, *Heliichrysum splendidum* (Thunb.) Less, *Myrothamnus flabellifolia* (Welw.) and *Tagetes minuta* L. Journal of Essential oil Research 11 (5):573-578.
- Chávez Méndez, N.P. 2007. Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorn. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 85 p.
- Chitwood, D. J. 1992. Nematicidal compounds from plants. In Nigg, H. N; Saigler, D. Eds. Phytochemical Resources for Medicine and Agriculture. Plenum Press, New York, US. p. 185-204.
- Christie, J. 1986. Nematodos de los vegetales: su ecología y control. Centro regional de ayuda técnica, Agencia para el Desarrollo Internacional (AID). MX/AR. 275 p.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 2004. Desarrollo de medidas de manejo del Moko (*Ralstonia solanacearum*), de plátano (*Musa* AAB) en Colombia, mediante investigación participativa con agricultores. Consultado 06 sep. 2009. Disponible en http://www.ciat.cgiar.org/ipm/pdfs/moko_platano_colombia_premio.pdf
- De Waele, D; Stoffelen, R; Kestemont, J. 2006. Efectos de las especies de plantas asociadas sobre los nematodos del banano. *InfoMusa* 15(1-2): 2-6.
- Dochez, C; Speijer, P.R; Hartman, J; Vuylsteke, D; De Waele, D. 2000. Screening *Musa* hybrids for resistance to *Radopholus similis*. *InfoMusa* 9(2):3-4.
- Dole, J; Wilkis, H. 1999. Floriculture: Principles and species. Prentice-Hall, Inc, New Jersey, US. p. 533-535.
- Escobar Vélez, J.H; Castaño Zapata, J. 2005. Manejo de las enfermedades causadas por *Mycosphaerella* spp. Mediante la aplicación de ácidos fúlvicos. *InfoMusa* 4(2):15-17.
- Espinal, C; Martínez, H; Peña, Y. 2006. La cadena del banano en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Documento de Trabajo No. 101 (en línea). Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, IICA, Observatorio Agrocadenas Colombia. Consultado 25 oct. 2009. Disponible en <http://www.agrocadenas.gov.co/home.htm>
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación). 2006. Banano, notas sobre productos básicos: situación del mercado del banano en 2005 y comienzos de 2006 (en línea). Consultado 20 oct. 2008. Disponible en http://www.fao.org/es/esc/es/15/190/highlight_191.html
- González Rodríguez, J.B; Fernández Gonzalves, E. 2003. Manejo alternativo de nematodos en musáceas. In Rivas, G; Rosales, F. Eds. Taller Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas. Guayaquil, Ecuador (11-13 de agosto 2003). INIBAP. MUSALAC. Montpellier, FR. p. 119- 120.
- Grainge, M; Ahmed, S. 1988. Handbook of plant with pest-control properties. John Wiley and sons, Nueva York. 470 p.
- Guzmán, R. S; Davide, R. G. 1992. Screening of various plant extracts for toxicity to *Meloidogyne incognita* and *Radopholus similis*. In Davide, R. Studies on nematodes

- affecting bananas in the Philippines. Philippine Agriculture and Resources Research Foundation, Inc. p. 133-139.
- Halbrendt, J. 1996. Allelopathy in the management of plant parasitic nematodes, *Journal of Nematology* 28(1):8-14.
- Horticom. 2005. Fertilizantes y nutriditos: Fuerte acción bioestimulante para la planta (en línea). Consultado 25 oct. 2009. Disponible en <http://www.horticom.com/pd/print.php?sid=62779>
- Jackson, G.V; Ruabete, T.K; Wright, J.G. 2003. Burrowing and lesion nematodes of bananas (en línea). Consultado 22 oct. 2009. Disponible en <http://www.spc.int/PPS/PDF%20PALs/PAL%2005%20Banana%20Burrowing%20Nematode.pdf>
- Lagunes T, A; Villanueva, J. 1994. Toxicología y manejo de insecticidas. Montecillo. MX. Colegio de Postgraduados. 264 p.
- Larco Reyes, E. 2004a. Desarrollo y evaluación de lixiviados de compost y lombricompost para el manejo de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), en plátano. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 77 p.
- Larco, E. 2004b. Preparación de lixiviados de compost y lombricompost. Hoja técnica No. 49. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología no.73:79-82.
- Larco, E; Riveros, A.S; Rosales, F; Pocasangre, L; Rivas, G; Polanco, D. 2004. Lixiviados de compost y lombricompost, una alternativa para el control biológico de la Sigatoka negra en plátano. *In* Memorias Congreso Latinoamericano de Bioplaguicidas y Agricultura Orgánica. 18 al 20 de Octubre 2004, San José, Costa Rica. Disco compacto, 8 mm.
- Lehman, P.S. 1979. Factors influencing nematode control with Marigolds (en línea). *Nematology Circular* no.50. Consultado 22 oct. 2009. Disponible en <http://www.doacs.state.fl.us/pi/enpp/nema/nemacirc/nem050.pdf>
- López Bazochi, I; Estévez Braun, A. 1992. Actividad nematocida de plantas Asteráceas frente a *Meloidogyne inognita*. *In* Reunión Anual de ONTA (27 abril AL 1 mayo, 1992) Lanzarote, Islas Canárias, España. Resúmenes. *Neotropica* 22(2):129.
- Marin, D.H; Sutton, T.B; Barker, K.R. 2002. Diseminación del banano en Latinoamérica y el Caribe y su relación con la presencia de *Radopholus similis*. *Manejo integrado de Plagas y Agroecología* no.66:62-75.
- Martínez, G; Delgado, E; Pragas, R; Manzanilla, E; Ramírez, H. 2007. Consideraciones generales sobre la producción y el comercio mundial del banano II: Exportaciones y perspectivas de la oferta y demanda mundial (en línea). *Revista CENIAP HOY* No 14. Consultado 12 oct. 2009. Disponible en http://www.ceniap.gov.ve/pbd/RevistasTecnicas/ceniaphoy/articulos/n14/pdf/g_martinez.pdf
- Meneses Hernández, A. 2003. Utilización de hongos endofíticos provenientes de banano orgánico para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 67 p.

- Menjivar Barahona, R.D. 2005, Estudio del potencial antagonista de hongos endofíticos para el biocontrol del nematodo barrenador *Radopholus similis* en plantaciones de banano en Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 69 p.
- Moens, T; Araya, M; Swennen, R; De Waele, D. 2003. Biodegradación acelerada de nematicidas de *Musa*. In Rivas, G; Rosales, F. Eds. Taller Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas. Guayaquil, Ecuador (11-13 de agosto 2003). INIBAP. MUSALAC. Montpellier, FR. p. 105-118.
- Montes, B.R; M. Carbajal, M; Figueroa; R; Méndez, I. 1997. Extractos sólidos, acuosos y hexánicos de plantas para el combate de *Aspergillus flavus* Link. en maíz. Revista Mexicana de Fitopatología 15:26-30.
- Morales Malley, R. 2006. Manejo de nematodos fitoparasíticos utilizando productos naturales y biológicos. Tesis Mag. Sc. Mayagüez, PR, Universidad de Puerto Rico. 80 p.
- Núñez Pérez, C.T. 2006. Estudio de poblaciones de bacterias endofíticas de la rizosfera del banano para el biocontrol del nematodo barrenador *Radopholus similis*. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 62 p.
- Pocasangre, L. 2003. Nuevas estrategias para el manejo de nematodos en musáceas. In Rivas, G; Rosales, F. Eds. Taller Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los Trópicos. Guayaquil, Ecuador (11-13 de agosto 2003). INIBAP. MUSALAC. Montpellier, FR. p. 121.
- Pocasangre, L.E; Menjivar, R.D; zum Felde, A; Riveros, A.E; Rosales, F.E; Sikora, R.A. 2006. Hongos endofíticos como agentes biológicos de control de fitonematodos en banano. In XVII Reunión Internacional de ACORBAT (15- 20 de octubre de 2006) Joinville, Santa Clara, BR. p 249- 254.
- Pocasangre, L.E; Sikora, R; Vilich, V; Schuster, R. 2000. Survey of banana endophytic fungi from Central America and screening for biological control of *Radopholus similis*. Acta Horticultural no.53:283-289.
- Pocasangre, L.E; zum Felde, A; Meneses, A; Cañizares, C; Riveros, A.S; Rosales, F.E; Sikora, R. 2004. Manejo alternativo de fitonematodos en banano y platano. In XVI Reunión Internacional de ACORBAT (26 de septiembre al 1 de octubre de 2004), Oaxaca de Juárez, Oaxaca, MX. p. 106-112.
- Ramírez Moreno, L.A; García Barrios, L.E; Rodríguez Hernández, C; Morales, H; Castro Ramírez, A. 2001. Evaluación del efecto de insecticidas de extractos de plantas sobre *Leptophobia aripa* Elodia. Manejo integrado de plagas (Costa Rica) 60:50-56.
- Riga, E; Hooper, C; Potter, J. 2005. In vitro effect of marigold seed exudates on plant parasitic nematodes. Phytoprotection 86(1):31-35.
- Rodríguez, H.C; Lagunes, T. A. 1992. Plantas con propiedades insecticidas; resultados de pruebas experimentales en laboratorio, campo y granos almacenados. Agroproductividad 1:17-25.
- Roman, J; Oramas, D; Green, J; Torrs, A. 1983. Control of nematodes and block weevils in plantain. Journal of Agriculture of University of Puerto Rico no.67:270-273.

- Russo, R; Lugo, J; Arreola, O; Arango, O. 1995. Efecto de un bioestimulante húmico extraído del raquis de banano (Pinzote) sobre el crecimiento de plántulas de banano (*Musa* AAA subgrupo "Cavendish" clon 'Gran enano). *Agronomía Mesoamericana* no.6:130-133.
- Russo, S; Delfino, S; Rodríguez, S; Badiola, M. 2005. Efecto de *Tagetes* spp. Sobre dos áfidos plagas de *Lactuca sativa* (L.). *Revista de la facultada de la Universidad Nacional del Cuyo* 27(1):55-59.
- Sabillón, A; Bustamante, M. 1996. Guía fotográfica para la identificación de plantas con propiedades plaguicidas. Parte I. Zamorano, HN. Escuela Agrícola Panamericana. 110p.
- Sarah, J. L. 1989. Banana nematodes and their control in Africa. *Nematropica* 19(2):199-216.
- Sarah, J.L. 1998. Las prácticas culturales como medio de control de nematodos en el banano. *In* Rosales F.E; Tripson, S.C; Cerna, J. Eds. Producción de banano orgánico y/o ambientalmente amigable. Memorias del taller internacional realizado en la EARTH, Guácimo, CR (27-29 de julio de 1998). INIBAP. Montpellier, FR. p. 138- 151.
- Sarah, J.L; Pinochet, J; Stanton, J. 1996. The burrowing nematode of bananas, *Radopholus similis* Cobb, 1913. *Musa Pest Fact Sheet No. 1.* (en línea). INIBAP. Consultado 22 oct. 2008. Disponible en <http://www.bioversityinternational.org/publications/pdf/129.pdf>
- Siddiqui, M.A; Alam, M.M. 1988. Toxicity of different plant parts of *Tagetes lucida* to plant parasitic nematodes. *Indian Journal of Nematology* 18:181-185.
- Sikora, R. A. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 30: 245-270.
- Smart, G. C; Perry, V.G. 1968. Tropical nematology. Center for Tropical Agriculture. University of Florida Press, Gainesville, US. Indiantown Printing. 153 p.
- Speijer, P. R; De Waele, D. 1997. Screening of *Musa* germplasm for resistance and tolerance to nematodes. INIBAP Technical Guidelines 1. IPGRI, Rome, Italy; INIBAP, Montpellier, France. 47 p.
- Tarté, R; Pinochet, J. 1981. Problemas nematológicos del banano: contribuciones recientes a su conocimiento y combate. Panamá, PA. INIBAP. 32p.
- Tsay, T.T; Wu, S.T; Lin, Y.Y. 2004. Evaluation of Asteraceae plants for control of *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*. 36(1): 36-41.
- Ufer Gil, C.M. 1997. Control bilógico de nematodos en banano (*Musa* AAA) usando *Paecilomyces lilacinus*. Tesis Ing. Agr. Guácimo, CR, EARTH. 45 p.
- Vargas, R; Araya, M. 2005. Efecto del número de aplicaciones de nematicidas químicos sobre los contenidos de raíces, nematodos y la productividad de la segunda a la cuarta generación de plantas *in vitro* de banana (*Musa* AAA cv. 'Grande Naine' y 'Williams') sembrados en áreas de renovación. Informe anual 2005. Sandoval, J.A. ed. CORBANA. p. 10-12.
- Vargas, R; Obregon, M; Araya, M. 2006. Efecto de los hongos *Paecilomyces lilacinus*, *Trichoderma* spp., *Lecanicillium lecanii* y *Clonostachys* spp. y las bacterias *Bacillus*

- subtilis*, *Pseudomonas cepacia* y *Bacillus thuringiensis* en el control de *Radopholus similis* en plantas *in vitro* de banano (*Musa* AAA, cv. Grande Naine) cultivadas en macetas. Informe anual 2006. Sandoval, J.A. ed. CORBANA. p. 18-23.
- Vasudevan, P; Kashyap, S; Sharma, S. 1997. *Tagetes*: a multipurpose plant. Bioresource Technol 62:29-35.
- Verduzco, L; Farias, J; Orozco, M; Guzmán, S. 1996. Efecto de la incorporación de plantas y aplicación de nematicidas sobre el control de nematodos agalladores. Revista Mexicana de Fitopatología 14:168.
- Wardlaw, C.W. 1961. Banana diseases. Edinburgoh, GB. LONGMANS. 647 p.
- zum Felde, A. 2002. Screening of the endophytic fungi from banana (*Musa*) for antagonistic effects towards the burrowing nematode *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. Mag. Sc. Tesis. Bonn, DE, University of Bonn. 53 p.
- zum Felde, A; Pocasangre, L.E; Cañizares Monteros, C.A; Sikora, R.A; Rosales, F.E; Riveros, A.S. 2006. Efecto de inoculaciones combinadas de hongos endofíticos en el biocontrol de *Radopholus similis*. InfoMusa 15(1-2):14-20.

3 ARTÍCULO I.

Efecto de diferentes concentraciones de extractos maduros y frescos de *Tagetes* spp. y raquis de banano sobre el biocontrol del nematodo barrenador *Radopholus similis*

3.1 Introducción

El cultivo de banano afronta continuamente problemas de mercado por su sobreoferta, lo que induce a los productores a exigencias fitosanitarias más estrictas para alcanzar altas producciones. Factores bióticos y abióticos afectan continuamente este cultivo limitando su producción (Araya 2003). Dentro de los factores bióticos los nematodos fitoparásitos son los más difíciles de controlar, siendo *Radopholus similis* y *Pratylenchus coffea* los más distribuidos y peligrosos, causantes de bajos rendimientos, caída de plantas y acortamiento de vida útil de las plantaciones comerciales (Sarah 1998, Chitwood 2002, González y Fernández 2003). Ciclos múltiples de nematicidas sistémicos son hasta el momento la única herramienta eficaz para reducir el daño causado por *R. similis* (Dochez et ál. 2000 y Sikora et ál. 2007).

Los altos costos, la poca eficiencia y la alteración de las cadenas tróficas que han causado los nematicidas hacen que se investigue métodos no contaminantes para el control de nematodos, siendo una alternativa el uso de productos de origen natural como los extractos botánicos. Plantas de la familia Asterácea entre ellas del género *Tagetes* spp. han demostrado tener propiedades fitotóxicas antimicrobiales y un alto poder nematológico (Zygodlo et ál. 1994, Topp et ál. 1998, Aballay 2005). El poder nematológico del género *Tagetes* se encuentra bien documentado para varias especies de fitonematodos (Daulton y Curtis 1963, Dao 1972, Charles 1995), pero existe aun poca información sobre el control de *Radopholus similis* (De Waele et ál. 2006). Asimismo el raquis del banano contiene sustancias que pueden controlar enfermedades y es uno de los principales subproductos de la industria bananera y representa alrededor de un 10 a 20% de la producción total (Bao et ál. 1987). Su principal uso en el campo agrícola es el compostaje del cual se obtiene un sustrato líquido denominado lixiviado que posee propiedades bioestimulantes por su alto contenido de nutrientes (Russo et ál. 1995). Al mismo tiempo otros estudios informan que se usan como controladores de enfermedades bacterianas y fungosas (Álvarez et ál. 2002, Arenas et ál. 2004, Larco et ál. 2004).

La escasa investigación en el uso de extractos botánicos de *Tagetes* spp. y la desconocida acción de los extractos de raquis de banano sobre el nematodo *Radopholus similis*, hacen posible que esta investigación tenga como objetivo estudiar el efecto controlador de extractos de raquis de banano y *Tagetes* spp. de forma individual y combinada a altas concentraciones sobre el nematodo barrenador *Radopholus similis* mediante la evaluación de toxicidad a altas concentraciones, reducción en la penetración y tasa de reproducción del nematodo en el sistema radical, en condiciones de invernadero.

3.2 Materiales y métodos

3.2.1 Localización del estudio

La investigación se llevó a cabo en las instalaciones del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), ubicado en el cantón Turrialba, provincia de Cartago, Costa Rica; específicamente en el laboratorio e invernadero de la sección de nematología. Las condiciones ambientales que prevalecen en la zona son temperaturas que oscilan entre los 22 y 28 °C, una elevación de 602 msnm, precipitaciones promedio anuales de 2600 mm y 87% de humedad relativa.

3.2.2 Material vegetal

El estudio consistió en tres bioensayos, para los cuales se utilizaron vitroplantas de banano (*Musa* AAA) del subgrupo Cavendish cultivar “Gran Enano” provenientes de un laboratorio de cultivo de tejidos.

El material vegetal de *Tagetes* spp. que se utilizó fue propagado en el invernadero del CATIE, Turrialba. Se seleccionó plantas sanas y florecidas, cuya morfología floral sea “flor amarilla-anaranjada doble”. El raquis se recolectó de plantaciones de banano del cultivar Gros Michel dentro de las instalaciones del CATIE, teniendo como parámetro de selección racimos de plantas sanas.

3.2.3 Metodología para obtención de extractos acuosos licuados

La elaboración de extractos acuosos maduros y frescos de *Tagetes* spp., raquis de banano y mixtos (mezcla de raquis y *Tagetes* spp.), se realizó mediante una técnica que no ha sido reportada en la literatura y que se desarrolló para este experimento. El material vegetal fue licuado con el objetivo de romper la pared celular para extraer los metabolitos secundarios que se encuentran en el interior y liberarlos en la solución acuosa.

El método consistió en triturar de forma total el material vegetal utilizando una licuadora de dos velocidades, colocando dos partes de agua y una parte de material vegetal pre-picado, obteniendo un extracto en una proporción 2:1. Una vez colocada el agua y el material vegetal pre-picado en la licuadora se procedió a licuar durante 30 segundos a diferentes velocidades, primero 10 segundos en velocidad “1”, luego 10 segundos en velocidad “2” y nuevamente 10 segundos en velocidad “1”, esto para asegurar que el material este totalmente triturado; hecho esto el contenido fue depositado en un colador y se procedió a exprimir el residuo de forma manual para extraer la mayor cantidad de extracto posible. Finalmente los extractos obtenidos fueron almacenados en contenedores herméticos a 4 °C.

La preparación de extractos acuosos licuados frescos de *Tagetes* spp. consistió en tomar toda la planta (hojas, tallos, flores, excepto raíz) y picarla finamente hasta obtener pequeños fragmentos para luego realizar una mezcla homogénea; por su parte el raquis de banano fue picado hasta obtener segmentos de aproximadamente 1 a 1,5 cm². Luego se tomo por separado un volumen de 250 ml (80 g *Tagetes* spp. y 155 g raquis aproximadamente) de cada material para ser depositado en la licuadora y se colocó 500 ml de agua de la llave para cada uno de los licuados, logrado así la proporción 2:1. Al final del proceso se obtuvo la cantidad de 500 ml de extracto acuoso de *Tagetes* spp. y 700 ml de extracto acuoso de raquis, siendo almacenados en contenedores de 1000 ml a una temperatura de 4 °C para ser utilizados al día siguiente.

Para la preparación de extractos mixtos (*Tagetes* spp. y raquis) se realizó picando finamente el raquis en pequeños segmentos de aproximadamente 1 a 1,5 cm² y el *Tagetes* spp. de la misma manera de forma separada, luego se tomo un volumen de 125 ml de cada uno y se deposito en la licuadora añadiéndole 500 ml de agua de la llave. Al final se obtuvo la cantidad

de 600 ml de extracto mixto y se lo almaceno de forma similar a los anteriores. Finalmente los extractos maduros se realizaron de la misma forma que los frescos con la diferencia que fueron fabricados 24 días antes de utilizarlos en los experimentos (Figura 2).



Figura 1. Proceso de obtención de extractos acuosos licuados de Tagetes spp. y raquis.

Las concentraciones utilizadas de los extractos fueron 10, 20, 30 y 40% para realizar cada uno de los tratamientos (Cuadro 2); estas se realizaron en contenedores herméticos individuales de 200 ml, donde se tomo de forma individual la cantidad de 20, 40, 60 y 80 ml de cada solución madre (extracto puro) de *Tagetes* spp. y raquis, para posteriormente llevarlas a un aforo de 200 ml añadiendo agua potable.

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos de extractos maduros y frescos de Tagetes spp. y raquis de banano evaluados en los bioensayos

Código	Tratamientos
MT10	Maduro <i>Tagetes</i> spp. 10%
MT20	Maduro <i>Tagetes</i> spp. 20%
MT30	Maduro <i>Tagetes</i> spp. 30%
MT40	Maduro <i>Tagetes</i> spp. 40%
MR10	Maduro raquis 10%
MR20	Maduro raquis 20%
MR30	Maduro raquis 30%
MR40	Maduro raquis 40%
MTR10	Maduro <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 10%
MTR20	Maduro <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 20%
MTR30	Maduro <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 30%
MTR40	Maduro <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 40%
FT10	Fresco <i>Tagetes</i> spp. 10%
FT20	Fresco <i>Tagetes</i> spp. 20%
FT30	Fresco <i>Tagetes</i> spp. 30%
FT40	Fresco <i>Tagetes</i> spp. 40%
FR10	Fresco raquis 10%
FR20	Fresco raquis 20%
FR30	Fresco raquis 30%
FR40	Fresco raquis 40%
FTR10	Fresco <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 10%
FTR20	Fresco <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 20%
FTR30	Fresco <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 30%
FTR40	Fresco <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 40%
TA	Testigo absoluto (sin <i>R. similis</i>)
TN	Testigo nematodos
TQ	Testigo químico (con <i>R. similis</i> y Terbufos 10GR)

3.2.4 Bioensayo del efecto de extractos maduros y frescos a diferentes niveles de concentración sobre el crecimiento de la planta de banano

Extractos acuosos licuados maduros y frescos fueron obtenidos mediante el procedimiento descrito en el numeral 3.2.3; siendo preparados 24 días antes y un día antes de su utilización respectivamente.

3.2.4.1 Protección de vitroplantas con extractos maduros y frescos

Vitroplantas de banano del cultivar “Gran Enano” (AAA) de seis semanas de endurecimiento colectivo en invernadero, fueron sembradas en contenedores plásticos de 16 onzas con una mezcla esterilizada de tierra y arena en una relación 1:1; el sustrato utilizado fue esterilizado en un horno eléctrico durante 12 horas a una temperatura de 300 °C. La inoculación de los tratamientos se realizó aplicando 5 ml en tres agujeros de 1 a 2 cm de

profundidad alrededor del área radical de cada planta utilizando una micropipeta Eppendorf calibrada. Posteriormente las plantas fueron distribuidas al azar sobre las mesas del invernadero donde permanecieron siete semanas (Figura 2).

Durante las seis semanas que permanecieron en el invernadero las plantas fueron re-inoculadas semanalmente con el objetivo de que el extracto se encuentre presente todo el tiempo. Para este ensayo se establecieron 6 repeticiones para cada tratamiento.



Figura 2. Protección de vitroplantas de banano con extractos maduros y frescos.

3.2.4.2 Evaluación de los extractos acuosos sobre el material vegetal

Luego de seis semanas de inoculación con los tratamientos de manera constante, las plantas fueron trasladadas al laboratorio de nematología del CATIE. Las plantas fueron separadas del contenedor y sus raíces lavadas para posteriormente ser separadas del cormo mediante un bisturí; luego se peso de forma separada las raíces y la parte aérea de la planta para determinar si existió un incremento o decremento del sistema radical y sección foliar comparado con el testigo absoluto y el químico.



Figura 3. Protocolo de evaluación de vitroplantas utilizadas en el ensayo de toxicidad.

3.2.5 Bioensayo de penetración de *Radopholus similis* en vitroplantas protegidas con extractos maduros y frescos a diferentes niveles de concentración

En la evaluación del efecto de extractos acuosos maduros y frescos de *Tagetes* spp. y raquis se utilizó plantas de seis semanas de endurecimiento colectivo en invernadero. Los extractos evaluados fueron comparados con un testigo absoluto, un testigo nematodos y un testigo químico (Cuadro 2).

La siembra y protección de las plantas se realizó utilizando la metodología detallada en el numeral 3.2.4.1. Posteriormente las plantas fueron distribuidas en el invernadero al azar, donde permanecieron durante tres semanas; para este ensayo se establecieron seis repeticiones por tratamiento (Figura 2).

3.2.5.1 Proliferación monoxénica de *Radopholus similis*

Mediante cultivos puros de *R. similis* provenientes del laboratorio de nematología del CATIE, se realizaron varios subcultivos en discos de zanahoria siguiendo la metodología descrita por O'Bannon y Taylor (1968), Speijer y De Waele (1997) y Dochez et ál. (2000). Bajo condiciones asépticas, zanahorias frescas fueron desinfectadas con detergente líquido durante 4 minutos, en una cámara de flujo laminar fueron asperjadas con alcohol al 95% y flameadas por tres veces consecutivas. La cáscara de la zanahoria fue removida con ayuda de un bisturí y se realizaron cortes transversales sobre papel toalla estéril para obtener discos de 3 a 5 mm aproximadamente; cada disco fue transferido a platos Petri de 35 mm para luego ser identificado y sellado con parafilme (Figura 4).



*Figura 4. Proceso de preparación de los discos de zanahoria para la reproducción de *R. similis*.*

Tomando cultivos asépticos en discos de zanahoria de *R. similis* se procedió a realizar los subcultivos. En condiciones asépticas se lavaron los platos que contenían los cultivos de nematodos para obtener una suspensión que fue recolectada en un tubo de ensayo estéril, luego se realizaron tres lavados con agua destilada estéril colocándose posteriormente 4 ml de cloruro de mercurio para la desinfección superficial de los nematodos; una vez precipitados los nematodos se realizó tres enjuagues con agua destilada estéril para eliminar el cloruro de mercurio. Terminada la desinfección se colocaron 2 ml de agua destilada más 5 ml de sulfato de estreptomicina como antibiótico, solución en la que permanecieron los nematodos por el lapso de tres horas; pasado este tiempo se retira el sobrenadante y se realizan tres enjuagues con agua destilada estéril.

Luego del proceso de desinfección, se procedió a inocular los discos de zanahoria en los platos Petri, aplicando tres gotas de la suspensión de nematodos (aproximadamente 100 nematodos en 10 μ l de solución) en tres diferentes puntos de cada disco. Los platos Petri fueron identificados y sellados con parafilm y almacenados en la incubadora bajo condiciones de oscuridad a 27°C de temperatura.



Figura 5. Proceso de inoculación en los discos de zanahoria de *R. similis*.

3.2.5.2 Inoculación de vitroplantas con *Radopholus similis*

Transcurridas dos semanas desde la inoculación con los extractos maduros y frescos, las plantas fueron inoculadas con 500 nematodos/planta. Los nematodos utilizados fueron recuperados de cultivos monoxénicos, utilizando para su extracción la metodología descrita por Pocasangre (2000), Meneses (2003) y Núñez (2006).

La inoculación se realizó utilizando la metodología descrita por Chaves (2007), aplicando 5 ml de una solución concentrada de *R. similis* en tres agujeros alrededor del área radical utilizando una pipeta Eppendorf calibrada. Para evaluar el efecto de las inoculaciones

con extractos maduros y frescos de *Tagetes* spp. y raquis de banano en la disminución de la penetración de *Radopholus similis* en el sistema radical, cada planta fue comparada con un control absoluto, un control nematodos y un testigo químico (10 ppm de Terbufos 10GR) (Cuadro 2).

3.2.5.3 Extracción y evaluación del porcentaje de penetración de *Radopholus similis*

Para evaluar la cantidad de nematodos presentes en el sistema radical de las plantas, se utilizó el método de licuado y tamizado descrito por Pocasangre (2000) y Araya (2002), que actualmente es utilizado en el laboratorio de nematología del CATIE y en el Laboratorio de Nematología de Corbana S.A. El porcentaje de penetración fue determinado utilizando el número de nematodos de cada tratamiento, comparando la actividad de inhibición a la penetración de plantas tratadas con respecto al testigo nematodos que fue inoculado con nematodos, sin extractos botánicos.



Figura 6. Proceso de extracción de nematodos utilizados en el bioensayo de penetración.

3.2.6 Ensayo de biocontrol de *Radopholus similis* en vitroplantas protegidas con extractos maduros y frescos a diferentes niveles de concentración

Plantas de seis semanas de endurecimiento colectivo en invernadero fueron utilizadas para evaluar el efecto de extractos maduros y frescos a altas concentraciones en el biocontrol de *Radopholus similis*, siendo comparadas con un testigo absoluto, un testigo referencial y un testigo químico (Cuadro 2).

Las plantas fueron sembradas en sustrato estéril en contenedores plásticos de 16 onzas de capacidad. Luego recibieron la protección siguiendo la metodología descrita en el inciso 3.2.4.1. Dos semanas después de la protección, se inoculó los nematodos siguiendo la metodología descrita en el numeral 3.2.5.2. Luego las plantas fueron distribuidas al azar en el

invernadero donde permanecieron por un lapso de seis semanas. Durante este tiempo se realizaron tres re-inoculaciones distribuidas de la siguiente forma: a) 8 días antes de la inoculación con *R. similis*, b) 15 días después de la inoculación con *R. similis* y c) 8 días antes del levantamiento del ensayo.

Al finalizar las seis semanas para la extracción de los nematodos se utilizó el método descrito en el inciso 3.2.5.3. El porcentaje de biocontrol de los extractos acuosos sobre *R. similis* se determinó mediante la comparación de la población final del nematodo en el sistema radical de las plantas que recibieron protección con respecto a la cantidad final de *R. similis* presente en las plantas del testigo referencial (Figura 7).



Figura 7. Proceso de extracción de nematodos utilizados en el ensayo de biocontrol de *R. similis*.

3.3 Diseño experimental para los ensayos de toxicidad, penetración y biocontrol

Los análisis estadísticos se realizaron mediante la utilización de modelos lineales generales y mixtos para evaluar los bioensayos de toxicidad, penetración y biocontrol. El ensayo se condujo en un diseño completamente aleatorizado con dos factores, tratamientos y semanas de evaluación. Se consideró el efecto de las medidas repetidas en el tiempo (semanas) modelando la estructura de varianzas y covarianzas según la variable analizada. Para obtener los grados de libertad adecuados para cada uno de los efectos, se consideró un efecto aleatorio de la unidad experimental (UE). Las variables altura, diámetro de pseudotallo y número de hojas fueron analizadas bajo el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + S_j + TS_{ij} + \epsilon_{ij}$$

donde:

$$\mu = \text{Media general}$$

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

S_j = Efecto semana

TS_{ij} = Efecto de interacción de tratamientos con semanas

ϵ_{ijk} = Error experimental

Para las variables peso foliar, peso radical, peso total y números de nematodos se realizó un análisis de varianza ANOVA para encontrar diferencias entre los tratamientos al final del ensayo. El modelo matemático para estas variables fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

donde:

Y_{ij} = Variable a medir

μ = Media general

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

ϵ_{ijk} = Término de error aleatorio independiente y supuestamente distribuido normal con media cero y varianza constante.

Como no se cumplieron los supuestos distribucionales se realizaron transformaciones a raíz o rangos según se dio el caso. Cuando se rechazó la hipótesis nula del ANOVA se usó la prueba de comparación de medias LSD de Fisher trabajando con un nivel de significación de 0,05.

3.4 Resultados

3.4.1 Bioensayo del efecto de extractos maduros y frescos a diferentes niveles de concentración sobre el crecimiento de la planta de banano

Durante las seis semanas de protección constante con extractos botánicos a varios niveles concentración se encontraron diferencias significativas en las variables altura de planta ($p \leq 0,0310$) y diámetro de pseudotallo ($p \leq 0,0019$), no así para la variable número de hojas ($p \leq 0,6850$). Para las variables de promoción de crecimiento evaluadas luego de seis semanas de protegidas las plantas, se encontraron diferencias altamente significativas en el peso de la raíz ($p \leq 0,0001$) y peso total ($p \leq 0,0001$), al ser comparados los tratamientos con el testigo absoluto y el testigo químico (Cuadro 3).

Para la variable peso radical, cuatro de los tratamientos tuvieron pesos superiores al TA (7,8 g), de este grupo se diferencian el FT40 y FR40 que estadísticamente son superiores al resto alcanzando valores de 9,8 y 8,4 g respectivamente. Al organizar los valores medios de peso total se detectó que se forman dos grupos bien diferenciados, los tratamientos de extracto fresco que se encuentran sobre el TA, donde sobresalen las altas concentraciones (30 y 40%) y prevalece el efecto aditivo FTR (Fresco *Tagetes*-Raquis); y los tratamientos de extractos maduros solos que se encuentran por debajo del TQ, donde el factor común es la no sinergia de los productos.

Cuadro 3. Efecto de los extractos maduros y frescos sobre el desarrollo vegetativo de vitroplantas de banano cv. "Gran Enano", después de seis semanas en invernadero

Código	Tratamiento	Altura planta	Pseudotallo (mm)	Peso (g)		
				Raíz	Foliar	Total
FT40	Fresco <i>Tagetes</i> spp. 40%	8,33 ^a	7,51 ^{ab}	9,77 ^a	22,70	32,47 ^a
FR40	Fresco raquis 40%	8,12 ^{abcde}	7,42 ^{abc}	8,38 ^{ab}	23,93	32,32 ^a
FTR40	Fresco <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 40%	8,58 ^a	7,37 ^{abcd}	8,07 ^{bc}	23,37	31,43 ^{ab}
FTR20	Fresco <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 20%	8,16 ^{abcd}	7,36 ^{abcd}	8,27 ^b	22,70	30,97 ^{abc}
FTR10	Fresco <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 10%	8,20 ^{abcd}	7,53 ^{ab}	7,17 ^{bcde}	22,78	29,95 ^{abcd}
FTR30	Fresco <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 30%	8,11 ^{abcde}	7,56 ^a	6,35 ^{defgh}	23,18	29,53 ^{abcde}
FT30	Fresco <i>Tagetes</i> spp. 30%	8,27 ^{abc}	7,55 ^{ab}	5,18 ^{ghijk}	23,85	29,03 ^{abcdef}
FR20	Fresco raquis 20%	8,32 ^{ab}	7,54 ^{ab}	6,78 ^{cdef}	22,23	29,02 ^{abcdef}
TA	Testigo absoluto	8,12^{abcde}	7,33^{abcde}	7,77^{bcd}	21,00	28,77^{abcdefg}
MTR30	Maduro <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 30%	8,18 ^{abcd}	7,5 ^{ab}	5,87 ^{efghij}	22,32	28,18 ^{bcdefgh}
FR10	Fresco raquis 10%	8,10 ^{abcde}	7,55 ^{ab}	5,80 ^{efghij}	22,07	27,87 ^{bcdefgh}
MTR40	Maduro <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 40%	8,08 ^{abcdef}	7,38 ^{abcd}	4,98 ^{hijk}	22,53	27,52 ^{cdefgh}
FR30	Fresco raquis 30%	8,25 ^{abc}	7,32 ^{abcde}	5,58 ^{fghijk}	21,72	27,30 ^{cdefgh}
FT20	Fresco <i>Tagetes</i> spp. 20%	8,10 ^{abcde}	7,21 ^{abcdef}	6,52 ^{defg}	20,70	27,22 ^{cdefgh}
MTR10	Maduro <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 10%	8,55 ^a	7,52 ^{ab}	5,35 ^{ghijk}	21,68	27,03 ^{defgh}
FT10	Fresco <i>Tagetes</i> spp. 10%	7,97 ^{abcdef}	7,34 ^{abcd}	5,50 ^{fghijk}	21,50	27,00 ^{defgh}
MT30	Maduro <i>Tagetes</i> spp. 30%	7,99 ^{abcdef}	7,35 ^{abcd}	4,87 ^{ijk}	21,80	26,67 ^{defgh}
MR20	Maduro raquis 20%	7,30 ^f	6,99 ^{cdef}	5,30 ^{ghijk}	21,27	26,57 ^{defgh}
MTR20	Maduro <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 20%	8,00 ^{abcdef}	7,54 ^{ab}	5,88 ^{efghij}	20,45	26,33 ^{defgh}
TQ	Testigo químico	7,82^{abcdef}	7,11^{bcdef}	6,23^{efghi}	19,93	26,17^{defgh}
MR40	Maduro raquis 40%	7,55 ^{bcdef}	6,87 ^{ef}	4,83 ^{jk}	21,02	25,85 ^{efgh}
MT10	Maduro <i>Tagetes</i> spp. 10%	7,53 ^{cdef}	7,01 ^{cdef}	5,33 ^{ghijk}	20,25	25,58 ^{fgh}
MT20	Maduro <i>Tagetes</i> spp. 20%	7,35 ^{ef}	7,25 ^{abcdef}	5,15 ^{ghijk}	19,92	25,07 ^{gh}
MR30	Maduro raquis 30%	7,31 ^f	6,82 ^f	4,20 ^k	20,62	24,82 ^h
MR10	Maduro raquis 10%	7,80 ^{abcdef}	6,94 ^{def}	5,23 ^{ghijk}	19,52	24,75 ^h
MT40	Maduro <i>Tagetes</i> spp. 40%	7,43 ^{def}	6,86 ^f	4,80 ^{jk}	19,60	24,40 ^h

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

3.4.2 Bioensayo de penetración de Radopholus similis en vitroplantas protegidas con extractos maduros y frescos a diferentes niveles de concentración

Siete días después de la inoculación con *Radopholus similis*, se encontraron diferencias significativas para la variable peso radicular ($p \leq 0,0015$). El número de nematodos en las raíces también fue menor en plantas protegidas con extractos botánicos de *Tagetes* spp. y raquis de banano que en plantas del testigo inoculadas con nematodos (TN), presentando diferencias significativas ($p \leq 0,0139$). Los porcentajes de penetración en plantas con los tratamientos se establecieron en los rangos entre 3 a 15%, en comparación al 36,6% del TN. De los 24 tratamientos evaluados 14 fueron superiores al testigo químico (10 ppm de Terbufos 10GR), teniendo porcentajes de penetración entre 3 a 8%, con reducciones en la penetración de *R. similis* que oscila entre 77 y 91% (Cuadro 4).

Los tratamientos de extractos frescos presentaron los mejores resultados en el ensayo de penetración, puesto que de los 14 mejores el 71% pertenecen a extractos frescos y 29% a maduros. Cabe señalar que los extractos maduros que tienen efecto positivo en la penetración son los combinados a altas concentraciones, exceptuando el MR40.

Cuadro 4. Efecto de los extractos maduros y frescos sobre la penetración de *R. similis* en vitroplantas de banano cv. “Gran Enano”, después de tres semanas en invernadero

Código	Tratamientos	Peso (g)			Nematodos Total	Penetración %	Reducción Penetración %
		Raíz	Foliar	Total			
FR30	Fresco raquis 30%	3,00 ^{bcdefgh}	11,63	14,63	17 ^{cd}	3,33	91
MTR20	Maduro <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 20%	3,05 ^{bcdefg}	11,37	14,42	17 ^{cd}	3,33	91
FT10	Fresco <i>Tagetes</i> spp. 10%	2,77 ^{bcdefgh}	10,78	13,55	25 ^{bcd}	5,00	86
FTR40	Fresco <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 40%	2,80 ^{bcdefgh}	11,10	13,90	25 ^{bcd}	5,00	86
FR10	Fresco raquis 10%	2,40 ^h	11,80	14,20	33 ^{bcd}	6,67	82
FR40	Fresco raquis 40%	2,68 ^{defgh}	11,25	13,93	33 ^{bcd}	6,67	82
FT30	Fresco <i>Tagetes</i> spp. 30%	2,60 ^{efgh}	10,63	13,23	33 ^{bcd}	6,67	82
FTR30	Fresco <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 30%	2,62 ^{efgh}	10,65	13,27	33 ^{bcd}	6,67	82
MTR30	Maduro <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 30%	2,50 ^{fgh}	10,65	13,15	33 ^{bcd}	6,67	82
MTR40	Maduro <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 40%	2,72 ^{cdefgh}	12,20	14,92	33 ^{bcd}	6,67	82
FR20	Fresco raquis 20%	2,67 ^{efgh}	10,65	13,32	42 ^{bcd}	8,33	77
FT20	Fresco <i>Tagetes</i> spp. 20%	3,30 ^{abcd}	10,75	14,05	42 ^{bcd}	8,33	77
FT40	Fresco <i>Tagetes</i> spp. 40%	3,17 ^{abcde}	10,53	13,70	42 ^{bcd}	8,33	77
MR40	Maduro raquis 40%	2,52 ^{fgh}	10,65	13,17	42 ^{bcd}	8,33	77
FTR10	Fresco <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 10%	2,62 ^{efgh}	11,67	14,28	50 ^{bc}	10,00	73
MR10	Maduro raquis 10%	2,72 ^{cdefgh}	10,57	13,28	50 ^{bc}	10,00	73
MT20	Maduro <i>Tagetes</i> spp. 20%	2,55 ^{efgh}	10,02	12,57	50 ^{bc}	10,00	73
MTR10	Maduro <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 10%	2,43 ^{gh}	11,47	13,90	50 ^{bc}	10,00	73
FTR20	Fresco <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 20%	2,50 ^{fgh}	10,67	13,17	58 ^{bc}	11,67	68
TQ	Testigo químico	3,33 ^{abc}	11,80	15,13	58 ^{bc}	11,67	68
MR20	Maduro raquis 20%	2,60 ^{efgh}	10,60	13,20	67 ^{bc}	13,33	64
MR30	Maduro raquis 30%	2,62 ^{efgh}	10,63	13,25	67 ^{bc}	13,33	64
MT40	Maduro <i>Tagetes</i> spp. 40%	2,53 ^{fgh}	10,93	13,47	67 ^{bc}	13,33	64
MT10	Maduro <i>Tagetes</i> spp. 10%	3,68 ^a	11,12	14,80	75 ^b	15,00	59
MT30	Maduro <i>Tagetes</i> spp. 30%	3,12 ^{bcdef}	11,97	15,08	75 ^{bc}	15,00	59
TN	Testigo nematodos	2,98 ^{bcdefgh}	9,87	12,85	183 ^a	36,67	0

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

3.4.3 Ensayo de biocontrol de *Radopholus similis* en vitroplantas protegidas con extractos maduros y frescos a diferentes niveles de concentración

Luego de seis semanas de establecido el ensayo, los tratamientos presentaron diferencias significativas para las variables altura de planta ($p \leq 0,0037$) y diámetro de pseudotallo ($p \leq 0,0364$). Para la variable altura de planta los cinco tratamientos que mejor se ubicaron fueron FTR30, MR40, FTR20, FR40, FTR40 y para el diámetro de pseudotallo los cinco mejores ubicados fueron FTR30, MR40, FR40, FTR20, MT40; siendo todos estadísticamente similares con el testigo nematodos y diferentes del testigo químico. Dieciséis

de los extractos maduros y frescos presentaron una disminución en la cantidad de *Radopholus similis*, siendo estadísticamente similares al control químico (10 ppm de Terbufos 10GR). De igual forma diecisiete tratamientos presentaron tasas de reproducción similares al testigo químico (1,40) y el rango oscilo entre 1,63 a 2,40, siendo estadísticamente diferente ($p \leq 0,0017$) al testigo inoculado con nematodos (2,93).

Cuadro 5. Efecto de los extractos maduros y frescos sobre el control de R. similis en vitroplantas de banano cv. "Gran Enano", después de seis semanas de inoculadas

Código	Tratamientos	Altura planta (cm)	Pseudotallo (mm)	Peso (g)		Nematodos Biocontrol totales	Biocontrol %	Tasa de reproducción
				Raíz	Foliar			
TQ	Testigo químico	4,2 ^{ef}	4,81 ^e	3,02	8,46	700 ^{ab}	52	1,40 ^{ab}
MR40	Maduro raquis 40%	5,2 ^a	5,71 ^{ab}	3,77	11,07	817 ^{bc}	44	1,63 ^{bc}
FR40	Fresco raquis 40%	5,0 ^{abc}	5,65 ^{abc}	3,40	11,23	942 ^{bcd}	36	1,88 ^{bcd}
MTR40	Maduro <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 40%	4,7 ^{abcde}	5,49 ^{abcd}	2,97	10,03	958 ^{bcd}	35	1,92 ^{bcd}
FR30	Fresco raquis 30%	5,0 ^{abcd}	5,50 ^{abcd}	3,13	9,50	967 ^{bcde}	34	1,93 ^{bcde}
MTR20	Maduro <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 20%	4,4 ^{cdef}	5,37 ^{abcd}	3,47	10,05	975 ^{bcde}	34	1,95 ^{bcde}
MTR30	Maduro <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 30%	4,8 ^{abcde}	5,54 ^{abcd}	3,92	10,47	975 ^{bcdef}	34	1,95 ^{bcdef}
MR30	Maduro raquis 30%	4,4 ^{cdef}	5,10 ^{de}	2,88	8,95	992 ^{bcdef}	32	1,98 ^{bcdef}
MT30	Maduro <i>Tagetes</i> spp. 30%	4,7 ^{abcdef}	5,58 ^{abcd}	3,62	11,73	992 ^{bcdef}	32	1,98 ^{bcdef}
FR20	Fresco raquis 20%	4,9 ^{abcd}	5,44 ^{abcd}	2,83	9,18	1008 ^{bcdefg}	31	2,02 ^{bcdefg}
FR10	Fresco raquis 10%	5,0 ^{abcd}	5,46 ^{abcd}	3,30	9,68	1042 ^{bcdefg}	29	2,08 ^{bcdefg}
FTR30	Fresco <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 30%	5,2 ^a	5,77 ^a	4,05	12,28	1042 ^{bcdefg}	29	2,08 ^{bcdefg}
FT40	Fresco <i>Tagetes</i> spp. 40%	4,2 ^{ef}	5,19 ^{cde}	2,68	8,83	1050 ^{bcdefg}	28	2,10 ^{bcdefg}
MT20	Maduro <i>Tagetes</i> spp. 20%	4,4 ^{def}	5,43 ^{abcd}	3,28	10,48	1083 ^{bcdefg}	26	2,17 ^{bcdefg}
MTR10	Maduro <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 10%	4,8 ^{abcde}	5,48 ^{abcd}	3,37	9,23	1100 ^{bcdefg}	25	2,20 ^{bcdefg}
MR10	Maduro raquis 10%	4,8 ^{abcde}	5,43 ^{abcd}	3,33	10,72	1158 ^{cdefg}	21	2,32 ^{cdefg}
MT10	Maduro <i>Tagetes</i> spp. 10%	4,7 ^{abcdef}	5,41 ^{abcd}	3,32	11,65	1200 ^{cdefg}	18	2,40 ^{cdefg}
FTR40	Fresco <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 40%	5,0 ^{abcd}	5,57 ^{abcd}	3,10	10,62	1283 ^{cdefg}	13	2,57 ^{cdefg}
FT20	Fresco <i>Tagetes</i> spp. 20%	4,1 ^f	5,09 ^{de}	2,67	9,50	1308 ^{defg}	11	2,62 ^{defg}
MR20	Maduro raquis 20%	5,0 ^{abcd}	5,42 ^{abcd}	3,28	9,32	1308 ^{defg}	11	2,62 ^{defg}
FTR20	Fresco <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 20%	5,1 ^{ab}	5,62 ^{abc}	3,43	11,08	1333 ^{defg}	9	2,67 ^{defg}
MT40	Maduro <i>Tagetes</i> spp. 40%	4,9 ^{abcd}	5,61 ^{abc}	3,32	10,38	1342 ^{defg}	9	2,68 ^{defg}
FTR10	Fresco <i>Tagetes</i> spp.+ raquis 10%	4,5 ^{bcdef}	5,23 ^{bcde}	2,85	9,62	1433 ^{defg}	2	2,87 ^{defg}
FT10	Fresco <i>Tagetes</i> spp. 10%	4,6 ^{bcdef}	5,27 ^{bcde}	3,65	9,53	1450 ^{efg}	1	2,90 ^{efg}
FT30	Fresco <i>Tagetes</i> spp. 30%	4,6 ^{bcdef}	5,37 ^{abcd}	3,22	11,60	1458 ^{efg}	1	2,92 ^{efg}
TN	Testigo nematodos	4,7 ^{abcde}	5,35 ^{abcd}	3,17	9,97	1467 ^g	0	2,93 ^g

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

3.5 Discusión

Está comprobado que plantas del género *Tagetes* tiene actividad fitotóxica a fitonamátodos (Morallo 1987, Topp et ál. 1998). Esta actividad nematicida está relacionada a los metabolitos secundarios solos o en grupos de compuestos pueden provocar reacciones tóxicas de forma inmediata o a largo plazo en los organismos, dependiendo de la parte empleada y la dosis suministrada (Ocampo et ál. 2007). Muchas especies de plantas pueden producir al transformarse en extractos o mediante secreciones propias productos aleloquímicos de alta toxicidad (Haugland y Brandsaeter 1996), siendo utilizados como una alternativa a los herbicidas (Lee et ál. 2002).

El bioensayo del efecto de los extractos sobre las variables de crecimiento de la planta quedó demostrado que extractos tanto maduros como frescos promueven el desarrollo de plantas de banano, sin presentar sintomatología toxicológica, contrario a lo que reportan Kil et ál. (2002) quienes encontraron que extractos acuosos de *Tagetes minuta* a altas concentraciones presentaron efectos alelopáticos en la germinación de semillas de *Lotus corniculatus* y *Lactuca sativa*, donde encontró que una malformación en la raíz y falta de pelos absorbentes que limitó la absorción de nutrientes; el mismo efecto fue observado por Machado (2007) quien en sus experimentos utilizó semilla de *Bromus tectorum* la cual fue expuesta a extractos acuosos de varias especies entre ellas *Tagetes* spp., encontrando inhibición en la germinación, pérdida de crecimiento, bajo desarrollo de brotes y poco desarrollo radicular. La variable peso radical de la planta tubo un incremento significativo ($p \leq 0,0001$) con respecto a sus testigos, al utilizar extractos frescos de *Tagetes* spp. y raquis a los niveles más altos de concentración (30 y 40%) a diferencia de los extractos maduros cuyo efecto fue mínimo. Esto difiere con lo reportado Araya (2009) reportó que infusiones de flores de *Datura suaveolens* con dosis entre 5 y 20% presentaron reducciones en el peso radical de la planta de banano al ser utilizadas para el control de *Radopholus similis*, por lo que considera que estas dosis tuvieron un efecto tóxico en el sistema radical de la planta de banano. Por otra parte, el raquis de banano al ser utilizado en su mayoría para el compostaje ha sido estudiado en forma de lixiviados para el control de algunas enfermedades (Baquero et ál. 2000, Giraldo et ál. 2000, Larco et ál. 2004). Estudios realizado por Álvarez et ál. (2000) concluyeron que al utilizar el 5% de concentración de lixiviados de raquis de plátano lograron una reducción

significativa *Sphaerotheca panosa* var. *rosae* en el cultivo de rosas, pero a concentraciones superiores al 50% se encontró que causaba fitotoxicidad en el follaje.

Los resultados obtenidos en los ensayos de penetración y biocontrol realizados en este estudio demuestran que; para el ensayo de penetración tanto extractos *Tagetes* spp. y raquis de banano independientes de la concentración tienen un efecto en la reducción de la penetración de *R. similis*, alcanzando reducciones superiores al 91% incluso superiores al testigo químico con 68%. Asimismo, este efecto de reducción en la penetración fue encontrado mayormente en extractos frescos que en maduros. Este hallazgo es de suma importancia, ya que los extractos pueden ser utilizados inmediatamente después de su preparación, lo cual significa un ahorro en tiempo y en dinero de mantenimiento y producción del extracto. Resultados similares fueron encontrados por Walia y Gupta (1997) cuando evaluaron extractos acuosos de *Tagetes* spp. de 30 y 60 días maduración, encontrando un efecto de inmovilización e inhibición en la eclosión de huevos de *M. javanica* en extractos jóvenes de 30 días, mientras que los efectos se redujeron levemente en extractos de 60 días. La cualidad de los *Tagetes* spp. para el control de nematodos se le atribuye al contenido de Triofenos que se encuentran en el interior de los tejidos de la planta (Winoto 1969, Morallo 1987, Topp et ál. 1998). McKenry (1991) aclara que aparte de los Triofenos existen otros compuestos que están en el interior de la planta y que tiene potencial biocida; entre los otros compuestos presentes en el género *Tagetes* resaltan los terpenoides, polythienyls, bithienyls, terthienyl y piretrinas (Bakker et ál. 1979, Vasudevan et ál. 1997, Chitwood 2002, Mya et ál. 2002).

Por otra parte, en otros patosistemas se ha evaluado que el ácido fúlvico obtenido a través del compostaje de raquis de plátano a bajas concentraciones ha logrado controlar enfermedades como *Mycosphaerella* spp. en plátano (Escobar y Castaño 2005) y mildiu polvoso en rosas (Álvarez et ál. 2002). Además, Larco (2004b) afirma que lixiviados del compostaje de raquis de banano o plátano puede funcionar como un insumo preventivo contra la Sigatoka Negra.

El ensayo de biocontrol por su parte reveló que extractos de *Tagetes* spp. y raquis tiene un efecto de biocontrol sobre *Radopholus similis*, similar estadísticamente al testigo químico (Terbufos 10 GR). Este efecto también lo observó Carranza (2004), cuando evaluó extractos de *Asparagus officinalis*, *Tagetes tenuifolia* y *Crotalaria longirostrata*, donde no se evidenció

un efecto de control al utilizarlos sobre el nematodo fitoparásito *Meloidogyne* sp. en el cultivo de zanahoria bajo condiciones de invernadero. Resultados atípicos también los encontró Prada (1996) cuando evaluó extractos acuoso de *Allium sativum*, *Tagetes* spp., *Carica papaya* y *Cynodon dactylon* contra *M. incognita* en plantas de frijol donde el extracto de *Tagetes* en vez de reducir el enquistamiento y el número de nematodos final lo aumento. En ensayos realizados por Araya (2009) utilizando una infusión y un biofermento de *D. suaveolens* para el control de *R. similis* observó la poca efectividad que tienen estos productos ya que no encontró diferencias en el número de nematodos totales al final del experimento. Productos botánicos comerciales como el NemaGold al 5% que es fabricado a base de *Tagetes erecta* y algas marinas también ha mostrado poca eficacia al ser evaluado en forma *in vitro* (Araya 2008).

Insunza et ál. (2001) afirman que la actividad nematocida de extractos acuosos puede verse afectada por factores como la presencia en el agua de compuestos tóxicos, microbianos, fuerza osmótica, alteraciones en el pH o simplemente la eliminación de oxígeno en las soluciones. Por otra parte, Ramírez et ál. (2001) mencionan que ese efecto puede deberse a que la concentración pudo haber sido baja o que los compuestos químicos de la planta no actúan de la misma manera sobre los organismos. Asimismo, los métodos de aplicación de los extractos botánicos tienen que ser evaluados para cada patosistema en particular con la finalidad de encontrar una mayor eficiencia del control.

Extractos de *Tagetes* spp. y raquis de banano demostraron en los ensayos evaluados que inducen el crecimiento de la planta de banano, este resultado también lo obtuvo Natarajan et ál. (2006), quienes observaron un incremento en el número de hojas y altura de planta de *L. escolentum* al aplicar extractos acuosos frescos de *Tagetes erecta* sobre la superficie del suelo que contenía *M. incognita*; asimismo Olabiyi (2008) encontró al evaluar cuatro niveles de concentraciones de extractos acuosos de raíces de marigold (*Tagetes* spp.), albahaca y Nitta una disminución en poblaciones de *Meloidogyne incognita*, además reporta un incremento en altura de planta, número de hojas y producción de frutos de Tomate cv. DT 69/257. En el caso de extractos de raquis que presentaron resultados muy prometedores sobre las variables de crecimiento de la planta, la poca información científica documentada hace que se contraste los resultados con el principal uso de raquis que ha sido los lixiviados provenientes del compostaje que han demostrado tener efectos sobre el crecimiento de las plantas, es por eso que Russo et ál. (1995) evaluaron el crecimiento de plántulas de banano cv. “Gran Enano”

aplicando pequeñas dosis del bioestimulante húmico extraído del raquis de banano, donde obtuvieron incrementos significativos en el crecimiento radical, área foliar y biomasa de las hojas. Arreola (1993) también encontró que extractos húmicos obtenidos a partir de pinzote de banano parcialmente descompuesto puede emplearse como bioestimulante del crecimiento de plantas de banano en condiciones de vivero. Por su parte Muñoz y Madriñán (2005) encontraron que con la aplicación de lixiviados de raquis de plátano a una concentración del 25% se logra promover la actividad microbiana del suelo, teniendo un mayor aumento en la floración en plantas de tomate; posiblemente estos efectos son el resultado de la alta composición mineral y el alto contenido de potasio que posee el raquis (Belalcázar et ál. 1991; Escobar y Castaño 2005).

3.6 Conclusiones

- Los extractos de *Tagetes* spp. y raquis de banano en niveles de concentración elevados demostraron no tener efectos tóxicos sobre vitroplantas de banano.
- Se logró determinar que extractos frescos tienen un efecto de promoción de crecimiento sobre el desarrollo de la planta de banano, puesto que promueven el aumento de la biomasa, esto comparándolos con extractos maduros cuyos efectos en el crecimiento fueron nulos.
- Se determinó que extractos acuosos de *Tagetes* spp. y raquis de banano reducen la penetración del nematodo *Radopholus similis* donde presentaron porcentajes que van desde 77 a 91%, los cuales fueron superiores al Terbufos 10GR (68%).
- Dieciséis de los tratamientos de extractos acuosos de *Tagetes* spp. y raquis de banano presentaron igual actividad de control que el testigo químico y diferenciándose estadísticamente del testigo absoluto.
- Extractos que contenían como producto el raquis de banano (frescos y maduros) demostraron en los tres ensayos que promovían el aumento de la biomasa de la planta de banano, por lo que puede ser considerado a futuro una alternativa a de fertilización.

3.7 Bibliografía

- Aballay, E. 2005. Uso de plantas antagónicas para el control de nematodos fitoparasítos en vides (en línea). Universidad de Chile. Consultado 28 jun. 2009. Disponible en http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/19.html
- Álvarez, E.C; Grajales, J; Villegas, J; Loke. 2002. Control del mildew polvoso (*Sphaerotheca panosa* var. *rosae*) en rosa, usando un lixiviado de compost del raquis de plátano (*Musa* AAB) (en línea). Informe Anual, CIAT. Consultado 10 oct. 2009. Disponible en http://www.ciat.cgiar.org/ipm/pdfs/cassava%20_pathology.pdf
- Araya, M. 2002. Metodología utilizada en el laboratorio de nematología de CORBANA S.A. para la extracción de nematodos de las raíces de banano (*Musa* AAA) y plátano (*Musa* AAB). Revista CORBANA 28(55):97-110.
- Araya, M. 2003. Situación actual del manejo de nematodos en banano (*Musa* AAA) y plátano (*Musa* AAB) en el trópico americano. In Rivas, G; Rosales, F. Eds. Taller Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas. Guayaquil, Ecuador (11-13 de agosto 2003). INIBAP. MUSALAC. Montpellier, FR. p. 79-102.
- Araya, M. 2008. Evaluación in viro de los extractos comerciales: Dazitol, Nemagold y Cascalote en el control de *Radopholus similis*. Informe anual 2007. Sandoval, J.A. ed. CORBANA. p.12.
- Araya, M. 2009. Efecto de *Datura suaveolens* (reina de la noche) en el control de *Radopholus similis* y el crecimiento de plantas de banano (*Musa* AAA cv. Grande Nanine) cultivadas en macetas y campo. Informe anual 2008. Sandoval, J.A. ed. CORBANA. p. 24-25.
- Arenas, A; López, D; Álvarez, E; Llano, G; Loke, J. 2004 Efecto de prácticas ecológicas sobre la población de *Ralstonia solanacearum* Smit, causante del Moko en plátano. Fitopatología Colombiana 28(2): 76-80.
- Arreola Flores, O. G. 1993. El pinzote de banano como fuente de un bioestimulante húmico y su efecto sobre el crecimiento inicial de plántulas de banano (*Musa* AAA subgrupo "Cavendish" clon 'Gran enano'. Tesis Ing. Agr. Guácimo, CR, EARTH. 22 p.
- Bakker, J; Gommers, F. J; Nieuwenhuis, I; Wynberg, H. 1979. Photoactivación or the nematicidal compound α -Terthienyl from roots of Marigolds (*Tagetes* species). Journal of Biological Chemistry 245(6):1841-1844.
- Bao, I.M; Delgado, D.S; Torres, S.M. 1987. Aprovechamiento de residuos de platanera I. Producción en las islas canarias, sus características y alternativas de utilización. Revista Agroquímica y tecnología de alimentos 27(1):24-30.
- Bao, I.M; Delgado, D.S; Torres, S.M. 1987. Aprovechamiento de residuos de platanera I. Producción en las islas canarias, sus características y alternativas de utilización. Revista Agroquímica y tecnología de alimentos 27(1):24-30.
- Baquero, C; Suárez, D; Pinto, M. 2000. El lombriabono como alternativa tecnológica para la fertilización del cultivo de plátano en la región Caribe (en línea). Resumen ejecutivo,

Pronatta. Consultado 23 sep. 2009. Disponible en <http://www.pronatta.gov.co/infoproductos2/resumenes%20ejecutivos/961470068-r.doc>

- Belalcázar, C. S; Salazar, C.A; Cayón, G; Lozada, J. E; Castillo, L. E; Valencia, J. A. 1991. Manejo de plantaciones. In Belalcázar, S. Ed. El cultivo del plátano en el trópico. Armenia, Quindío. Feriva. p. 147-239.
- Carranza González, A. E. 2004. Evaluación de tres productos botánicos (*Crotalaria longirostrata*, *Tagetes tenuifolia* y *Asparagus officinalis*) y dos concentraciones para el control del nematodo *Meloidogyne* sp. en el cultivo de Zanahoria (*Daucus carota*); a nivel de invernadero. Tesis Ing. Agr. Universidad de San Carlos de Guatemala, GT. 64 p.
- Charles S.C. 1995. Effect of intercropping antagonistic crops against nematodes in banana. *Annals of Plant Protection Sciences* 3:185-187.
- Chávez Méndez, N.P. 2007. Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorn. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 85 p
- McKenry, M.V. 1991. Marigolds and nematode management. *UC Plant Protection Quarterly* 1(2):1-5.
- Chitwood, D. J. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. *Annu. Rev. Phytopathol* 40:221-249.
- Dao D.F. 1972. Influencia de diferentes cultivos en las poblaciones de nematodos. *Nematologica* 2:30-32
- Daulton, A.C; Curtis, R.F. 1963. The effects of *Tagetes* spp. on *Meloidogyne javanica* in Southern Rhodesia. *Nematologica* 9:375-362.
- De Waele, D; Stoffelen, R; Kestemont, J. 2006. Efectos de las especies de plantas asociadas sobre los nematodos del banano. *InfoMusa* 15(1-2): 2-6.
- Dochez, C; Speijer, P.R; Hartman, J; Vuylsteke, D ; De Waele, D. 2000. Screening *Musa* hybrids for resistance to *Radopholus similis*. *InfoMusa* 9(2):3-4.
- Escobar Vélez, J.H; Castaño Zapata, J. 2005. Manejo de las enfermedades causadas por *Mycosphaerella* pp. Mediante la aplicación de ácidos fúlvicos. *InfoMusa* 4(2):15-17.
- Giraldo, G.A; Carvajal, L.L; Sánchez, M.L; Arcila, M.I. 2000. Diseño de un producto alimenticio para humanos (hojuelas) a partir del raquis de plátano Dominic Hartón (*Musa* AAB Simmonds). In Cayón, D.G; Giraldo, G; Arcila, N.I. (Eds.) Postcosecha y Agroindustria del Plátano en el Eje Cafetero de Colombia. Armenia, Quindío. Fudesco. p. 217-222.
- González Rodríguez, JB; Fernández Gonzalves, E. 2003. Manejo alternativo de nematodos en musáceas. In Rivas, G; Rosales, F. Eds. Taller Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas. Guayaquil, Ecuador (11-13 de agosto 2003). INIBAP. MUSALAC. Montpellier, FR. p. 119-120.
- Haugland, E; Brandsaeter, L. O. 1996: Experiments on bioassay sensitivity in the study of allelopathy. *Journal of Chemical Ecology* 22: 1845–1859.
- Insunza, V; Aballay, E; Macaya, J. 2001. *In vitro* nematicidal activity of aqueous plant extracts on Chilean populations of *Xiphinema americanum sensu lato*. *Nematologica* 31:47-54.

- Kil, J.H; Shim, K.C; Lee, K.J. 2002. Allelopathy of *Tagetes minuta* L. aqueous extracts on seed germination and root hair growth. Korean J. Ecol. Sci. 1(3): 171-174.
- Larco Reyes, E. 2004a. Desarrollo y evaluación de lixiviados de compost y lombricompost para el manejo de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), en plátano. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 77 p.
- Larco Reyes, E. 2004b. Desarrollo y evaluación de lixiviados de compost y lombricompost para el manejo de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet), en plátano. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 77 p.
- Larco, E; Riveros, A.S; Rosales, F; Pocasangre, L; Rivas, G; Polanco, D. 2004. Lixiviados de compost y lombricompost, una alternativa para el control biológico de la Sigatoka negra en plátano. In Memorias Congreso Latinoamericano de Bioplaguicidas y Agricultura Orgánica. 18 al 20 de Octubre 2004, San José, Costa Rica. Disco compacto, 8 mm.
- Lee, S. Y; Shim, K. C; Kil, J. H. 2002. Phytotoxic effect of aqueous extracts and essential oils from southern marigold (*Tagetes minuta*). New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 30(3):161-169.
- Machado, S. 2007. Allelopathic potential of various plant species on Downy Brome: Implications for weed control in wheat production. Agronomy Journal. 99:127-132.
- Meneses Hernández, A. 2003. Utilización de hongos endofíticos provenientes de banano orgánico para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus* (Cobb) Thorne. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 67 p.
- Morralo, R.B. 1987. Botanical pest control research in the Philippines. Philippine Entomologist 7:1-30.
- Muñoz, R. E; Madriñán Molina, R. 2005. Efecto de lixiviados del raquis de plátano sobre la actividad y biomasa microbiana en floración y cosecha del tomate (en línea). Acta Agronómica 54(1). Consultado 01 nov de 2009. Disponible en http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/viewFile/104/228
- Mya, M.M; Singh, A; Sharma, S; Vasudevan, P; Saxena, R.K. 2002. Biological Control of mosquitoes. International Pest Control 44(2):90-94.
- Natarajan, N; Cork, A; Boomathi, N; Pandi, R; Velavan, S; Dhakshnamoorthy, G. 2006. Cold aqueous extracts of African marigold, *Tagetes erecta* for control tomato root knot nematode, *Meloidogyne incognita*. Crop Protection 25:1210-1213.
- Núñez Pérez, C.T. 2006. Estudio de poblaciones de bacterias endofíticas de la rizosfera del banano para el biocontrol del nematodo barrenador *Radopholus similis*. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 62 p.
- O'Bannon, J.H; Taylor, A.L. 1968. Migratory endoparasitic nematodes reared on carrot discs. Phytopathology 58:385.
- Ocampo Sánchez, R. A; Martínez, J. V; Cáceres, A. 2007. Manual de Agrotecnología de plantas medicinales nativas. Ediciones Sanabria, CR. 144p.
- Olabiyi, T. I. 2008. Pathogenicity study and nematotoxic properties of some plant extracts on the root-knot nematode pest of tomato, *Lycopersicon esculentum* (L.) Mill. Plant Pathology Journal 7(1):45-49.

- Pocasangre, L. 2000. Biological enhancement of banana tissue culture plantlets with endophytic fungi for the control of the burrowing nematode *Radopholus similis* and the Panama disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*). Tesis Ph.D. Universidad de Bonn. 95 p.
- Prada Jaco, R. Y. 1996. Evaluación de extractos botánicos contra el nematodo *Meloidogyne incognita* en frijol (*Phaseolus vulgaris*). In 42 Reunión anual del PCCMCA (18-22 marzo de 1996), San Salvador. 17 p.
- Russo, R; Lugo, J; Arreola, O; Arango, O. 1995. Efecto de un bioestimulante húmico extraído del raquis de banano (Pinzote) sobre el crecimiento de plántulas de banano (*Musa* AAA subgrupo "Cavendish" clon 'Gran enano). Agronomía Mesoamericana no.6:130-133.
- Sarah, J.L. 1998. Las prácticas culturales como medio de control de nematodos en el banano. In Rosales F.E; Tripson, S.C; Cerna, J. Eds. Producción de banano orgánico y/o ambientalmente amigable. Memorias del taller internacional realizado en la EARTH, Guácimo, CR (27-29 de Julio de 1998). INIBAP. Montpellier, FR. p. 138- 151.
- Sikora, R.A; zun Felde, A; Mendoza, A; Cabrera, J.A; Kurtz, A; Shouten, A; Pocasangre, L. 2007. The burrowing nematode of banana: strategies for controlling the uncontrollable (Session 2: Soil health). In Recent advances in banana crop protection for sustainable production and improved livelihoods (Programme and abstracts). Greenway Woods Resort, White River, South Africa (September 10-14, 2007). ISHS/ProMusa. p. 16.
- Speijer, P. R; De Waele, D. 1997. Screening of *Musa* germplasm for resistance and tolerance to nematodes. INIBAP Technical Guidelines 1. IPGRI, Rome, Italy; INIBAP, Montpellier, France. 47 p.
- Topp, E; Millar, S; Bork, H; Welsh, M. 1998. Effects of marigold (*Tagetes* sp.) roots on soil microorganisms. *Biology and Fertility of Soils* 27: 149-154.
- Vasudevan, P; Kashyap, S; Sharma, S. 1997. *Tagetes*: A multipurpose plant. *Bioscience Technology* 62(1):29-35.
- Walia, K. K; Gupta, D. C. 1997. Management of root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* on vegetable crops with *Tagetes* sp. *Indian Journal of Nematology* 27(1):18-23.
- Winoto Sutamadji, R. 1969. Studies on the effect of *Tagetes* species on plant parasitic nematodes (Summary and conclusion). Thesis Ph.D. Wageningen University, Netherlands. 132p.
- Zygodlo, J.A; Guzman, C.A; Grosso, N.R. 1994. Antifungal properties of the leaf oils of *Tagetes minuta* L. and *T. filifolia* Lag. *Journal of Essential Oil Research* 6: 617-621.

4 ARTÍCULO II.

Biocontrol del nematodo barrenador *Radopholus similis* mediante extractos acuosos de *Tagetes* spp. y raquis de banano combinados con microorganismos endofíticos

4.1 Introducción

Una de las limitaciones en la producción de banano después de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) es sin duda el manejo de los nematodos fitoparásitos causantes de un sinnúmero de daños al sistema radical (Araya 2003 y Gowen et ál. 2005). Varias son las especies reportadas que atacan a los bananos, pero se considera que *Radopholus similis* es el principal problema en plantaciones comerciales especialmente del subgrupo Cavendish (O'Bannon 1977, Sarah 1989, Sarah et ál. 1996). Plantaciones comerciales en América Latina basan su control en el uso de dos a cuatro aplicaciones de nematicidas granulados carbamatos y organofosforados para mantener la producción y reducir el daño causado por los nematodos (Marín 2005, Sikora et ál. 2007). Ciclos múltiples de nematicidas han conducido a la pérdida de microflora y microfauna del suelo, además de incrementar su biodegradación convirtiendo las moléculas en metabolitos no tóxicos (Araya 2000, Moens et ál. 2003). Para disminuir este efecto, Sikora et ál. (2005) mencionan que la disminución o el escalonamiento de los nematicidas es una alternativa viable, tanto por razones económicas como ambientales, sobre todo para cultivos perennes; por tal razón se necesitan nuevas metodologías alternativas, sean estas biológicas o basadas en la naturaleza química de las plantas (Sikora y Pocasangre 2004).

Alternativas biológicas para el control de *R. similis* han sido muy estudiadas en las últimas dos décadas en la región Latinoamericana. Resultados prometedores se han obtenido usando hongos y bacterias endofíticas provenientes de plantaciones orgánicas o de bajo uso de nematicidas, los cuales han presentado un alta actividad antagónica (Pocasangre 2000, zum Felde 2002). Hongos endofíticos han demostrado reducir las poblaciones de *R. similis* entre un 80 a 90%, mientras que bacterias lo han hecho entre un 70 a 80% (Meneses 2003, Pocasangre et ál. 2004, Núñez 2006). Por su parte Chávez (2007) demostró que puede existir un efecto aditivo en los mecanismos de acción de los agentes biológicos, con porcentajes de biocontrol de hasta un 93%.

Varias plantas que tiene en su interior metabolitos secundarios que son secretados como defensa al ataque de un patógeno externo. Dentro de los compuestos fitoquímicos más relevantes para el control de nematodos Chitwood (1992) menciona a los alcaloides, acetilenos, ácidos carboxílicos, compuestos fenólicos y terpenoides. Plantas del género *Tagetes* (Asterácea) tienen un amplio reconocimiento por sus propiedades fungicidas, insecticidas y sobre todo las nematocidas, debido a la presencia de compuestos tiofenólicos en sus tejidos (Chang et ál. 1975, Morallo 1987, Montes y García 1997). El raquis de banano es un subproducto que se obtiene como consecuencia del ciclo vegetativo de la planta al momento de la cosecha. Entre los múltiples que se han encontrado es la fabricación de papel (Alfaro 2004), la transformación a sustrato para hongos comestibles (Motato et ál. 2006) y la obtención de lixiviados por medio del compostaje (Larco 2004a). Esta última ha sido una de las más estudiadas hasta el momento, donde se reporta su uso en el control de enfermedades como *Mycosphaerella fijiensis*, *Ralstonia solanacearum*, (CIAT 2004, Larco 2004b, Ortiz y Jiménez 2009).

Múltiples estudios demuestran el efecto biocontrolador de los microorganismos endofíticos sobre el nematodo *Radopholus similis*, actuando de forma individual o combinada; por otra parte los estudios realizados utilizando extractos botánicos a base de *Tagetes* spp. para el control de *Radopholus similis* son escasos, aunque su efectividad en otras especies de nematodos está comprobada; para el caso del raquis no existen reportes de uso de extractos o lixiviados para controlar nematodos, por tales razones este estudio está enfocado a determinar si existe sinergia entre estos componentes. Por consiguiente el objetivo de esta investigación fue determinar el efecto de extractos de raquis de banano y *Tagetes* spp. enriquecidos con cuatro hongos y cuatro bacterias endofíticas sobre el control de *Radopholus similis* tanto en invernadero como en laboratorio; adicionalmente se evaluó por separado el efecto de extractos de órganos de *Tagetes* spp. sobre el control de *R. similis* en condiciones *in vitro* e *in vivo*.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1 *Material experimental*

En este estudio se realizaron cuatro ensayos (dos *in vitro* y dos *in vivo*), utilizando para el ensayo *in vivo* vitroplantas de banano (*Musa* AAA) del cultivar “Gran Enano” provenientes de un laboratorio comercial de cultivo de tejidos. Para dos ensayos (*in vitro* e *in vivo*) se utilizaron los extractos de *Tagetes* spp. y raquis de banano solos y combinados con microorganismo endofíticos (hongos y bacterias) purificados en el laboratorio de nematología del CATIE. Para los otros dos ensayos se evaluaron extractos de raíz, tallo, hojas y flores de *Tagetes* spp. de forma *in vitro* como *in vivo*.

Los microorganismos endofíticos que se utilizaron para este experimento son cuatro cepas de bacterias y cuatro cepas de hongos endofíticos que son parte de las colecciones que posee el laboratorio de nematología del CATIE; estas fueron seleccionadas porque han demostrado excelentes resultados como microorganismos de biocontrol para el nematodo barrenador *R. similis*, siendo estos evaluados de una forma individual (hongo y bacteria por separado) como combinada (interacción hongo-bacteria) obteniendo excelentes resultados hasta el momento (Chávez 2007).

Los microorganismos endofíticos evaluados fueron cuatro cepas de bacterias, dos del género *Bacillus* spp. (B21 y B31) y dos del género *Pseudomonas* spp. (P52 y P58), aisladas por Núñez (2006) provenientes de fincas comerciales de la Zona Atlántica de Costa Rica. Además se utilizaron cuatro cepas de hongos endofíticos, dos del género no patogénico de *Fusarium oxysporum* (E3 y E4), recolectadas en Costa Rica y dos cepas de *Trichoderma atroviride* (E1 y E2), provenientes de Guatemala y Costa Rica (zum Felde 2002, Cañizares 2003). Se evaluó un total de ocho extractos solos (sin microorganismos), veinticuatro combinaciones, un testigo absoluto, un testigo referencial y un testigo químico.

4.2.2 Preparación de suspensiones de microorganismos endofíticos

La preparación de suspensiones de esporas para hongos endofíticos se realizó de la forma que lo describe Meneses (2003); esta consiste en utilizar cultivos de 15 a 20 días de crecimiento en medio PDA al 100%, agregándole 20 ml de agua destilada al plato para con un movimiento de rayado en forma circular con una espátula de bordes redondeados se logre remover el micelio del hongo, posterior a esto se filtró la solución con una malla fina decantándola en un *beaker* de 100 ml, luego se añade 80 ml de agua destilada para llegar a un volumen de 100 ml de solución madre. A las soluciones resultantes de este proceso se les realizó un conteo para medir la concentración de esporas mediante el hematocímetro de Neubauer, para luego ajustar la solución a una concentración de 1×10^6 esporas ml^{-1} .

Para las suspensiones de bacterias se realizó utilizando un procedimiento similar al descrito en el párrafo anteriormente, solo que para este caso se utilizaron cultivos de 3 a 5 días de establecidos en medio AN al 100%. Una vez obtenida las soluciones madre se procedió a realizar un conteo en el hematocímetro de Neubauer, para luego se ajustar la solución a una concentración de 1×10^6 esporas ml^{-1} .



Figura 8. Protocolo de preparación de suspensiones de microorganismos.

4.2.3 Metodología para obtención de extractos acuosos licuados

Los extractos acuosos frescos de *Tagetes* spp. y raquis de banano se realizaron mediante una metodología nueva y no descrita en la literatura. El material vegetal fue triturado utilizando una licuadora de dos velocidades, promoviendo de esta manera la liberación de metabolitos secundarios que se encuentran en el interior de las células.

El método consistió en triturar de forma total el material vegetal utilizando una licuadora de dos velocidades, colocando dos partes de una solución preparada de

microorganismos (hongos, bacterias y hongo-bacteria) y una parte de material vegetal picado, obteniendo un extracto proporción 2:1. Hecho esto se procedió a licuar durante 30 segundos a diferentes velocidades, primero 10 segundos en velocidad “1”, luego 10 segundos en velocidad “2” y nuevamente 10 segundos en velocidad “1”, esto para asegurar que el material este totalmente triturado; terminado el proceso el contenido fue depositado en un colador y se procedió a exprimir el residuo de forma manual para extraer la mayor cantidad de extracto posible. Finalmente los extractos obtenidos fueron almacenados en contenedores herméticos a 4°C.

4.2.3.1 Elaboración de extractos acuosos licuados combinados con microorganismos

La preparación de extractos acuosos licuados frescos con microorganismos de *Tagetes* spp. consistió en tomar toda la planta (hojas, tallos, flores, excepto raíz) y picarla finamente hasta obtener pequeños fragmentos para luego realizar una mezcla homogénea; por su parte el raquis de banano fue picado hasta obtener segmentos de aproximadamente 1 a 1,5 cm². Luego se realizaron ocho soluciones madre para lo cual se tomo por separado un volumen de 200 ml (70 g *Tagetes* spp. y 140 g raquis aproximadamente) de cada material para ser depositado en la licuadora, se colocó 400 ml de agua de la llave para las soluciones puras (sin microorganismos) y 400 ml de las soluciones preparadas de microorganismos (inciso 3.5.2), para la solución de hongos se colocó 200 ml de *Fusarium oxysporum* y 200 ml de *Trichoderma atroviride*, la de bacterias 200 ml de *Bacillus* spp. y 200 ml de *Pseudomonas* spp. y la combinada (hongo- bacteria) 100 ml de *Fusarium oxysporum*, 100 ml de *Trichoderma atroviride*, 100 ml de *Bacillus* spp. y 100 ml de *Pseudomonas* spp., logrando así la proporción 2:1. Al finalizar el proceso se obtuvo cuatro contenedores con 400 ml de extractos acuosos de *Tagetes* spp. (uno solo y tres con microorganismos) y cuatro contenedores con 600 ml de extracto acuoso de raquis de banano (uno solo y tres con microorganismos), cada extracto fue almacenado en contenedores de 1000 ml a una temperatura de 4 °C para ser utilizados al siguiente día.



Figura 9. Protocolo de elaboración de extractos acuosos de *Tagetes spp.* y raquis enriquecidos con microorganismos.

Las concentraciones utilizadas de los extractos fueron 10, 15, 20 y 25% para realizar cada uno de los tratamientos (Cuadro 6); estas se realizaron en contenedores herméticos individuales de 200 ml, donde se tomo de forma individual la cantidad de 20, 30, 40 y 50 ml de cada solución madre (extracto puro) de *Tagetes spp.* y raquis de banano, para posteriormente llevarlas a un aforo de 200 ml añadiendo agua de la llave.

4.2.3.2 Elaboración de extractos acuosos licuados con órganos de *Tagetes spp.*

En la elaboración de los extracto acuosos licuados de los órganos de la planta de *Tagetes spp.* se utilizó la metodología descrita el numeral 3.5.3. Para esto se tomo la raíz, hojas, tallo y flores de la planta de *Tagetes spp.* que fueron finamente picadas por separado. Se tomo un volumen de 60 ml (24 g de raíz, 22 g de hojas, 24 g de flor, 25 g de tallos) de cada parte de la planta siendo colocado en la licuadora, luego se añadió la cantidad de 120 ml de agua de la llave, para lograr la proporción 2:1. Finalmente se obtuvo la cantidad de 120 ml de cada uno de los extractos de partes de *Tagetes spp.*, siendo colectados y almacenados en contenedores herméticos de 200 ml a una temperatura de 4°C.



Figura 10. Protocolo de elaboración de extractos acuosos de hojas, raíz, tallo y flores de *Tagetes spp.*

Cuadro 6. Descripción de los tratamientos de extractos de *Tagetes* spp. y raquis de banano enriquecidos con microorganismos endofíticos evaluados *in vitro* e *in vivo*

Código	Tratamientos
T10	<i>Tagetes</i> spp. 10%
T15	<i>Tagetes</i> spp. 15%
T20	<i>Tagetes</i> spp. 20%
T25	<i>Tagetes</i> spp. 25%
TH10	<i>Tagetes</i> spp. 10% + <i>Fusarium oxysporum</i> (E3yE4) + <i>Trichoderma atroviride</i> (E1+E2)
TH15	<i>Tagetes</i> spp. 15% + <i>Fusarium oxysporum</i> (E3yE4) + <i>Trichoderma atroviride</i> (E1+E2)
TH20	<i>Tagetes</i> spp. 20% + <i>Fusarium oxysporum</i> (E3yE4) + <i>Trichoderma atroviride</i> (E1+E2)
TH25	<i>Tagetes</i> spp. 25% + <i>Fusarium oxysporum</i> (E3yE4) + <i>Trichoderma atroviride</i> (E1+E2)
TB10	<i>Tagetes</i> spp. 10% + <i>Bacillus</i> spp.(B21 y B31) + <i>Pseudomonas</i> spp. (P52 y P58)
TB15	<i>Tagetes</i> spp. 15% + <i>Bacillus</i> spp.(B21 y B31) + <i>Pseudomonas</i> spp. (P52 y P58)
TB20	<i>Tagetes</i> spp. 20% + <i>Bacillus</i> spp.(B21 y B31) + <i>Pseudomonas</i> spp. (P52 y P58)
TB25	<i>Tagetes</i> spp. 25% + <i>Bacillus</i> spp.(B21 y B31) + <i>Pseudomonas</i> spp. (P52 y P58)
THB10	<i>Tagetes</i> spp. 10% + <i>Bacillus</i> spp.(B21 y B31) + <i>Pseudomonas</i> spp. (P52 y P58) + <i>Fusarium oxysporum</i> (E3yE4) + <i>Trichoderma atroviride</i> (E1+E2)
THB15	<i>Tagetes</i> spp. 15% + <i>Bacillus</i> spp.(B21 y B31) + <i>Pseudomonas</i> spp. (P52 y P58) + <i>Fusarium oxysporum</i> (E3yE4) + <i>Trichoderma atroviride</i> (E1+E2)
THB20	<i>Tagetes</i> spp. 20% + <i>Bacillus</i> spp.(B21 y B31) + <i>Pseudomonas</i> spp. (P52 y P58) + <i>Fusarium oxysporum</i> (E3yE4) + <i>Trichoderma atroviride</i> (E1+E2)
THB25	<i>Tagetes</i> spp. 25% + <i>Bacillus</i> spp.(B21 y B31) + <i>Pseudomonas</i> spp. (P52 y P58) + <i>Fusarium oxysporum</i> (E3yE4) + <i>Trichoderma atroviride</i> (E1+E2)
R10	Raquis 10%
R15	Raquis 15%
R20	Raquis 20%
R25	Raquis 25%
RH10	Raquis 10% + <i>Fusarium oxysporum</i> (E3yE4) + <i>Trichoderma atroviride</i> (E1+E2)
RH15	Raquis 15% + <i>Fusarium oxysporum</i> (E3yE4) + <i>Trichoderma atroviride</i> (E1+E2)
RH20	Raquis 20% + <i>Fusarium oxysporum</i> (E3yE4) + <i>Trichoderma atroviride</i> (E1+E2)
RH25	Raquis 25% + <i>Fusarium oxysporum</i> (E3yE4) + <i>Trichoderma atroviride</i> (E1+E2)
RB10	Raquis 10% + <i>Bacillus</i> spp.(B21 y B31) + <i>Pseudomonas</i> spp. (P52 y P58)
RB15	Raquis 15% + <i>Bacillus</i> spp.(B21 y B31) + <i>Pseudomonas</i> spp. (P52 y P58)
RB20	Raquis 20% + <i>Bacillus</i> spp.(B21 y B31) + <i>Pseudomonas</i> spp. (P52 y P58)
RB25	Raquis 25% + <i>Bacillus</i> spp.(B21 y B31) + <i>Pseudomonas</i> spp. (P52 y P58)
RHB10	Raquis 10% + <i>Bacillus</i> spp.(B21 y B31) + <i>Pseudomonas</i> spp. (P52 y P58) + <i>Fusarium oxysporum</i> (E3yE4) + <i>Trichoderma atroviride</i> (E1+E2)
RHB15	Raquis 15% + <i>Bacillus</i> spp.(B21 y B31) + <i>Pseudomonas</i> spp. (P52 y P58) + <i>Fusarium oxysporum</i> (E3yE4) + <i>Trichoderma atroviride</i> (E1+E2)
RHB20	Raquis 20% + <i>Bacillus</i> spp.(B21 y B31) + <i>Pseudomonas</i> spp. (P52 y P58) + <i>Fusarium oxysporum</i> (E3yE4) + <i>Trichoderma atroviride</i> (E1+E2)
RHB25	Raquis 25% + <i>Bacillus</i> spp.(B21 y B31) + <i>Pseudomonas</i> spp. (P52 y P58) + <i>Fusarium oxysporum</i> (E3yE4) + <i>Trichoderma atroviride</i> (E1+E2)
TA	Testigo absoluto (Sin hongos, bacterias o <i>R. similis</i>)
TQ	Testigo químico (Con <i>R. similis</i> y Terbufos 10GR)
TN	Testigo nematodos

Las concentraciones utilizadas de los extractos de partes de la planta fueron 10, 15, 20 y 25% para realizar cada uno de los tratamientos (Cuadro 7); estas se realizaron para el ensayo *in vitro* en viales de vidrio de 40 ml de capacidad, donde se tomo 4, 6,8 y 10 ml de cada solución pura y para el bioensayo de penetración en contenedores herméticos individuales de 200 ml, donde se tomo 20, 30, 40 y 50 ml de cada solución pura; posteriormente se llevaron a aforos de 40 ml y 200 ml añadiendo agua potable respectivamente.

Cuadro 7. Descripción de los tratamientos de extractos de órganos de Tagetes spp. evaluados en condiciones in vitro e in vivo

Código	Tratamientos
H10	Hojas 10%
H15	Hojas 15%
H20	Hojas 20%
H25	Hojas 25%
T10	Tallo 10%
T15	Tallo 15%
T20	Tallo 20%
T25	Tallo 25%
F10	Flor 10%
F15	Flor 15%
F20	Flor 20%
F25	Flor 25%
R10	Raíz 10%
R15	Raíz 15%
R20	Raíz 20%
R25	Raíz 25%
TA	Testigo absoluto (Sin <i>R. similis</i>)
TQ	Testigo químico (Con <i>R. similis</i> y <i>Terbufos 10GR</i>)
TR	Testigo referencial (Con <i>R. similis</i>)

4.2.4 Ensayo in vitro de extractos de Tagetes spp. y raquis de banano enriquecidos con microorganismos sobre el biocontrol de R. similis

En este ensayo se evaluó el efecto *in vitro* en el tiempo de los extractos acuosos licuados solos y combinados con microorganismos endofíticos que se obtuvieron a partir de la metodología del inciso 3.5.3.1. Los nematodos utilizados para el ensayo fueron recolectados siguiendo la metodología descrita por Pocasangre (2000), Meneses (2003) y Núñez (2006), a

partir del cultivo monoxénico de *R. similis* en discos de zanahoria; la concentración a la cual se ajustó la suspensión de nematodos fue de 125 nematodos en 1 ml de suspensión.

Se colocó en platos de Petri pequeños la cantidad de 1 ml de la suspensión de nematodos (125 nematodos), añadiéndose la cantidad de 3,5 ml de solución de cada tratamiento (Cuadro 6); la evaluación se realizó mediante el conteo individual de cada plato con ayuda de un microscopio, contando únicamente los nematodos que presentaban movilidad, teniendo rangos de tiempo que fueron de 8, 16 y 24 horas luego de haberse aplicado los tratamientos. Los extractos fueron comparados con un testigo absoluto y un testigo químico.



Figura 11. Metodología utilizada en el ensayo in vitro de extractos acuosos de Tagetes spp. y raquis enriquecidos con microorganismos endofíticos para el control de R. similis.

4.2.5 Ensayo de biocontrol de Radopholus similis en vitroplantas protegidas con extractos acuosos de Tagetes spp. y raquis de banano enriquecidos con microorganismos endofíticos

Se utilizaron plantas de seis semanas de endurecimiento colectivo en invernadero para evaluar el efecto de extractos acuosos enriquecidos con microorganismos endofíticos en el biocontrol de *Radopholus similis*, siendo comparados con un testigo absoluto, un testigo referencial y un testigo químico (Cuadro 6).

Las vitroplantas fueron sembradas en sustrato estéril en contenedores plásticos de 16 onzas de capacidad. La protección del material se realizó mediante la metodología descrita en el inciso 3.2.4.1. Dos semanas después de la protección, se inoculó los nematodos siguiendo la metodología descrita en el numeral 3.2.5.2. Luego las plantas fueron distribuidas al azar en el invernadero donde permanecieron por un lapso de seis semanas. Durante este tiempo se

realizaron dos re-inoculaciones distribuidas de la siguiente forma: a) 8 días antes de la inoculación con *R. similis* y b) 15 días después de la inoculación con *R. similis*.

Finalizadas las seis semanas se procedió a la extracción de los nematodos utilizando el método descrito en el inciso 3.2.5.3. El porcentaje de biocontrol de los extractos acuosos enriquecidos con microorganismos sobre *R. similis* se determinó mediante la comparación de la población final del nematodo en el sistema radical de las plantas que recibieron protección con respecto a la cantidad final de *R. similis* presente en las plantas del testigo referencial.

4.2.6 Ensayo *in vitro* de extractos de hojas, raíz, tallo y flores de *Tagetes* spp.

En el ensayo se evaluó el efecto *in vitro* en el tiempo de extractos acuosos licuados de hojas, raíz, tallo y flores de *Tagetes* spp. que se adquirieron a partir de la metodología descrita en el numeral 3.5.3.2. Los nematodos utilizados para el ensayo fueron recolectados siguiendo la metodología descrita por Pocasangre (2000), Meneses (2003) y Núñez (2006), a partir del cultivo monoxénico de *R. similis* en discos de zanahoria; la concentración a la cual se ajustó la suspensión de nematodos fue de 105 nematodos en 1 ml de suspensión.

Se colocó en platos de Petri pequeños la cantidad de 1 ml de la suspensión de nematodos (105 nematodos), añadiéndose la cantidad de 3,5 ml de solución de cada tratamiento (Cuadro 7); la evaluación se realizó mediante el conteo individual de cada plato con ayuda de un microscopio, contando únicamente los nematodos que presentaban movilidad, teniendo rangos de tiempo que fueron de 8, 16 y 24 horas luego de aplicado los tratamientos. Los extractos fueron comparados con un testigo absoluto y un testigo químico.



Figura 12. Metodología utilizada en el ensayo in vitro de extractos acuosos de hojas, tallos, raíz y flores de Tagetes spp. para el control de R. similis.

4.2.7 Bioensayo de penetración de Radopholus similis en vitroplantas protegidas con extractos acuosos de hojas, raíz, tallos y flores de Tagetes spp.

Vitroplantas de seis semanas de endurecimiento colectivo en invernadero fueron evaluadas. Los extractos evaluados fueron obtenidos mediante la metodología descrita en el numeral 3.5.3.2 y fueron comparados con un testigo absoluto, un testigo referencial y un testigo químico (Cuadro 7).

Las vitroplantas fueron sembradas en sustrato estéril en contenedores plásticos de 16 onzas de capacidad. La protección del material se realizó mediante la metodología descrita en el inciso 3.2.4.1; realizándose una segunda protección ocho días después. Dos semanas después de la primera protección, se inoculó los nematodos siguiendo la metodología descrita en el numeral 3.2.5.2. Las plantas fueron distribuidas en el invernadero al azar, donde permanecieron durante tres semanas; para este ensayo se establecieron siete repeticiones por tratamiento.

4.3 Diseño experimental para los ensayos *in vitro* e *in vivo*

4.3.1 Ensayos in vitro

El ensayo se condujo en un diseño en bloques completamente aleatorizado con dos factores, tratamientos y horas de evaluación. Se consideró el efecto de las medidas repetidas en el tiempo (horas) modelando la estructura de varianzas y covarianzas según la variable analizada. Para obtener los grados de libertad adecuados para cada uno de los efectos, se consideró un efecto aleatorio de la unidad experimental (UE). El número de nematodos móviles en el tiempo fue analizado bajo el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + \text{Bloq}_i + T_j + H_k + \text{TH}_{ij} + \epsilon_{ij}$$

Donde:

μ = Media general

Bloq_i = Factor de bloqueo (repeticiones)

T_j = Efecto del j-ésimo tratamiento

H_k = Efecto del tiempo de evaluación

TH_{ijk} = Efecto de interacción de tratamientos y tiempo de evaluación

ϵ_{ijk} = Término de error aleatorio independiente y supuestamente distribuido normal con media cero y varianza constante.

4.3.2 *Ensayos in vivo*

Los análisis estadísticos se realizaron mediante la utilización de modelos lineales generales y mixtos para evaluar los bioensayos de toxicidad, penetración y biocontrol. El ensayo se condujo en un diseño completamente aleatorizado con dos factores, tratamientos y semanas de evaluación. Se consideró el efecto de las medidas repetidas en el tiempo (semanas) modelando la estructura de varianzas y covarianzas según la variable analizada. Para obtener los grados de libertad adecuados para cada uno de los efectos, se consideró un efecto aleatorio de la unidad experimental (UE). Las variables altura, diámetro de pseudotallo y número de hojas fueron analizadas bajo el siguiente modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + S_j + TS_{ij} + \epsilon_{ij}$$

Donde:

μ = Media general

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

S_j = Efecto semana

TS_{ij} = Efecto de interacción de tratamientos con semanas

ϵ_{ijk} = Término de error aleatorio independiente y supuestamente distribuido normal con media cero y varianza constante.

Para las variables peso foliar, peso radical, peso total y números de nematodos se realizó un análisis de varianza ANOVA para encontrar diferencias entre los tratamientos al final del ensayo. El modelo matemático para estas variables fue:

$$Y_{ij} = \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

Y_{ij} = Variable a medir

μ = Media general

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

ϵ_{ijk} = Término de error aleatorio independiente y supuestamente distribuido normal con media cero y varianza constante.

Como no se cumplieron los supuestos distribucionales se realizaron transformaciones a raíz o rangos según se dio el caso. Cuando se rechazó la hipótesis nula del ANOVA se usó la prueba de comparación de medias LSD de Fisher trabajando con un nivel de significación de 0,05.

4.4 Resultados

4.4.1 Ensayo *in vitro* de extractos de *Tagetes* spp. y raquis de banano enriquecidos con microorganismos sobre el biocontrol de *R. similis*

Los resultados del ensayo *in vitro* de extractos de *Tagetes* spp. y raquis de banano enriquecidos con hongos y bacterias endofíticas evaluados en el tiempo reflejan que algunos tratamientos interactúan con el tiempo ($p \leq 0,0001$, Figura 13). Sin embargo, el efecto de los factores tiempo y tratamiento fueron importantes ($p \leq 0,0001$ en ambos factores). Los análisis indican que existe un efecto de los tiempos de evaluación, puesto que a medida que pasa el tiempo y el nematodo se encuentra en contacto con el tratamiento la movilidad registrada va decreciendo (Figura 13).

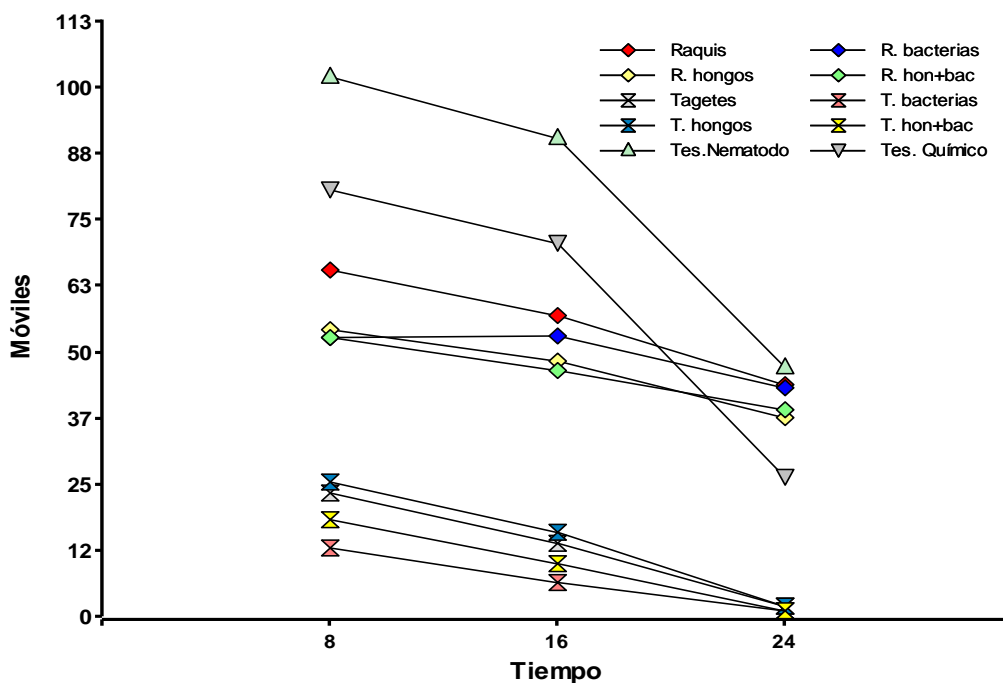


Figura 13. Efecto de los tratamientos en el tiempo sobre la parálisis/inmovilización de *R. similis*.

En la grafica anterior se puede apreciar que existen dos grupos bien definidos, los que ejercieron un efecto directo (tratamientos con *Tagetes* spp.) desde la primera evaluación y los que ejercieron un efecto más conservador (tratamientos con raquis), estos últimos sin llegar a alcanzar en ninguna de las tres evaluaciones el potencial inhibitorio de los extractos con *Tagetes*

spp. También se puede observar que la varianza de los tratamientos basados en *Tagetes* spp. es menor a los de raquis.

A las 8 horas los extractos de *Tagetes* spp. presentaron un poder de biocontrol entre 71 a 89% y los de raquis entre 30 a 57% superando así al control químico (21%). A las 16 horas hubo un aumento en la inmovilidad de los nematodos ya que el poder biocontrolador aumento en los dos grupos de extractos, para este tiempo aun el control químico seguía siendo inferior a los extractos. A las 24 horas se determinó una separación comparativa radical de los extractos de *Tagetes* spp. y raquis de banano, cuyo punto centro fue el TQ; a este tiempo los nematodos móviles encontrados en extractos de *Tagetes* spp. teniendo porcentajes de biocontrol entre 95 y 100%, mientras que los extractos de raquis presentaron porcentajes inferiores al control químico (44%) (Cuadro 8).

4.4.2 Ensayo de biocontrol de Radopholus similis en vitroplantas protegidas con extractos acuosos de Tagetes spp. y raquis de banano enriquecidos con microorganismos endofíticos

Los resultados luego de seis semanas de protegidas las plantas con extractos enriquecidos con microorganismos endofíticos demuestran que existieron diferencias significativas al límite para las variables altura de planta ($p \leq 0,0436$) y diámetro de pseudotallo ($p \leq 0,0318$); mientras que las variables peso radical ($p \leq 0,0001$), foliar ($p \leq 0,0009$) y total ($p \leq 0,0001$) presentaron una alta significancia.

Veintiocho de los tratamientos presentaron una disminución en la población final de *R. similis* en el sistema radical de 68 a 89% en comparación con el testigo nematodos, presentándose diferencias altamente significativas ($p \leq 0,0001$). Diez de los tratamientos presentaron biocontrol superior al testigo químico (77%) con rangos entre 78 y 89%. Mientras que ocho de los tratamientos que presentaron biocontrol entre 73 a 77% tuvieron un efecto estadísticamente similar al control químico (Cuadro 10).

Cuadro 8. Efecto en el tiempo de los extractos de *Tagetes spp.* y raquis de banano solos y enriquecidos con microorganismos sobre el control de *R. similis* en condiciones *in vitro*

Código	Tratamientos	Moviles	Biocontrol	Moviles	Biocontrol	Moviles	Biocontrol
		8 horas	%	16 horas	%	24 horas	%
TB20	<i>Tagetes spp.</i> 20% + Bacterias	11 ^{hi}	89	5 ^{hi}	94	0 ⁱ	100
THB20	<i>Tagetes spp.</i> 20%+ Hongos y Bacterias	18 ^{hi}	83	9 ^{hi}	90	0 ⁱ	100
T15	<i>Tagetes spp.</i> 15%	20 ^{hi}	81	10 ^{hi}	89	0 ^{hi}	99
TB15	<i>Tagetes spp.</i> 15% + Bacterias	12 ^{hi}	89	6 ^{hi}	94	1 ^{hi}	99
THB15	<i>Tagetes spp.</i> 15% + Hongos y Bacterias	18 ^{hi}	83	10 ^{hi}	89	1 ^{hi}	98
TB25	<i>Tagetes spp.</i> 25% + Bacterias	11 ^{hi}	89	7 ^{hi}	93	1 ^{hi}	98
TH15	<i>Tagetes spp.</i> 15% + Hongos	27 ^{hi}	74	17 ^{hi}	82	1 ^{hi}	98
TH20	<i>Tagetes spp.</i> 20% + Hongos	25 ^{hi}	75	15 ^{hi}	84	1 ^{hi}	98
THB25	<i>Tagetes spp.</i> 25% + Hongos y Bacterias	17 ^{hi}	84	11 ^{hi}	88	1 ^{hi}	98
THB10	<i>Tagetes spp.</i> 10% + Hongos y Bacterias	20 ^{hi}	80	9 ^{hi}	90	1 ^{hi}	97
T20	<i>Tagetes spp.</i> 20%	18 ^{hi}	83	12 ^{hi}	87	2 ^{hi}	97
TB10	<i>Tagetes spp.</i> 10% + Bacterias	17 ^{hi}	84	7 ^{hi}	93	2 ^{hi}	97
TH25	<i>Tagetes spp.</i> 25% + Hongos	24 ^{hi}	77	18 ^{hi}	81	2 ^{hi}	96
T10	<i>Tagetes spp.</i> 10%	30 ^{hi}	71	20 ^{hi}	79	2 ^{hi}	95
TH10	<i>Tagetes spp.</i> 10% + Hongos	25 ^{hi}	75	14 ^{hi}	85	2 ^{hi}	95
T25	<i>Tagetes spp.</i> 25%	26 ^{hi}	75	14 ^{hi}	85	3 ^{hi}	95
TQ	Testigo químico	81 ^{bc}	21	71 ^d	22	26 ^{hi}	44
RH10	Raquis 10% + Hongos	55 ^{defgh}	47	45 ^{fgh}	51	30 ^{hi}	37
RHB20	Raquis 20% + Hongos y Bacterias	47 ^{efgh}	54	41 ^{ghi}	55	36 ^{hi}	24
RH15	Raquis 15% + Hongos	53 ^{efgh}	49	50 ^{efgh}	45	37 ^{hi}	22
RB25	Raquis 25% + Bacterias	44 ^{fgh}	57	56 ^{defgh}	38	38 ^{ghi}	19
RHB10	Raquis 10% + Hongos y Bacterias	51 ^{efgh}	51	46 ^{fgh}	50	39 ^{ghi}	18
R15	Raquis 15%	64 ^{def}	38	53 ^{efgh}	42	40 ^{ghi}	16
RH25	Raquis 25% + Hongos	52 ^{efgh}	50	49 ^{efgh}	46	41 ^{ghi}	13
RHB15	Raquis 15% + Hongos y Bacterias	57 ^{defg}	45	52 ^{efgh}	43	41 ^{ghi}	13
RHB25	Raquis 25% + Hongos y Bacterias	57 ^{defgh}	45	47 ^{efgh}	48	41 ^{ghi}	13
R10	Raquis 10%	72 ^{cd}	30	59 ^{defg}	35	42 ^{ghi}	12
RB15	Raquis 15% + Bacterias	53 ^{efgh}	49	52 ^{efgh}	43	42 ^{ghi}	10
RH20	Raquis 20% + Hongos	59 ^{defg}	43	49 ^{efgh}	46	43 ^{gh}	10
RB10	Raquis 10% + Bacterias	54 ^{efgh}	48	51 ^{efgh}	45	45 ^{fgh}	4
RB20	Raquis 20% + Bacterias	60 ^{def}	42	54 ^{efgh}	40	47 ^{fgh}	1
R20	Raquis 20%	65 ^{de}	37	58 ^{defg}	36	47 ^{efgh}	0
R25	Raquis 25%	62 ^{def}	40	59 ^{defg}	36	47 ^{efgh}	0
TN	Testigo nematodos	103 ^a	0	91 ^{ab}	0	47 ^{efgh}	0

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

De los siete tratamientos que presentaron un efecto biocontrolador, cinco tienen extracto de *Tagetes* spp. y únicamente dos de raquis, entre los cuales se diferencian separando el T10, que los microorganismos lograron potencializar los extractos; para el caso de *Tagetes* spp. son los hongos quien logran este efecto y para el raquis las bacterias son las que elevan su potencial. Además las altas concentraciones (20-25%) prevalecen en este pequeño grupo sobre las bajas (15-10%).

La protección de las plantas con extractos enriquecidos con microorganismos endofíticos tuvo un importante efecto en la reducción de la tasa de reproducción del nematodo a excepción del T10, puesto que el número de veces que se reprodujo *R. similis* en su mayoría fue menor a 0,5 lo que indica que no hubo reproducción, esto si comparamos la tasa de reproducción de plantas no protegidas que fue de 1,92.

Se encontraron diferencias entre los tratamientos para el numero de nematodos ($p < 0,0001$) (Cuadro 9). Debido a la estructura factorial incompleta de los tratamientos, se realizaron contrastes ortogonales para probar diferencias entre medias de los testigos versus el resto de los tratamientos, testigos entre si, efecto de los productos, efecto de las concentraciones y su interacción. El contraste de los testigos versus el resto de los tratamientos resulto significativo (0,0439), siendo la media de los tratamientos inferior a la de los testigos. También resulto significativo el contraste de comparación e medias entre los testigos TQ y TN, siendo la media del testigo químico la más baja. Se encontró una interacción significativa entre producto y dosis ($p = 0,0433$) (Figura 14), a pesar de lo cual se encontró un efecto de Producto ($< 0,0001$), pero no así de dosis ($p = 0,4098$).

Cuadro 9. Tabla de análisis de varianza para el estudio de las interacciones en un arreglo factorial incompleto para la variables numero de nematodos

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Trat	349927,17	33	10291,98	4,42	<0,0001
TvsR	9877,35	1	9877,35	4,12	0,0439
QvsN	60066,75	1	60066,75	25,07	<0,0001
Prod	121413,13	7	17344,73	6,93	<0,0001
Porce	7265,95	3	2421,98	0,97	0,4098
Prod*Porce	87043,99	21	4144,95	1,66	0,0433
Error	407253,83	175	2327,16		
Total	757181,00	209			

Los extractos raquis-bacteria (RB25, RB20), *Tagetes* spp.-hongo (TH10, TH20), *Tagetes* spp.-hongo-bacteria (THB25, THB15) y *Tagetes* spp. (T10) presentaron los mejores porcentajes de biocontrol oscilando entre 80 a 89% (Cuadro 10). Los extractos RB25, TH10, TH20 y THB15 son los que poseen los mejores pesos totales significativamente diferentes al TQ y TN. Para la variable peso foliar los extractos RB25 y TH10 presentan las mejores medias diferentes a sus testigos; mientras que para la variable peso radical el extracto RB25 presenta diferencia estadística significativo respecto a sus testigos.

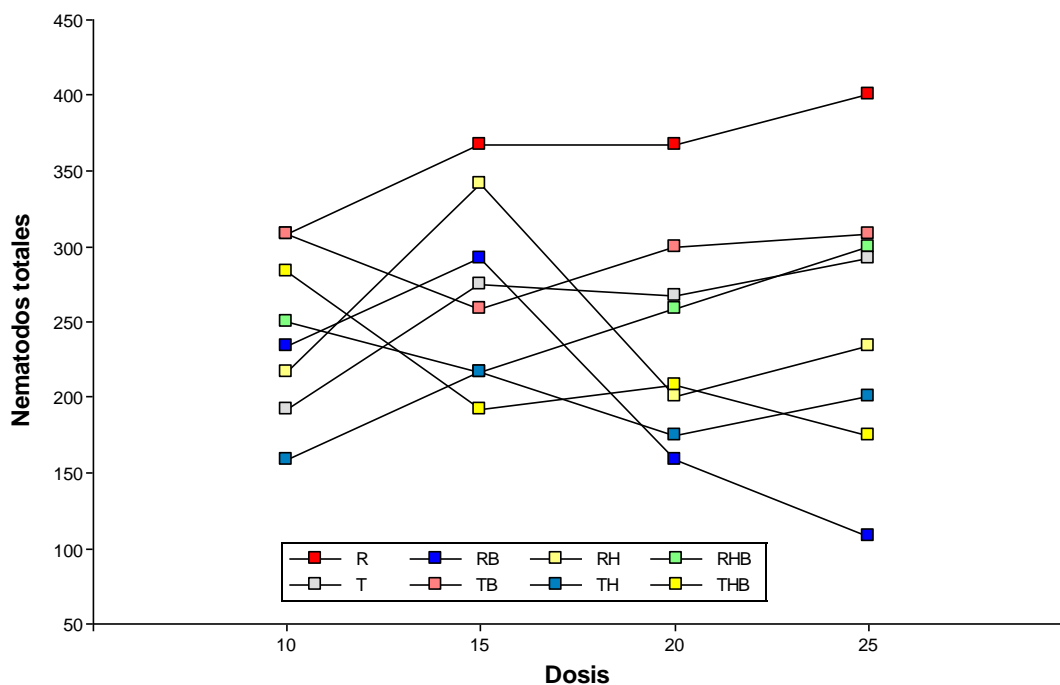


Figura 14. Efecto de los tratamientos de órganos de *Tagetes* spp. en el tiempo sobre la movilidad de *R. similis*.

Cuadro 10. Efecto de los extractos de *Tagetes* spp. y raquis enriquecidos con microorganismos endofíticos sobre el control de *R. similis* en vitroplantas de banano cv. "Gran Enano"

Código	Peso (g)			Nematodos totales	Biocontrol %	Tasa de reproducción
	Raíz	Foliar	Total			
RB25	6,32 ^{abcde}	22,65 ^{ab}	28,97 ^{ab}	108 ^{lm}	89	0,22
RB20	5,85 ^{cdefgh}	18,85 ^{efghij}	24,70 ^{defghij}	158 ^{klm}	83	0,32
TH10	5,32 ^{fghijk}	23,22 ^a	28,53 ^{abc}	158 ^{klm}	83	0,32
TH20	6,27 ^{bcdef}	20,68 ^{abcdefghi}	26,95 ^{abcdef}	175 ^{jkl}	82	0,35
THB25	4,47 ^{jkm}	21,07 ^{abcdef}	25,53 ^{cdefghij}	175 ^{ijkl}	82	0,35
T10	4,98 ^{hijkl}	17,95 ^{ij}	22,93 ^{jk}	192 ^{hijkl}	80	0,38
THB15	5,37 ^{efghijk}	20,90 ^{abcdef}	26,27 ^{bcdefghi}	192 ^{hijkl}	80	0,38
RH20	4,48 ^{jkm}	20,87 ^{abcdefg}	25,35 ^{cdefghij}	200 ^{ghijkl}	79	0,40
TH25	5,48 ^{defghi}	20,20 ^{bcdefghij}	25,68 ^{cdefghij}	200 ^{hijkl}	79	0,40
THB20	5,07 ^{hijkl}	21,62 ^{abcde}	26,68 ^{abcdefg}	208 ^{fghijkl}	78	0,42
RH10	4,60 ^{ikm}	19,98 ^{bcdefghij}	24,58 ^{defghijk}	217 ^{efghijk}	77	0,43
RHB15	5,77 ^{cdefgh}	20,78 ^{abcdefgh}	26,55 ^{abcdefgh}	217 ^{efghijk}	77	0,43
TH15	6,08 ^{bcdefg}	20,57 ^{abcdefghi}	26,65 ^{abcdefgh}	217 ^{efghijk}	77	0,43
TQ	5,00^{hijkl}	20,03^{bcdefghij}	25,03^{defghij}	217^{efghijk}	77	0,43
RB10	6,38 ^{abcd}	19,82 ^{cdefghij}	26,20 ^{bcdefghi}	233 ^{defghijk}	76	0,47
RH25	6,13 ^{bcdefg}	21,33 ^{abcdef}	27,47 ^{abcde}	233 ^{defghijk}	76	0,47
RHB10	6,90 ^{ab}	21,43 ^{abcde}	28,33 ^{abc}	250 ^{cdefghijk}	74	0,50
RHB20	7,23 ^a	22,30 ^{abc}	29,53 ^a	258 ^{bcdefghi}	73	0,52
TB15	5,08 ^{hijk}	21,28 ^{abcdef}	26,37 ^{abcdefghi}	258 ^{cdefghijk}	73	0,52
T20	4,98 ^{hijkl}	18,60 ^{fghij}	23,58 ^{ghijk}	267 ^{bcdefghij}	72	0,53
T15	4,90 ^{hijkl}	18,08 ^{ghij}	22,98 ^{jk}	275 ^{bcdefgh}	71	0,55
THB10	5,10 ^{hijk}	20,75 ^{abcdefgh}	25,85 ^{bcdefghij}	283 ^{bcdefghij}	70	0,57
RB15	6,22 ^{bcdef}	21,53 ^{abcde}	27,75 ^{abcd}	292 ^{bcdefg}	70	0,58
T25	5,20 ^{ghijk}	18,03 ^{hij}	23,23 ^{ijk}	292 ^{bcdefgh}	70	0,58
RHB25	6,50 ^{abc}	21,95 ^{abcd}	28,45 ^{abc}	300 ^{bcdef}	69	0,60
TB20	5,52 ^{defghi}	21,92 ^{abcd}	27,43 ^{abcde}	300 ^{bcdefgh}	69	0,60
R10	3,87 ^m	17,57 ^j	21,43 ^k	308 ^{bcde}	68	0,62
TB10	5,48 ^{defghi}	23,03 ^a	28,52 ^{abc}	308 ^{bcdefgh}	68	0,62
TB25	5,20 ^{ghijk}	22,22 ^{abcd}	27,42 ^{abcde}	308 ^{bcdef}	68	0,62
RH15	4,92 ^{hijkl}	21,47 ^{abcde}	26,38 ^{abcdefghi}	342 ^{abc}	64	0,68
R15	3,78 ^m	19,68 ^{cdefghij}	23,47 ^{hijk}	367 ^{abcd}	62	0,73
R20	3,72 ^m	20,73 ^{abcdefghi}	24,45 ^{efghijk}	367 ^{bc}	62	0,73
R25	4,12 ^{lm}	19,43 ^{defghij}	23,55 ^{ghijk}	400 ^{ab}	58	0,80
TN	5,02^{hijkl}	20,78^{abcdefgh}	25,80^{bcdefghij}	958^a	0	1,92

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

4.4.3 Ensayo *in vitro* de extractos de hojas, raíz, tallo y flores de *Tagetes spp.*

Resultados del ensayo *in vitro* de hojas, raíz, tallo y flores de *Tagetes spp.* evaluados en el tiempo demostraron que todos los tratamientos tiene un efecto de biocontrol sobre el nematodo *R. similis* ($p \leq 0,0001$). La interacción entre el tiempo y los tratamientos se vio reflejada en el ensayo, puesto que el efecto de los tratamientos sobre la movilidad de los nematodos fue diferente a través de los tiempos de exposición. En general se observa un efecto del tiempo, *i.e.* a mayor tiempo de los nematodos con los tratamientos, estos presentaron una menor movilidad (Figura 15).

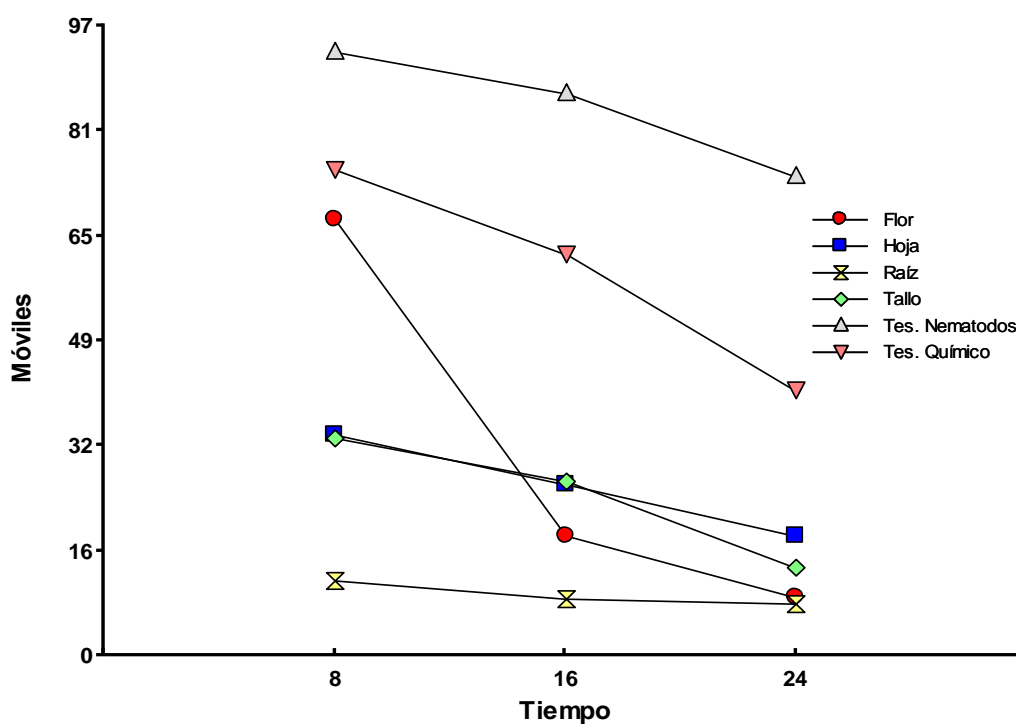


Figura 15. Efecto de los tratamientos de órganos de *Tagetes spp.* en el tiempo sobre la movilidad de *R. similis*.

En la grafica anterior se puede observar que el extracto de flor incrementó su poder nematocida directamente con el tiempo de exposición del nematodo a la solución, esto se vio reflejado al momento de conteos, cuando extractos que a las 8 horas presentaban un menor número de nematodos inmóviles a las 24 horas tenían un aumento significativo, incluso llegando a superar a extractos de hoja y tallo. Además todos los extractos demostraron un comportamiento más efectivo en el tiempo que el tratamiento químico (10 ppm de Terbufos 10GR). Uno de los extractos que presentó un menor número de nematodos móviles desde el

inicio fue el extracto de raíz, ya que como se muestra en la grafica mantiene un efecto constante sobre el nematodo en los tres muestreos y solamente es alcanzado por los extractos de flor a las 24 horas. Los nematodos inmóviles encontrados en los diferentes tiempos en los tratamientos de raíz presentan una forma atípica que no se puede considerar mortalidad a diferencia de los encontrados en tratamientos de flor a las 24 horas que muestran una forma típica de mortalidad (Figura 16).

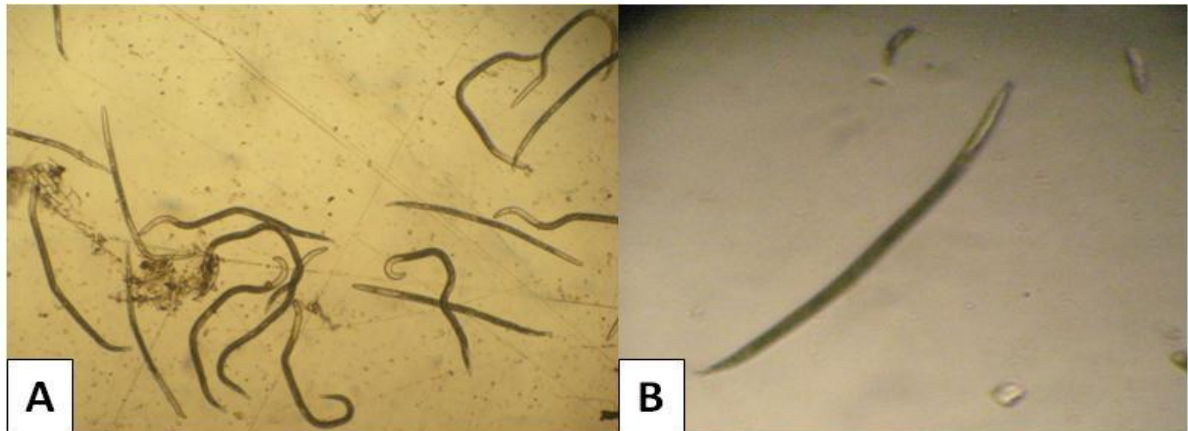


Figura 16. Radopholus similis a las 24 horas de evaluación (A: nematodos con extracto de raíz y B: nematodos con extracto de flor).

En la primera evaluación a las 8 horas los tratamientos presentaron porcentajes de biocontrol que oscilaron entre 24 a 90%, superando al testigo químico que tuvo un control de 19%. Mientras que en la última evaluación a las 24 horas los tratamientos presentaron porcentajes de biocontrol entre 58 a 92% siendo muy superiores a los que se obtuvo con el control químico que fueron de 45% (Cuadro 11).

Cuadro 11. Efecto en el tiempo de los extractos de hojas, tallo, raíz y flor de Tagetes spp. sobre el control de R. similis en condiciones in vitro

Código	Tratamientos	Moviles	Biocontrol	Moviles	Biocontrol	Moviles	Biocontrol
		8 horas	%	16 horas	%	24 horas	%
F25	Flor 25%	65 ^{de}	30	7 ^{mn}	93	6 ⁿ	92
R15	Raíz 15%	10 ^{klmn}	89	7 ^{lmn}	92	6 ⁿ	92
R20	Raíz 20%	10 ^{klmn}	90	7 ^{mn}	92	7 ^{mn}	91
H25	Hojas 25%	9 ^{klmn}	90	11 ^{ijklmn}	87	7 ^{lmn}	90
F20	Flor 20%	69 ^{cde}	26	8 ^{lmn}	91	8 ^{lmn}	90
R25	Raíz 25%	10 ^{klmn}	90	8 ^{lmn}	91	8 ^{lmn}	90
T25	Tallo 25%	26 ⁱ	72	20 ^{ijk}	77	9 ^{lmn}	89
F15	Flor 15%	65 ^{de}	30	15 ^{ijklmn}	83	11 ^{klmn}	86
F10	Flor 10%	71 ^c	24	45 ^{fg}	49	11 ^{ijklmn}	85
R10	Raíz 10%	17 ^{ijkl}	82	13 ^{ijklmn}	85	11 ^{ijklmn}	85
T20	Tallo 20%	21 ^{ijk}	78	16 ^{ijklmn}	81	11 ^{ijklmn}	85
T15	Tallo 15%	21 ^{ij}	77	21 ^{ij}	76	13 ^{ijklmn}	82
H20	Hojas 20%	17 ^{ijkl}	82	19 ^{ijkl}	78	17 ^{ijklm}	78
H15	Hojas 15%	42 ^{fgh}	55	29 ^{hi}	67	20 ^{ijkl}	74
T10	Tallo 10%	66 ^{cde}	30	50 ^f	42	21 ^{ij}	71
H10	Hojas 10%	68 ^{cde}	27	47 ^{fg}	46	31 ^{ghi}	58
TQ	Testigo químico	75 ^c	19	62 ^e	29	41 ^{fgh}	45
TN	Testigo nematodos	93 ^a	0	87 ^b	0	74 ^c	0

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

4.4.4 Bioensayo de penetración de Radopholus similis en vitroplantas protegidas con extractos acuosos de hojas, raíz, tallos y flores de Tagetes spp.

Tres semanas después de protegidas las plantas con extractos de hojas, raíz y flores de *Tagetes* spp. se encontró interacción entre los tratamientos y el tiempo para las variables altura de planta ($p \leq 0,0001$) y diámetro de pseudotallo ($p \leq 0,0001$). En ambas variables se encontró un efecto de tiempo importante ($p \leq 0,0001$), teniendo un patrón de comportamiento ascendente según aumenta las semanas. El efecto de tratamientos en la variable altura de plantas fue significativo a pesar de la presencia de la interacción ($p = 0,0011$) pero para pseudotallo no se encontraron diferencias entre tratamientos ($p = 0,4589$).

Cuando se analizó la última fecha por separado, la variable peso radical no presentó diferencias estadísticas significativas entre tratamientos ($p \leq 0,6410$), contrastando con las variables peso foliar ($p \leq 0,0001$) y peso total ($p \leq 0,0001$) que presentaron un alta significancia (Cuadro 12).

Plantas protegidas con los extractos presentaron rangos de penetración que oscilaron entre 8,57 y 21,43% en comparación con el testigo nematodos que presento un 44,29%. En quince de los tratamientos evaluados, el efecto de los extractos botánicos en la penetración de *R.similis* fue estadísticamente similar al efecto observado con la aplicación de 10 ppm de Terbufos 10GR (11,43%) con porcentajes de penetración entre 8,57 y 20%. Los tratamientos que presentaron una alta reducción en la penetración (entre 70 a 85%) de *R. similis* fueron: T15, F10, H25, T10, T25, TQ, H10 y H15. Cabe resaltar que los extractos de raíz y flor son los que presentan los valores más altos de peso foliar y pero total. En general los resultados demuestran que para penetración no existe diferencia en utilizar extractos a base de tallo, flor, hojas o raíz, ya que no presentaron diferencias estadísticas entre sí.

Cuadro 12. Efecto de los extractos de hojas, tallo, raíz y flor de Tagetes spp. sobre la penetración de R. similis en condiciones de invernadero

Código	Tratamientos	Peso (g)			Nematodos totales	Penetración %	Reducción Penetración %
		Foliar	Raíz	Total			
T15	Tallo 15%	6,93 ^{bcde}	2,21	9,14 ^{bcde}	43 ^c	8,57	81
F10	Flor 10%	7,17 ^{bcde}	2,07	9,24 ^{bcde}	57 ^{bc}	11,43	74
H25	Hojas 25%	6,16 ^{efg}	2,13	8,29 ^{defg}	57 ^{bc}	11,43	74
T10	Tallo 10%	5,41 ^g	1,87	7,29 ^g	57 ^{bc}	11,43	74
T25	Tallo 25%	7,31 ^{abcd}	2,19	9,50 ^{abcde}	57 ^{bc}	11,43	74
TQ	Testigo químico	5,57^{fg}	1,91	7,49^{fg}	57^{bc}	11,43	74
H10	Hojas 10%	6,76 ^{bcde}	2,11	8,87 ^{bcde}	64 ^{bc}	12,86	71
H15	Hojas 15%	6,66 ^{cdef}	2,10	8,76 ^{cdef}	64 ^{bc}	12,86	71
F20	Flor 20%	7,94 ^{ab}	2,23	10,17 ^{ab}	71 ^{bc}	14,29	68
F25	Flor 25%	7,47 ^{abc}	1,86	9,33 ^{abcde}	71 ^{bc}	14,29	68
H20	Hojas 20%	6,17 ^{efg}	2,00	8,17 ^{efg}	71 ^{bc}	14,29	68
R20	Raíz 20%	7,44 ^{abc}	2,11	9,56 ^{abcd}	71 ^{bc}	14,29	68
R25	Raíz 25%	7,56 ^{abc}	2,30	9,86 ^{abc}	71 ^{bc}	14,29	68
R10	Raíz 10%	6,14 ^{efg}	2,03	8,17 ^{efg}	79 ^{bc}	15,71	64
F15	Flor 15%	7,16 ^{bcde}	2,13	9,29 ^{abcde}	86 ^{bc}	17,14	61
T20	Tallo 20%	7,34 ^{abcd}	2,06	9,40 ^{abcde}	100 ^{bc}	20,00	55
R15	Raíz 15%	8,37 ^a	2,24	10,61 ^a	107 ^b	21,43	52
TN	Testigo nematodos	5,57^{fg}	1,80	7,37^g	221^a	44,29	0

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

4.5 Discusión

4.5.1 Bioensayos de extractos de hojas, tallos, raíz y flores de Tagetes spp. sobre el biocontrol de R. similis

En el desarrollo de esta investigación se realizaron dos estudios similares en diferentes escenarios, uno en laboratorio y otro en invernadero, ya que se desea conocer el comportamiento de *Radopholus similis* en ambas condiciones. Múltiples estudios han demostrado que los principios activos o metabolitos secundarios en la planta pueden distribuirse de manera uniforme o des uniforme en los diferentes órganos de la planta (raíz, semilla, hojas, flores) (Ocampo et ál. 2007), la concentración de metabolitos secundarios depende de los aspectos genéticos de la planta y estímulos ambientales (Ciccio 1991).

En el laboratorio se evaluó el efecto de los extractos sobre *Radopholus similis* de acuerdo a la inmovilidad que presentaron los nematodos y no a la mortalidad (Yamashita y Viglierchio 1987, Alpey et ál.1988). Los datos indican que extractos de flor, raíz y hoja de plantas de *Tagetes* spp. son los que presentan los mayores niveles de inmovilidad sobre *R. similis* a las 24 horas de ser evaluados presentando porcentajes de biocontrol superiores al 90%. Insunza et ál. (2001) encontraron que al evaluar el efecto *in vitro* de extractos acuosos de *Tagetes erecta* y *Tagetes patula* a las 24 y 48 horas de aplicados sobre *Xiphinema americanum* sensu lato, estos presentaron actividad nematostática a concentraciones por debajo del 25% y mientras la concentración se elevaba la acción de los extractos era nematicida. Por su parte McKenry (1991) indica que el efecto de los extractos de *Tagetes* spp. en condiciones *in vitro* sobre los nematodos es de parálisis acompañada de una reducción en los niveles de oxígeno disuelto en los viales. Los nematodos en contenedores que tenían extractos de raíz presentaron desde la primera evaluación tener una menor movilidad que el resto que la fue adquiriendo con el pasar de las horas; un efecto similar lo encontró Sasanelli y D'Addabbo (1991) en experimentos *in vitro* donde demostraron que extractos acuosos de *Cineraria marítima*, *Ruta graveolens* y *Tagetes erecta* tiene efectos nocivos sobre *Heterodera schachtii*, donde todos los tratamientos presentaron efectos nematicidas a excepción del extracto de raíz de *T. erecta* que únicamente causo un efecto nematostático.

Los datos indican que el efecto tóxico está relacionado directamente entre el tiempo de exposición y la movilidad debido a que conforme aumentan las horas de exposición se encuentran menor número de vivos; esta tendencia coincide con la reportada por Adegbite y Adesiyani (2005) donde la mortalidad de *Meloidogyne incognita* aumento en 94% de los tratamientos luego de 12, 24 y 48 horas de exposición a extractos acuosos. Hidalgo (2008) también obtuvo estas tendencias sobre mortalidad de *Meloidogyne hapla* al utilizar extractos acuosos de follaje seco de especies arbóreas.

En condiciones de invernadero los extractos de órganos de *Tagetes* spp. tuvieron un comportamiento diferente que al encontrado en la fase *in vitro*, esto discrepa con lo expresado por Hassan (1992) donde sugiere que si se encuentra un producto químico que no es toxico para un determinado organismo en laboratorio, es probable que sea atóxico al mismo individuo en campo. Los extractos de hojas, tallos y flores presentaron excelentes resultados al momento de controlar la penetración de *Radopholus similis*, aunque estadísticamente todos los

extractos ejercieron biocontrol sobre el nematodo. En experimentos realizados por Bharadwaj y Sharma (2007) quedó demostrado que extractos de hojas y flores de *Tagetes* spp. ejercieron un mejor control contra huevos *M. incognita*, donde comprobaron que esto fue debido a la presencia de terpenos, tiofenos y terpenoides encontrados en estas partes, además Kamal y Mangla (1987) afirman que los ejes florales de *T. patula* contienen 2,1 mg/g de piretrina cuyo efecto toxico es letal; igualmente Ray y Singh (2008) establecen que tanto las hojas como las flores de *Tagetes* spp. tienen un alto contenido de α -terthienyl, al que se le considera el principal responsable del efecto toxico sobre el nematodo (Chitwood 1992, Vasudevan et ál. 1997). Por otro lado extractos de raíz demostraron tener un bajo potencial para la reducción de la penetración de *R. similis* en condiciones de invernadero, esto también lo encontró Salem y Osman (1988), donde determinaron que extractos de raíz de *Tagetes* spp. tienen un menor efecto en la reducción de poblaciones de *Meloidogyne javanica* en el cultivo de tomate al ser comparados con el efecto de cultivos intercalados de *Tagetes* spp. en campo.

4.5.2 Bioensayos de extractos de Tagetes spp. y raquis de banano enriquecidos con microorganismos endofíticos para el control de R. similis

Los dos experimentos realizados en esta investigación tanto *in vitro* como en invernadero, proporcionaron una nueva visión sobre las alternativas existentes de manejo de los fitonematodos; varias alternativas para una producción sostenible han sido reportadas por varios autores que consideran al manejo integrado de nematodos como una opción al uso excesivo de nematicidas usados en la actualidad que afectan no solo la salud y los recursos no renovables, sino también a los microorganismos benéficos del suelo (Ploeg 2002, Wang et ál. 2002, Pocasangre 2003). Varios han sido los extractos botánicos evaluados sobretodo de la familia Asterácea para el control de fitonematodos en múltiples cultivos donde se han obtenido excelentes resultados (Gommers y Bakker 1988, Chitwood 2002).

Los resultados del primer ensayo donde se evaluó la movilidad de los nematodos y no la mortalidad como lo recomiendan Yamashita y Viglierchio (1987) y Alphey et ál. (1988). Se encontró la formación de dos grupos que fueron separados por el testigo químico, uno que estaba conformado por todos los extractos que contenían *Tagetes* spp. y otro que contenía

todos los extractos de raquis. Extractos de *Tagetes* spp. poseen varios metabolitos secundarios en su interior. Halbrecht (1996) y Topp et ál. (1998) mencionan que la supresión de nematodos se debe a la presencia de los tiofenos y moléculas de sulfuro heterocíclico, ya que cuando se activan los tiofenos se transforman en α -tertienilo que producen radicales libres provocando una parálisis por la reducción del oxígeno en los viales (Bakker et ál. 1979, McKenry 1991, Topp et ál. 1998). Prada (1996), en estudios de laboratorio, encontró que extractos de *Tagetes* spp. provocaron una alta inmovilidad sobre *Meloidogyne incognita*. Por el contrario Riga et ál. (2005) encontraron que extractos de *Tagetes erecta* y *Tagetes patula* poseen un efecto nematocida sobre *Heterodera schachtii*, *Meloidogyne halapa* y *Pratylenchus penetrans*, concluyendo que a las dosis utilizadas no se evidenció un efecto nematostático.

Para el caso de los extractos de raquis la falta de literatura hace difícil una discusión sobre su efecto, pero un estudio realizado por Ortiz et ál. (2009) donde evaluó la actividad *in vitro* de lixiviados de raquis de banano y plátano sobre *Mycosphaerella fijiensis*, encontró que concentraciones entre 30 y 70% fueron efectivas en la reducción en longitud de tubo germinativo en ascosporas, diámetro de colonias y peso de la masa hifal del hongo. Al observar los resultados obtenidos en el ensayo *in vitro*, podemos mencionar que el mayor efecto de biocontrol de los extractos está básicamente aportado por los productos originales (*Tagetes* spp. y raquis) del cual provienen, mas no de la interacción con los microorganismos, a pesar que Meneses (2003) afirma que la actividad nematocida de extractos metabólicos de hongos endofíticos sobre *R. similis* es alta según la concentración y el tiempo de exposición. Tal vez esta es la razón por la cual los extractos de raquis no ejercieron un efecto controlador puesto que si consideramos el alto contenido de humedad que posee el raquis (85-93%) (Giraldo et ál. 2000, Muñoz y Madriñán 2005) este diluiría la cantidad de esporas provocando un bajo biocontrol.

El segundo ensayo con los extractos de *Tagetes* spp. y raquis de banano se realizó en invernadero, donde se pudo evaluar el poder de los extractos sobre el nematodo barrenador *Radopholus similis*. Los microorganismos endofíticos que se evaluaron fueron cepas de hongos (*Trichoderma atroviride* y *Fusarium oxysporum*) que han demostrado reducir poblaciones de *R. similis* hasta un 90% (Pocasangre 2000, Pocasangre et ál. 2000) y cepas de bacterias (*Bacillus* spp. y *Pseudomonas* spp.) que han presentado reducciones de nematodos de hasta un 80% (Núñez 2006; Quesada 2006).

En la presente investigación los datos señalan que 10 tratamientos se diferenciaron del testigo químico, mientras que 8 de los tratamientos que se encontraban también combinados con microorganismos demostraron ser buenos biocontroladores de *R. similis*, sin diferenciarse estadísticamente del testigo químico. Este efecto positivo lo menciona Guetsky et ál. (2002) quienes demostraron que el uso de combinaciones de agentes de control biológico mejora significativamente la eficacia y consistencia del biocontrol sobre el organismo patogénico. Siete de los extractos presentaron porcentajes de biocontrol superiores al 80%, de estos cinco pertenecen a *Tagetes* spp. y dos a raquis, dentro de los cuales seis son combinaciones con microorganismos y solamente uno se encuentra sin ellos. En este caso contrario a lo expresado por Zaki y Maqbool (1991) y Esnard et ál. (1998) donde mencionan que las combinaciones de agentes controladores producen antagonismo o un bajo efecto al compararlas por separado; las combinaciones de extractos con microorganismos endofíticos resultaron ser eficientes en los controles de nematodos ya que se logro potencializar los extractos botánicos.

Topp et ál. (1998) mencionan que el efecto de plantas del género *Tagetes* spp. esta comprobado para suprimir poblaciones de *Platylenchus penetrans* y varias especies de *Meloidgyne*, a pesar que al activarse los tiofenos presentes en sus órganos pueden producir fuertes agentes biocidas que puede perturbar las poblaciones microbianas del suelo (José y Gallespie 1998); esto quedo refutado por Topp et ál. (1998) cuando evaluaron las tasas de mortalidad regresiva de microorganismos inducidos como las bacterias *Escherichia coli* y *Rhodococcus* TE1, donde no se encontraron diferencias en suelos tratados con *Tagetes* spp. y suelos sin estos, además la presencia de agentes biocidas fue baja. Meyer et ál. (2006) por su parte encontró que extractos que son altamente tóxicos para huevos y juveniles 2 de *Meloidogyne incongnita*, no afectan las poblaciones de microorganismos benéficos como *Pseudomonas fluorescens*, *Trichoderma virens*, *Fusarium oxysporum* f. sp. gladiolos no patogénico y *Enterobacter cloacae*.

Por otra parte, los extractos de raquis RB25 y RB20 presentaron niveles de biocontrol entre 89 y 83%, esos datos coinciden con los reportados por Núñez (2006) y Quesada (2006) donde encontraron reducciones de poblaciones de *R. similis* por efecto de bacterias endofíticas de entre 70 y 85%. El raquis en este ensayo presento una mejor interacción con las bacterias, no así con los hongos o sus combinaciones. La posible causa de este efecto positivo con las bacterias se le puede atribuir a la composición química del raquis, ya que en un estudio

químico realizado por Simó et ál. (2003) se encontró que el raquis es un producto alto en Nitrógeno (2,72%) y alto en potasio (9,50%) comparando gallinaza (1,80% N-1,30% K), cachaza (0,51% N- 0,36% K), estiércol vacuno (1,70% N- 2,10% K), esto al ser evaluados como sustratos para la alimentación de lombriz para la producción de humus. De igual forma el raquis ha sido evaluado en forma de harina de raquis para la fabricación de un producto alimenticio para humanos, donde de la composición química de la harina contiene 17,2% de azúcares totales, 3,7% de ceniza, 6,8% de proteína y pH de 5,7 (Carvajal et ál. 2002). Esta alta cantidad de minerales y nutrientes hace suponer que tuvo un efecto benéfico en la reproducción de las colonias de bacterias en las raíces de las plantas de banano, ya que Zavaleta (1985) menciona que el efecto nematicida de las bacterias se potencializa cuando el medio de cultivo contiene altas dosis de compuestos nitrogenados; además adiciona que las bacterias son capaces de producir metabolitos tóxicos cuando la fuente de nitrógeno es proveniente de una fuente orgánica y contenía grupos aminos.

4.6 Conclusiones

- Existió enriquecimiento de los extractos botánicos de *Tagetes* spp. y raquis de banano al ser combinados con microorganismos endofíticos sobre el control de *Radopholus similis*.
- Extractos de hojas, tallos, raíz y flor de *Tagetes* spp. disminuyeron la penetración del nematodo barrenador *Radopholus similis* entre un 55 a 81% en todas sus concentraciones donde no se establecieron diferencias entre sí, incluso algunos tratamientos redujeron la penetración de *R. similis* superando al testigo químico Terbufos 10GR (74%).
- El aumento en el tiempo de exposición de *R. similis* a los extractos evaluados incrementa el nivel de biocontrol del nematodo, encontrándose que exposiciones de 24 horas fueron efectivas en la mayoría de los tratamientos.
- Los tratamientos que presentaron altos porcentajes de biocontrol ($\geq 80\%$) sobre *Radopholus similis* fueron RB25, RB20, TH10, TH20, THB25, T10 y THB15 los cuales fueron evaluados en plantas de banano cv “Gran enano” en invernadero.

- Extractos acuosos de plantas del género *Tagetes* spp. tienen un efecto nematocida sobre *Radopholus similis* en condiciones de laboratorio e invernadero.

4.7 Recomendaciones generales

- Realizar estudios posteriores utilizando otros métodos de extracción para la obtención de una mayor cantidad de metabolitos secundarios en los extractos.
- Evaluar el efecto de extractos de hojas, tallos, raíz y flores de *Tagetes* spp. en experimentos de biocontrol en condiciones de invernadero.
- Se recomienda realizar estudios de caracterización de los metabolitos secundarios de los extractos de *Tagetes* spp. para poder determinar que compuestos se encuentran presentes y son responsables del efecto biocida sobre *Radopholus similis*.
- Realizar la caracterización química y metabólica de los extractos de raquis, para determinar que compuesto es el responsable del mejor desarrollo de la planta de banano.
- Evaluar los extractos de *Tagetes* spp. y raquis de banano enriquecidos con microorganismos que presentaron un mayor biocontrol en plantaciones semi-comerciales y comerciales para verificar la evolución a través del tiempo.
- Realizar pruebas de enriquecimiento de extractos de *Tagetes* spp. y raquis de banano con otros microorganismos endofíticos para evaluar su comportamiento al estar en contacto con estas soluciones.
- Realizar estudios tendientes a explicar los mecanismos de acción de los extractos acuosos de *Tagetes* spp. y raquis de banano, responsables del biocontrol de *R. similis*.

4.8 Bibliografía

- Adegbite, A. A; Adesiyun, S.O. 2005. Root extracts of plants to control root-knot nematode on edible soybean. *World Journal of Agricultural Sciences* 1(1):18-21.
- Alfaro, C. 2004. Reutilizar desechos de banano para elaboración de plástico. *Boletín de Ciencia y Tecnología* No. 22 (en línea). CORBANA. Consultado 28 oct. 2008. Disponible en <http://www.conicit.go.cr/boletin/boletin22/coorbana.shtml>
- Alphey, T.J; Robertson, W.M; Lyon, G.D. 1988. Rishitin a natural plant product with nematicidal activity. *Revue Nématologie* 11:399-404.
- Araya, M. 2000. La biodegradación de nematicidas en banano (*Musa* AAA). *Corbana* 26(53):63-74.
- Araya, M. 2003. Situación actual del manejo de nematodos en banano (*Musa* AAA) y plátano (*Musa* AAB) en el trópico americano. *In* Rivas, G; Rosales, F. Eds. Taller Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas. Guayaquil, Ecuador (11-13 de agosto 2003). INIBAP. MUSALAC. Montpellier, FR. p. 79-102.
- Bakker, J; Gommers, F. J; Nieuwenhuis, I; Wynberg, H. 1979. Photoactivation of the nematicidal compound α -Terthienyl from roots of marigolds (*Tagetes* species). *Journal of Biological Chemistry*. 254(6):1841-1844.
- Bharadwaj, A; Sharma, S. 2007. Effect of some plant extracts on the Hatch of *Meloidogyne incognita* Eggs. *International Journal of Botany* 3(3):312-316.
- Carvajal, L.L; Sánchez, M.L; Giraldo, G; Arcila, M.I. 2002. Diseño de un producto alimenticio para humanos (hojuelas a partir de raquis de plátano (*Musa* AAB Simmonds). *In* Memorias XV Reunión Internacional Acorbat, Cartagena de Indias, Colombia (27 de octubre al 02 de noviembre 2002). AUGURA, Medellín, CL. p. 531-534.
- Chang, G.F; Towers, G.H; Mitchell, J.C. 1975. Ultraviolet medicated antibiotic activity of Thiophene compound of *Tagetes* spp. *Phytochemistry*. 14: 2225-2296.
- Chávez Méndez, N.P. 2007. Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorn. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 85 p.
- Chitwood, D. J. 1992. Nematicidal compounds from plants. *In* Nigg, H. N; Saigler, D. Eds. *Phytochemical Resources for Medicine and Agriculture*. Plenum Press, New York, US. p. 185-204.
- Chitwood, D. J. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. *Annu. Rev. Phytopathol* 40:221-249.
- CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 2004. Desarrollo de medidas de manejo del Moko (*Ralstonia solanacearum*), de plátano (*Musa* AAB) en Colombia, mediante investigación participativa con agricultores. Consultado 06 nov. 2008. Disponible en http://www.ciat.cgiar.org/ipm/pdfs/moko_platano_colombia_premio.pdf

- Ciccio, J. 1991. Metabolitos secundarios y quimiotaxonomía. *In* Montiel, M. Introducción a la flora de Costa Rica. 2da. Ed. Editorial de la Universidad de Costa Rica, San José. p. 139-164.
- Esnard J; Marban Mendoza, N; Zuckerman, B.M. 1998. Effects of three microbial broth cultures and an organic amendment on growth and populations of free-living and plant-parasitic nematodes on banana. *European Journal of Plant Pathology* 104: 457-463.
- Giraldo, G.A; Carvajal, L.L; Sánchez, M.L; Arcila, M.I. 2000. Diseño de un producto alimenticio para humanos (hojuelas) a partir del raquis de plátano Dominico Hartón (*Musa* AAB Simmonds). *In* Cayón, D.G; Giraldo, G; Arcila, N.I. (Eds.) Postcosecha y Agroindustria del Plátano en el Eje Cafetero de Colombia. Armenia, Quindío. Fudesco. p. 217-222.
- Gommers, F. J., and Bakker, J. 1988. Physiological diseases induced by plant responses or products. Pp. 3–22. *in* G. O. Poinar Jr. and H.-B. Jansson, eds. Diseases of nematodes, vol. 1. Boca Raton, FL: CRC Press Inc.
- Gowen, S.C, Quénéhervé, P; Fogain, R. 2005. Nematode parasites of banana, plantain and abaca. *In* Luc, M; Sikora, R.A; Bridge, J. Eds. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agricultura. 2da ed. CAB International, Wallingford, UK. p. 611-643
- Guetsky R; Shtienberg, D; Elad, Y; Dinooor, A. 2001. Combining Biocontrol Agents to Reduce the Variability of Biological Control. *Phytopathology* 92(9):976-985.
- Halbrendt, J. 1996. Allelopathy in the management of plant parasitic nematodes, *Journal of Nematology* 28 (1):8-14.
- Hassan, S.A; Bigler, F; Bogenschütz, H; Boller, E; Brun, J; Calis, M; Coremans-Pelseneer, J; Duso, C., Grove, A; Heimbach, U; Helyer, N; Hokkanen, H; Lewis, G.B; Mansour, F; Moreth, L; Polgar, L; Samsøe Petersen, L; Sauphanor, B; Stäubli, A; Sterk, G; Vainio, A; van de Veire, M; Viggiani, G; Vogt, H. 1994. Results of the sixth joint pesticide testing programme of the IOBC/WPRS-working group pesticide and beneficial organisms. *Entomophaga* 39:107-119.
- Hidalgo Araneda, D. A. 2008. Actividad nematicida sobre *Meloidogyne hapla* de extractos acuosos de especies arbóreas y arbustivas de la zona sur de Chile. Tesis Lic. Agro. Valdivia, CL. Universidad Austral de Chile. 75 p.
- Insunza, V; Aballay, E; Macaya, J. 2001. *In vitro* nematicidal activity of aqueous plant extracts on Chilean populations of *Xiphinema americanum sensu lato*. *Nematropica* 31:47-54.
- Jose, S; Gillespie, A. R. 1998: Allelopathy in black walnut (*Juglans nigra* L.) alley cropping. I. Spatiotemporal variation in soil julone in a black walnut-corn (*Zea mays* L.) alley cropping system in the midwestern USA. *Plant and Soil* 203: 191–197.
- Kamal, R; Mangla, M. 1987. Toxicity of natural pyrethrins against *Mesocyclops leuckarti* sensu lato carrier of dranculiasis. *Pyrethrum Post* 16:125-127
- Larco Reyes, E. 2004b. Desarrollo y evaluación de lixiviados de compost y lombricompost para el manejo de Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijensis* Morelet), en plátano. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 77 p.

- Larco, E. 2004a. Preparación de lixiviados de compost y lombricompost. Hoja técnica No. 49. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología no.73:79-82.
- Marín, D.H. 2005. Research in progress and future perspectives on the root system management (Resumen). *In* Turner, D.W; Rosales, F.E. Eds. Banana Root System: towards a better understanding for its productive management. Proceedings of an international symposium held in San José, Costa Rica (3-5 November 2003). INIBAP, Montpellier, FR p. 23.
- McKenry, M.V. 1991. Marigolds and nematode management. UC Plant Protection Quarterly 1(2):1-5.
- Meneses Hernández, A. 2003. Utilización de hongos endofíticos provenientes de banano orgánico para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus* (Cobb) Thorne. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 67 p.
- Meyer, S. L; Zasada, I. A; Roberts, D. P; Vinyard, B. T; Lakshman, D. K; Lee, J. K; Chitwood, D. J; Carta, L. K. 2006. *Plantago lanceolata* and *Plantago rugelii* extracts are toxic to *Meloidogyne incognita* but not to certain microbes. Journal of Nematology 38(3):333-338.
- Moens, T; Araya, M; Swennen, R; De Waele, D. 2003. Biodegradación acelerada de nematicidas de *Musa*. *In* Rivas, G; Rosales, F. Eds. Taller Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas. Guayaquil, Ecuador (11-13 de agosto 2003). INIBAP. MUSALAC. Montpellier, FR. p. 105-118.
- Montes, B.R; García, L.R. 1997. Efectos de extractos vegetales en la germinación de esporas y los niveles de daño de *Alternaria solani* en tomate. Fitopatología 32:52-57.
- Morallo, R.B. 1987. Botanical pest control reseach in the Philippines. Philippine Entomologist 7:1-30.
- Motato, K.E; Mejía, A.I; León, A. 2006. Evaluación de los residuos agroindustriales de plátano (*Musa paradisiaca*) y aserrín de abarco (*Cariniana piriformes*) como sustratos para el cultivo del hongo *Pleurotus djamor*. Revista de la facultad de química Farmaceutica, VITAE 13(1):24-29.
- Muñoz, R. E; Madriñán Molina, R. 2005. Efecto de lixiviados del raquis de plátano sobre la actividad y biomasa microbiana en floración y cosecha del tomate (en línea). Acta Agronómica 54(1). Consultado 01 nov de 2009. Disponible en http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/acta_agronomica/article/viewFile/104/228
- Núñez Pérez, C.T. 2006. Estudio de poblaciones de bacterias endofíticas de la rizosfera del banano para el biocontrol del nematodo barrenador *Radopholus similis*. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 62 p.
- O'Bannon, J.H. 1977. Woldwide dissemination of *Radopholus similis* and its importance in crop production. Journal of Nematology 9(1):16-25.
- Ocampo Sánchez, R. A; Martínez, J. V; Cáceres, A. 2007. Manual de Agrotecnología de plantas medicinales nativas. Ediciones Sanabria, CR. 144p.
- Ortiz Bastidas, M.F; Jiménez, M.I. 2009. Evaluación de la actividad de los lixiviados de raquis de Banano (*Musa AAA*), Plátano (*Musa AAB*), y Banano Orito (*Musa AA*) sobre el

- agente ausal de La Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en condiciones *in vitro* (en línea). Consultado 30 sep. 2009. Disponible en <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/361/1/692.pdf>
- Ploeg, A. T. 2002. Effects of selected marigolds varieties on root-knot nematodes and tomato and melón yields. *Plant Disease* 86:505-508.
- Pocasangre L. E; Sikora, R. A; Vilich, V. Schuster, R. 2000. Survey of banana endophytic fungi from Central America and screening for biological control of *Radopholus similis*. *Acta Horticulturae* 531:283-290.
- Pocasangre, L. 2000. Biological enhancement of banana tissue culture plantlets with endophytic fungi for the control of the burrowing nematode *Radopholus similis* and the Panama disease (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*). Tesis Ph.D. Universidad de Bonn. 95 p.
- Pocasangre, L. 2003. Nuevas estrategias para el manejo de nematodos en musáceas. In Rivas, G; Rosales, F. Eds. Taller Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los Trópicos. Guayaquil, Ecuador (11-13 de agosto 2003). INIBAP. MUSALAC. Montpellier, FR. p. 121.
- Pocasangre, L.E; zum Felde, A; Meneses, A; Cañizares, C; Riveros, A.S; Rosales, F.E; Sikora, R. 2004. Manejo alternativo de fitonematodos en banano y platano. In XVI Reunión Internacional de ACORBAT (26 de septiembre al 1 de octubre de 2004), Oaxaca de Juárez, Oaxaca, MX. p. 106-112.
- Prada Jaco, R. Y. 1996. Evaluación de extractos botánicos contra el nematodo *Meloidogyne incognita* en frijol (*Phaseolus vulgaris*). In 42 Reunión anual del PCCMCA (18-22 marzo de 1996), San Salvador. 17 p.
- Quesada, C. 2006. Bacterias endofíticas de la rizosfera del banano para el biocontrol del nematodo barrenador (*Radopholus similis*). Tesis Ing. Agr. Olancho, HN, UNA. 51 p.
- Ray, D. P; Singh, R. P. 2008. Chemistry and potentiality of marigold (*Tagetes* sp.) in pest management. *Journal of Interacademia* 12(3):405-415.
- Riga, E; Hooper, C; Potter, J. 2005. *In vitro* effect of marigold seed exudates on plant parasitic nematodes. *Phytoprotection* 86(1):31-35.
- Salem, F. M; Osman, G. Y. 1988. Effectiveness of *Tagetes* natural exudates on *Meloidogyne javanica* (Chitwood) nematode. *Anzeiger für Schädlingskunde* 61(1):17-19.
- Sarah, J.L. 1989. Banana nematodes and their control in Africa. *Nematropica* 19(2):199-216.
- Sarah, J.L; Pinochet, J; Stanton, J. 1996. The burrowing nematode of bananas, *Radopholus similis* Cobb, 1913. *Musa Pest Fact Sheet* No. 1. (en línea). INIBAP. Consultado 22 oct. 2009. Disponible en <http://www.bioversityinternational.org/publications/pdf/129.pdf>
- Sasanelli, N; D'Addabbo. T. 1992. The effect of *Cineraria marítima*, *Ruta graveolens* and *Tagetes erecta* extracts on the hatching of *Heterodera shachtii*. *Nematologia mediterranea* 20:49-51.
- Sikora, R.A; Pocasangre, L.E. 2004. Nuevas tecnologías para mejorar la salud de las raíces y aumentar la producción de los cultivos. *InfoMusa* 13(2):25-29.

- Sikora, R.A; zum Felde, A; Mendoza, A; Cabrera, J.A; Kurtz, A; Shouten, A; Pocasangre, L. 2007. The burrowing nematode of banana: strategies for controlling the uncontrollable (Session 2: Soil health). *In* Recent advances in banana crop protection for sustainable production and improved livelihoods (Programme and abstracts). Greenway Woods Resort, White River, South Africa (September 10-14, 2007). ISHS/ProMusa. p. 16.
- Simó González, J. E; Ruiz Martínez, L. A; Rivera Espinosa, R; Morales Ortega, O. M; Carbajal Sánchez, D; Ramírez Pedraza, T. 2003. Estudios integrales para el manejo y producción in situ de alternativas de fertilización en el cultivo del plátano (en línea). Documentos FAO. Consultado 30 oct. 2009. Disponible en <http://www.fao.org/docs/eims/upload/cuba/5383/FAOJaime1.pdf>
- Topp, E; Millar, S; Bork, H; Welsh, M. 1998. Effects of marigold (*Tagetes* sp.) roots on soil microorganisms. *Biology and Fertility of Soils* 27: 149-154.
- Vasudevan, P; Kashyap, S; Sharma, S. 1997. *Tagetes*: A multipurpose plant. *Bioscience Technology* 62(1):29-35.
- Wang, K. K; Sipes, B. S; Schmitt, D. P. 2002. Management of *Rothylenchulus reniformis* in pineapple, *Ananas comosus*, by intercycles cover crops. *Journal of Nematology* 34:106-114.
- Yamashita, T.T; Vigliercho, D.R. 1987. *In vitro* testing for nonfumigant nematicide resistance in *Xiphinema index*. *Revue de Nématologie* 10:75-79.
- Zaki, M,J; Maqbool, M.A. 1991. Combined efficacy of *Pasteuria penetrans* and other biocontrol agents on the control of root-knot nematode on okra. *Pakistani Journal of Nematology* 9:49-52.
- Zavaleta Mejía, E. 1985. Las bacterias como agentes de control biológico de nematodos fitopatógenos. *In* Marbán, N; Thomason, I. J. *Fotopatología avanzada I*. Colegio de Postgraduados, Chapingo, MX. p. 195-214.
- zum Felde, A. 2002. Screening of the endophytic fungi from banana (*Musa*) for antagonistic effects towards the burrowing nematode *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. *Mag. Sc. Tesis*. Bonn, DE, University of Bonn. 53 p.