



Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza
Tropical Agricultural Research and Education Center

PROGRAMA DE EDUCACIÓN PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACIÓN

ESCUELA DE POSGRADO

**UTILIZACIÓN DE BACTERIAS Y HONGOS ENDOFÍTICOS
PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DEL NEMATODO
BARRENADOR *Radopholus similis* (Cobb) Thorn**

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

Magister Scientiae en Agricultura Ecológica

Por

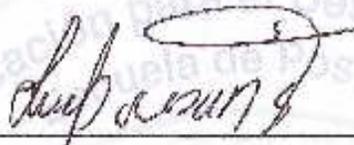
Nancy Patricia Chaves Méndez

Turrialba, Costa Rica, 2007

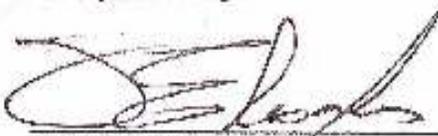
Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación de la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero de la Estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

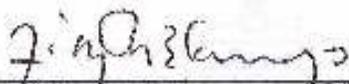
FIRMANTES:



Luis E. Pocasangre, Ph.D.
Consejero Principal



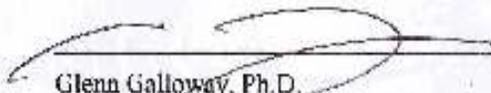
Franklin E. Rosales, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



Fritz Blango, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



Miguel Quesada, M.Sc.
Miembro Comité Consejero



Glenn Galloway, Ph.D.
**Director Programa de Educación y
Decano de la Escuela de Posgrado**



Nancy Patricia Chaves Méndez
Candidata

DEDICATORIA

A mi Dios, porque “puse en él toda mi confianza y él se inclinó hacia mí y escuchó mi clamor” Sal 40:1

A mi esposo, por su paciencia, motivación y apoyo incondicional.

A mi mamá y mis hermanos, a quienes amo y llevo siempre en mi corazón y en mi pensamiento.

A mi papi en el cielo, quien sé que estaría orgulloso de mí.

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento al Dr. Luis Pocasangre por su apoyo, sus consejos y por todo lo que aprendí gracias a él.

A los doctores Franklin Rosales de Bioersivity, Fritz Elango, mi profesor de EARTH y a don Miguel Quesada de Del Monte, por su apoyo y sus valiosos aportes como miembros del Comité Consejero.

A FONTAGRO/BIOVERSITY/CATIE por el apoyo económico para la realización de esta investigación.

Al Lic. Fernando Casanoves por su gentil colaboración.

A Nelly Vásquez, por su valiosa contribución a esta investigación.

Al personal del laboratorio de Fitopatología y Nematología del CATIE, Cindy, Carmen y Manrique, por su ayuda y su paciencia, por todos los cafecitos y tantos buenos momentos compartidos a lo largo de este año de estudio, mil gracias.

Al amable personal de la Biblioteca Orton, quienes siempre me brindaron una manita en mis búsquedas de información.

A mis compañeros (as) y amigos (as) del grupo C3Nissi, a los de Agricultura ecológica, y a todos aquellos que de una u otra manera fueron partícipes de este proceso y me apoyaron, que Dios les bendiga por siempre.

CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTO	iv
CONTENIDO	v
RESUMEN	viii
SUMMARY	ix
LISTA DE CUADROS	x
LISTA DE FIGURAS	xii
I. Introducción general	1
II. Objetivos	3
III. Hipótesis	3
IV. Revisión de literatura	4
1. El cultivo del banano	4
2. Los nematodos	5
3. Nematodos en el cultivo de banano (<i>Musa</i> spp.) y su importancia económica	6
4. Patogenicidad de <i>Radopholus similis</i> y su combate	7
4.1 Control químico	9
4.2 Control biológico e inducción de resistencia	9
5. Potencial antagonista de microorganismos endófitos (endofíticos)	11
6. Bacterias endofíticas (BE)	12
6.1 <i>Bacillus</i> spp.	13
6.2 <i>Pseudomonas</i> spp.	14
7. Hongos endofíticos (HE)	15
7.1 <i>Trichoderma</i> spp.	16
7.2 <i>Fusarium</i> spp.	17
8. Referencias bibliográficas	18
V. Artículo 1. Estudios sobre interacciones biológicas entre hongos y bacterias endofíticas y su patrón de colonización en plantas de banano del cultivar “Gran Enano” (<i>Musa</i> AAA)	
1. Introducción	27
2. Materiales y métodos	28
2.1 Localización del estudio	28
2.2 Material experimental	28
2.3 Determinación de unidades formadoras de colonias (ufc) y potencial de inóculo	29
2.3.1 Preparación de bacterias endofíticas	29
2.3.2 Preparación de hongos endofíticos	30

2.4 Prueba biológica <i>in vitro</i> para determinar la compatibilidad entre bacterias y hongos endofíticos	30
2.4.1 Cocultivo de bacterias y hongos endofíticos	30
2.5 Prueba biológica <i>in vivo</i> para determinar la compatibilidad entre bacterias y hongos endofíticos y su patrón de colonización en la planta	31
2.5.1 Protección de vitroplantas con agentes biológicos	31
2.5.2 Desinfección superficial de tejidos para evaluación de colonización	32
2.6 Estudios histológicos	32
2.6.1 Procesamiento de muestras	33
2.7 Diseño experimental y análisis estadístico para pruebas de compatibilidad <i>in vivo</i>	34
3. Resultados	35
3.1 Determinación de unidades formadoras de colonias (ufc) y potencial de inóculo	35
3.1.1 Descripción morfológica de las estructuras de los agentes biológicos en estudio	35
3.1.2 Descripción de las estructuras reproductivas de los agentes biológicos en estudio	36
3.2 Prueba biológica <i>in vitro</i> para determinar la compatibilidad entre bacterias y hongos endofíticos	37
3.3 Prueba biológica <i>in vivo</i> para determinar la compatibilidad entre bacterias y hongos endofíticos y su patrón de colonización en la planta	38
3.4 Estudios histológicos	43
4. Discusión	44
4.1 Determinación de unidades formadoras de colonias (ufc) y potencial de inóculo	44
4.2 Prueba biológica <i>in vitro</i> para determinar la compatibilidad entre bacterias y hongos endofíticos	45
4.3 Prueba biológica <i>in vivo</i> para determinar la compatibilidad entre bacterias y hongos endofíticos y su patrón de colonización en la planta	45
4.4 Estudios histológicos	47
5. Conclusiones	47
5.1 Determinación de unidades formadoras de colonias (ufc) y potencial de inóculo	47
5.2 Prueba biológica <i>in vitro</i> para determinar la compatibilidad entre bacterias y hongos endofíticos	48
5.3 Prueba biológica <i>in vivo</i> para determinar la compatibilidad entre bacterias y hongos endofíticos y su patrón de colonización en la planta	48
6. Referencias bibliográficas	50
VI. Artículo 2. Efecto de las inoculaciones combinadas de hongos y bacterias endofíticas sobre el biocontrol de <i>Radopholus similis</i> y en la promoción de crecimiento de plantas de banano del cultivar “Gran Enano” (<i>Musa AAA</i>)	
1. Introducción	52
2. Materiales y métodos	53
2.1 Material experimental	53
2.2 Bioensayo de penetración de <i>Radopholus similis</i> en vitroplantas de banano (<i>Musa AAA</i>)	55
2.2.1 Protección y siembra de vitroplantas	55
2.2.2 Cultivo monoxénico de <i>Radopholus similis</i>	55
2.2.3 Inoculación de vitroplantas con <i>Radopholus similis</i>	57

2.2.4	Evaluación del porcentaje de penetración de <i>Radopholus similis</i>	57
2.3	Prueba de biocontrol de <i>Radopholus similis</i> en vitroplantas de banano (<i>Musa AAA</i>)	58
2.4	Efecto de los agentes biológicos en la promoción de crecimiento de las plantas	59
2.5	Diseño experimental y análisis estadístico para bioensayos de biocontrol y promoción de crecimiento	60
3.	Resultados	61
3.1	Bioensayo de penetración de <i>Radopholus similis</i> en vitroplantas de banano	61
3.2	Prueba de biocontrol de <i>Radopholus similis</i> en vitroplantas de banano	62
3.3	Efecto de los agentes biológicos en la promoción de crecimiento de las plantas	65
4.	Discusión	69
4.1	Bioensayo de penetración de <i>Radopholus similis</i> en vitroplantas de banano	69
4.2	Prueba de biocontrol de <i>Radopholus similis</i> en vitroplantas de banano	71
4.3	Efecto de los agentes biológicos en la promoción de crecimiento de las plantas	73
5.	Conclusiones	75
5.1	Bioensayo de penetración de <i>Radopholus similis</i> en vitroplantas de banano	75
5.2	Prueba de biocontrol de <i>Radopholus similis</i> en vitroplantas de banano	75
5.3	Efecto de los agentes biológicos en la promoción de crecimiento de las plantas	76
6.	Recomendaciones generales	77
7.	Referencias bibliográficas	78
VII.	Anexos	82

CHAVES MÉNDEZ, NP. 2007. UTILIZACIÓN DE BACTERIAS Y HONGOS ENDOFÍTICOS PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DEL NEMATODO BARRENADOR *Radopholus similis* (Cobb) Thorn

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

RESUMEN

Ocho aislamientos endofíticos con conocida actividad antagonista contra *Radopholus similis* fueron estudiados en condiciones *in vivo* e *in vitro* para determinar su compatibilidad, así como su efecto, tanto individual como combinado, sobre el biocontrol de *R. similis* y en la promoción de crecimiento de vitroplantas de banano del cultivar “Gran Enano” en invernadero. No se encontraron casos de incompatibilidad en las combinaciones hongo-bacteria y bacteria-bacteria en ninguno de los ensayos realizados. Las bacterias presentaron un mayor número de ufc/ml y potencial de inóculo en comparación con los hongos. Asimismo, en todas las combinaciones hongo-bacteria y bacteria-bacteria, las bacterias presentaron un crecimiento más rápido y mayor porcentaje de colonización en la planta independientemente del órgano estudiado. La penetración de *R. similis* en el sistema radical fue significativamente menor en plantas protegidas con inoculaciones mixtas en comparación con la inoculación individual de los agentes biológicos y el testigo absoluto. Adicionalmente, se encontró que la combinación de los agentes de biocontrol presentó mejor efecto en la reducción de la población final de *R. similis* en el sistema radical, en comparación con la inoculación de cada agente por separado, con diferencias altamente significativas ($p \leq 0,0001$) con respecto al testigo referencial. Veintiún tratamientos presentaron actividad antagonista estadísticamente similar al testigo químico, con porcentajes de biocontrol entre 62 y 93%. El efecto aditivo y/o sinérgico de los mecanismos de acción de los agentes biológicos quedó demostrado en su actividad antagonista contra *R. similis*. Además, los resultados obtenidos en el bioensayo de promoción de crecimiento demostraron que plantas protegidas con inoculaciones múltiples presentaron valores mayores en las variables peso total de la planta, peso radical y longitud radical en comparación con las inoculaciones individuales y los testigos.

CHAVES MÉNDEZ, NP. 2007. UTILIZATION OF ENDOPHYTIC BACTERIA AND FUNGI FOR THE BIOLOGICAL CONTROL OF THE BURROWING NEMATODE *Radopholus similis* (Cobb) Thorn

Key words: bacteria, fungi, endophytic, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, biological control, *Radopholus similis*, growth promotion, compatibility.

SUMMARY

Eight endophytic fungal and bacterial isolates with well-known antagonistic activity against *Radopholus similis* were evaluated under *in vivo* and *in vitro* conditions to determine their compatibility as well as their individual and combined effects on the biocontrol of *R. similis* and on the growth promotion of “Grand Naine” cultivar plantlets in the glasshouse. No evidence of fungi-bacteria or bacteria-bacteria incompatibility was observed. However, bacterial endophytes grew much faster than their fungal counterparts, and in all endophyte combinations observations showed that the bacterial component had a higher percentage of tissue colonization. Nematode penetration of the root system was significantly lower in plantlets protected with mixed than single endophyte inoculum. In addition, combinations of biocontrol agents induced a highly significant reduction in the final nematode population of roots when compared with the reference control. Twenty-one treatments produced antagonistic activity which was statistically similar to the nematicide control, with biocontrol percentages ranging between 62 and 93%. The additive or synergistic effects of the biocontrol agents were demonstrated by their antagonistic activity against *R. similis*. In addition, the growth promotion bioassay showed that plants protected with mixed inocula increased root length and gave a higher weight of plant and root biomass in comparison with single endophyte inocula and the absolute control.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Clasificación de los nematodos según el daño que ocasionan en el hospedero	5
Cuadro 2.	Descripción de los tratamientos de suspensiones mixtas hongo-bacteria y bacteria-bacteria evaluados en las pruebas de compatibilidad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	29
Cuadro 3.	Tratamientos seleccionados para estudios histológicos	33
Cuadro 4.	Unidades formadoras de colonias (ufc) de las bacterias y hongos endofíticos evaluados	35
Cuadro 5.	Colonización de bacterias y hongos endofíticos en los órganos de las vitroplantas	38
Cuadro 6.	Porcentaje de colonización de suspensiones mixtas de bacterias y hongos endofíticos en tejidos internos de vitroplantas de banano cv. “Gran Enano” a los siete días de evaluación (énfasis en colonización de bacterias)	39
Cuadro 7.	Porcentaje de colonización de suspensiones mixtas de bacterias y hongos endofíticos en tejidos internos de vitroplantas de banano cv. “Gran Enano” a los siete días de evaluación (énfasis en colonización de hongos)	40
Cuadro 8.	Porcentaje de colonización promedio de suspensiones mixtas de bacterias y hongos endofíticos en tejidos internos de vitroplantas de banano cv. “Gran Enano” a los siete días de evaluación	41
Cuadro 9.	Porcentaje de colonización de suspensiones mixtas de bacterias en los tejidos internos de vitroplantas de banano cv. “Gran Enano” a los siete días de evaluación	42
Cuadro 10.	Tratamientos evaluados en bioensayos de penetración y biocontrol de <i>Radopholus similis</i> , y en la promoción de crecimiento de vitroplantas de banano cv. “Gran Enano” (AAA)	54
Cuadro 11.	VARIABLES DE RESPUESTA A EVALUAR PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD BIOCONTROLADORA DE LOS ENDOFÍTICOS (BACTERIAS Y HONGOS) CONTRA <i>Radopholus similis</i> Y SU EFECTO EN LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO DE VITROPLANTAS DE BANANO CV. “GRAN ENANO”	60
Cuadro 12.	Porcentaje de penetración de <i>Radopholus similis</i> en plantas de banano cv. “Gran Enano” siete días después de la inoculación	62

Cuadro 13.	Rangos de efecto de los tratamientos evaluados para el biocontrol de <i>Radopholus similis</i> en vitroplantas de banano cv. “Gran Enano”, con diferencias significativas con respecto al testigo referencial	63
Cuadro 14.	Efecto de inoculaciones individuales y combinadas de bacterias y hongos endofíticos sobre el control de <i>Radopholus similis</i> en vitroplantas cv. “Gran Enano”, seis semanas después de la inoculación con nematodos	64
Cuadro 15.	Selección de los mejores diez tratamientos con base en el efecto sobre el biocontrol de <i>Radopholus similis</i> en vitroplantas cv. “Gran Enano”, seis semanas después de la inoculación con nematodos	65
Cuadro 16.	Efecto de las inoculaciones individuales y combinadas de bacterias y hongos endofíticos sobre la promoción de crecimiento de vitroplantas cv. “Gran Enano”, después de ocho semanas de crecimiento en invernadero	66
Cuadro 17.	Efecto de las inoculaciones individuales y combinadas de bacterias y hongos endofíticos en el crecimiento y desarrollo del sistema radical de vitroplantas analizadas mediante el software WinRhizo	68
Cuadro 18.	Selección de los mejores diez tratamientos con base en el efecto sobre la promoción de crecimiento de vitroplantas cv. “Gran Enano”, después de ocho semanas de crecimiento en invernadero	69

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Distribución geográfica de <i>Radopholus similis</i>	7
Figura 2.	Necrosis en la corteza de la raíz causado por <i>Radopholus similis</i>	8
Figura 3.	<i>Trichoderma atroviride</i> aislado del tejido interno de raíces de banano (<i>Musa AAA</i>)	16
Figura 4.	<i>Fusarium oxysporum</i> aislado del tejido interno de raíces de banano (<i>Musa AAA</i>)	17
Figura 5.	Protocolo para el recuento de ufc y determinación del potencial de inóculo de las bacterias endofíticas	30
Figura 6.	Protocolo para el recuento de ufc y determinación del potencial de inóculo de los hongos endofíticos	30
Figura 7.	Protocolo de inoculación de vitroplantas de banano con aislamientos endofíticos	31
Figura 8.	Protocolo de desinfección superficial de raíces, cormos y pseudotallos para prueba de colonización	32
Figura 9.	Protocolo de procesamiento de muestras de tejido radical para estudios histológicos	34
Figura 10.	Crecimiento de bacterias endofíticas en Agar Nutritivo tres días después de cultivadas	36
Figura 11.	Crecimiento de hongos endofíticos en Agar Papa Dextrosa 100% dos semanas después de cultivados	36
Figura 12.	Colonias de bacterias endofíticas observadas a una resolución de 40x	37
Figura 13.	Estructuras reproductivas de los hongos endofíticos observadas a una resolución de 40x	37
Figura 14.	Compatibilidad <i>in vitro</i> entre bacterias y hongos endofíticos después de 72 horas de cocultivo	38
Figura 15.	Porcentaje de colonización de bacterias endofíticas en los tratamientos de suspensiones mixtas hongo-bacteria evaluado en vitroplantas de banano cv. “Gran Enano”	42

Figura 16. Porcentaje de colonización de hongos endofíticos en los tratamientos de suspensiones mixtas hongo-bacteria evaluado en vitroplantas de banano cv. “Gran Enano”	42
Figura 17. Hongos endofíticos en los tejidos internos de raíces de segundo orden de vitroplantas de banano del cv. “Gran Enano” siete días después de la inoculación, observadas a una resolución de 20x	43
Figura 18. <i>Bacillus</i> spp. B21 en los tejidos internos de raíces de segundo orden de vitroplantas de banano del cv. “Gran Enano” siete días después de la inoculación, observadas a una resolución de 40x	44
Figura 19. Protocolo de inoculación de vitroplantas de banano con aislamientos endofíticos	55
Figura 20. Protocolo de preparación de discos de zanahoria para la reproducción de <i>Radopholus similis</i>	56
Figura 21. Protocolo de preparación de <i>Radopholus similis</i> para su inoculación en discos de zanahoria	56
Figura 22. Metodología utilizada en el bioensayo de penetración	57
Figura 23. Proceso de extracción de nematodos utilizado en el bioensayo de penetración	58
Figura 24. Protocolo de inoculación de vitroplantas de banano con aislamientos endofíticos	58
Figura 25. Protocolo de extracción de nematodos utilizado en la prueba de biocontrol de <i>Radopholus similis</i>	59

Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorn

I. Introducción general

El banano (*Musa* spp.) es el cuarto cultivo en importancia a nivel mundial después del maíz, arroz y trigo, representando una importante fuente de ingresos en más de 120 países de las zonas tropicales y subtropicales (Jones 2000, FAO 2005). Sin embargo, no escapa al problema fitosanitario causado por diversas especies de nematodos. Está completamente establecido que el ataque del nematodo barrenador *Radopholus similis* es uno de los principales problemas que afecta las plantaciones, y su combate constituye uno de los costos más altos del cultivo (Sarah 1989, Gowen y Quénehervé 1990, Gowen 1993). En el ámbito comercial, las grandes extensiones de monocultivo para exportación se han basado en el uso de cultivares del subgrupo Cavendish, especialmente del cultivar “Gran Enano”, con un manejo convencional de fitonematodos que contempla hasta tres aplicaciones de nematicida al año. Esto, además de constituir una práctica de alto costo económico, afecta negativamente las poblaciones de enemigos naturales de los nematodos presentes en el suelo y en la rizosfera (Davide 1996, Pocasangre 2002). Asimismo, los nematicidas representan una conocida amenaza para la salud humana y ambiental, siendo sus ingredientes activos los más tóxicos utilizados en la agricultura (Gowen 1993, Dochez *et al.* 2000, Rey *et al.* 2000, Marín 2003).

El estudio del potencial de las bacterias y los hongos endofíticos para el control biológico de fitonematodos ha adquirido gran importancia durante los últimos años, debido a la creciente necesidad de disminuir el uso de plaguicidas en los sistemas de producción agrícola (Davide 1992, Marín 2003, Mena *et al.* 2003). Estudios realizados sobre poblaciones de hongos endofíticos presentes en raíces de banano y plátano demuestran que el 10% de los hongos endofíticos colectados manifiesta una alta actividad antagonista contra *R. similis*, con reducciones de hasta un 90% en la población final del nematodo (Pocasangre *et al.* 2004); resultados similares se han presentado con bacterias endofíticas (Núñez 2006) aunque con mecanismos de acción diferentes, resultando ambos en alternativas promisorias para el combate de esta plaga. Además, se ha evidenciado un incremento en el peso radical y foliar

de las plantas, tanto con hongos como con bacterias endofíticas, en comparación con plantas no protegidas.

A partir del estudio individual de estos hongos y bacterias, ha sido posible seleccionar cuatro bacterias endofíticas, dos del género *Bacillus* spp. y dos *Pseudomonas* spp., y cuatro hongos endofíticos correspondientes a dos cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum* y dos cepas de *Trichoderma atroviride*. Estos agentes biológicos de control han evidenciado el mayor potencial antagonista en diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*. La marcada diferencia en los mecanismos de acción que expresan los hongos con respecto a las bacterias hace pensar en la posibilidad de obtener un efecto aditivo si se utilizan de manera combinada, como una estrategia para obtener un control más efectivo de la plaga y un mejoramiento biológico de las plantas.

La presente investigación se realizó en dos etapas: a) determinación de la compatibilidad de los agentes de biocontrol seleccionados, b) estudio del efecto individual y combinado de los agentes de biocontrol sobre *Radopholus similis* y la promoción de crecimiento de las plantas. Los resultados de la investigación se presentan en dos artículos, que son precedidos por un capítulo introductorio de revisión de literatura. El primer artículo se titula “Estudios sobre interacciones biológicas entre hongos y bacterias endofíticas y su patrón de colonización en plantas de banano del cultivar “Gran Enano” (*Musa AAA*)”, y el segundo trata sobre el “Efecto de las inoculaciones combinadas de hongos y bacterias endofíticas sobre el biocontrol de *Radopholus similis* y en la promoción de crecimiento de plantas de banano del cultivar “Gran Enano” (*Musa AAA*)”.

II. Objetivos

Objetivo general

Estudiar el efecto combinado de bacterias y hongos endofíticos élite sobre el biocontrol de *Radopholus similis* en vitroplantas de banano en condiciones de invernadero.

Objetivos específicos

- a. Determinar la compatibilidad *in vitro* e *in vivo* de cuatro bacterias y cuatro hongos endofíticos seleccionados para pruebas de biocontrol contra *R. similis*.
- b. Evaluar el efecto individual y combinado de los agentes biológicos en el biocontrol de *R. similis* en vitroplantas de banano del cultivar “Gran Enano” en invernadero.
- c. Evaluar el efecto individual y combinado de los agentes biológicos en la promoción de crecimiento de vitroplantas de banano del cultivar “Gran Enano” bajo condiciones de invernadero, en ausencia de *R. similis*.

III. Hipótesis

La combinación de bacterias y hongos endofíticos tiene un efecto aditivo de biocontrol contra el nematodo barrenador *R. similis* y promueve el crecimiento de las plantas en invernadero.

IV. Revisión de literatura

1. El cultivo del banano

El banano es el cuarto cultivo básico, después del arroz, maíz y trigo, con una producción que supera los 90 millones de toneladas al año. Aproximadamente, 13 millones de toneladas se destinan a la exportación anualmente, siendo una importante fuente de divisas en más de cien países productores en África, Asia, América Latina y el Caribe (FAO 2005, Gold y Dubois 2005). Aún cuando se conoce que el cultivo en África es más extensivo, no se contabiliza en el mercado internacional porque la producción es consumida por los propios agricultores, quienes además, venden sus cosechas en el mercado local (Sarah 1989). En América Tropical, aproximadamente el 15% de la producción está destinado al comercio internacional, del cual depende el sustento de varios millones de personas (Marín *et al.* 2002). Asimismo, algunos de los principales países consumidores de banano dedican su producción exclusivamente al auto consumo, siendo este alimento el que proporciona la mayor fuente de carbohidratos en muchas zonas rurales (Pereira *et al.* 1999).

Las variedades cultivadas son híbridos mejorados de las especies silvestres *Musa acuminata* (A) y *M. balbisiana* (B), de la familia Musaceae, nativas del Sureste de Asia. En general, los híbridos varían grandemente en tamaño de la planta y de los frutos, morfología de la planta, calidad del fruto y resistencia a plagas y enfermedades. Los que poseen una alta proporción de *M. acuminata* producen frutos dulces, en tanto los que poseen una alta proporción de *M. balbisiana* producen frutos con alto contenido de almidón. La producción de una determinada variedad dependerá del fruto y rendimiento deseado, la adaptación a las condiciones agroclimáticas de la zona y la incidencia de patógenos. La mayoría de los cultivares comerciales de banano (*Musa* AAA) pertenecen al subgrupo Cavendish desde los años 1960, cuando fue introducido el cultivar Valery, seleccionado por su resistencia al Mal de Panamá. Valery reemplazó al cultivar Gros Michel y fue luego reemplazado por el cultivar Gran Enano en la década de 1980, el cual es uno de los materiales más utilizados actualmente (Crane y Balerdi 1998, Marín *et al.* 2002).

2. Los nematodos

Los nematodos son organismos de forma alargada y redondeada, lisos, no segmentados, que miden de 0,30 a más de 5 mm de largo y tienen aspecto similar a una lombriz. Son los organismos multicelulares más abundantes en el suelo y han sido ampliamente conocidos y estudiados por muchos años. Más del 90% de los nematodos identificados son benéficos, incluso su diversidad y abundancia son un indicador de la salud y calidad de un suelo. Sin embargo, el 10% corresponde a especies fitoparásitas que representan un importante factor de reducción de rendimiento en la producción de muchos cultivos de importancia económica y para seguridad alimentaria alrededor del mundo. Muchas de las especies de fitonematodos son parásitos de las plantas, ya sea en las raíces, en los tallos, hojas, semillas, bulbos, o en rizomas y se alimentan de las células de las plantas al extraer su contenido por medio de un estilete (Taylor 1971, Yépez 1972). De acuerdo al modo de acción de las diferentes especies, los síntomas varían desde el más severo, que es el volcamiento de la planta, hasta los menos obvios como la prolongación de los ciclos de producción (Gowen y Quénéhervé 1990).

Cuadro 1. Clasificación de los nematodos según el daño que ocasionan en el hospedero

DAÑO	CLASIFICACIÓN
Producen agallas	<i>Meloidogyne</i> , <i>Nacobbus</i>
Producen quistes	<i>Heterodera</i> – <i>Globodera</i>
Lesiones en la raíz	<i>Pratylenchus</i>
Barrenadores de raíces y rizomas	<i>Radopholus</i>
Atacan el tallo	<i>Bursaphelenchus</i>
Atacan los bulbos	<i>Ditylenchus</i>
Foliares	<i>Aphelenchoides</i>
Atacan semillas	<i>Anguina</i>

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

Está ampliamente documentado que los nematodos fitoparásitos son la plaga más importante del cultivo de banano, y están distribuidos en casi todas las zonas productoras del mundo, con más de 100 especies asociadas con la destrucción de las raíces, generando pérdidas económicas de más del 20% anual (Yépez 1972, Pinochet 1986, Gowen y Quénéhervé 1990, Davide 1992). Rara vez se encuentra una sola especie de nematodo atacando el cultivo, por lo general interactúan poblaciones mixtas de varias especies de nematodos con diferentes hábitos de alimentación. En esta interacción, los endoparásitos migratorios tienden a suprimir a los nematodos sedentarios, y compiten entre ellos por fuentes de alimento y espacio. La dominancia de una especie en particular dependerá de la susceptibilidad del hospedero y de la agresividad y tasa de reproducción del nematodo, la cual está altamente influenciada por las condiciones agroecológicas (Sarah 1989, Gowen y Quénéhervé 1990, Pinochet 1996).

Las especies pertenecientes a los géneros *Radopholus*, *Pratylenchus*, *Helicotylenchus* y *Meloidogyne* son las que más afectan las plantaciones de banano, sin embargo *Radopholus similis* es la especie de mayor importancia en las regiones tropicales y subtropicales (Figura 1), especialmente en plantaciones comerciales del subgrupo Cavendish (Gowen 1979, Pinochet 1986, Hemeng 1993), con reducciones de 30 a 50% en el rendimiento en países como Costa Rica y Panamá, y de 10 a 20 % en Guatemala y Honduras (Davide 1992, Davide 1996, Sarah 1999, Jones 2000, Araya 2004). Es difícil estimar la pérdida económica real en fincas de pequeños productores. Sin embargo, Pinochet (1986) estimó pérdidas que fluctuaban entre 12 y 18% en Colombia, Costa Rica y Panamá, considerando únicamente el recuento de plantas desenraizadas. Gowen y Quénéhervé (1990) señalaron pérdidas en el Caribe que superaban el 60% en Puerto Rico y Jamaica.

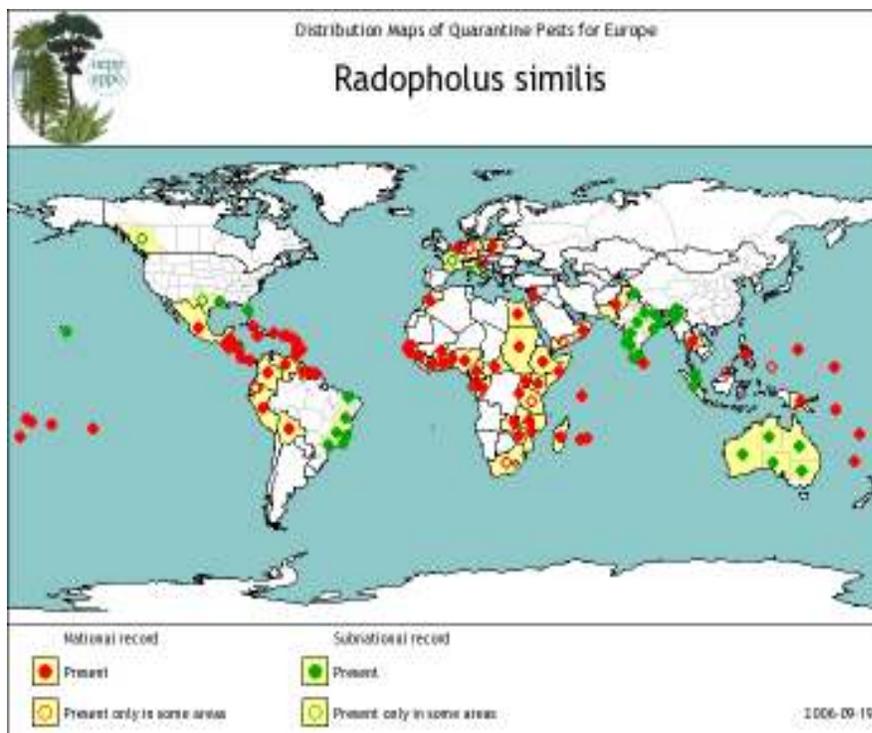


Figura 1. Distribución geográfica de *Radopholus similis*. Fuente: EPPO 2006.

4. Patogenicidad de *Radopholus similis* y su combate

El nematodo barrenador, *Radopholus similis*, es nativo del Sureste de Asia. Fue observado por primera vez por Cobb en los tejidos necróticos de las raíces de *Musa* sp. provenientes de Fiji en 1891 y desde entonces se ha encontrado disperso en las regiones tropicales y subtropicales donde se cultiva banano y plátano, con algunas excepciones como las Islas Canarias, Israel, Taiwán y el Este de África (Gowen y Quénéhervé 1990). Su distribución en plantaciones de banano, especialmente del subgrupo Cavendish, puede ser resultado de la reproducción de estos clones durante el periodo de cambio del cultivar Gros Michel, susceptible a *Fusarium*, en muchas partes del Oeste de África, el Caribe, América Central y América del Sur (Gowen 1993). *R. similis* es un endoparásito migratorio capaz de completar su ciclo de vida dentro de la raíz de las plantas en un periodo entre 20 y 25 días, por lo que debe afectarse primero a la planta para luego afectar al nematodo. La penetración ocurre principalmente cerca de la punta de la raíz, pero el nematodo puede desplazarse a través de ella desarrollándose, incluso, en los tejidos del corno produciendo una lesión típica color pardo rojizo (Figura 2). Las hembras adultas y todos los estados juveniles son infectivos. Los

machos no poseen el estilete y probablemente no son parasíticos. Las poblaciones de nematodos en las raíces pueden crecer rápidamente y decaer cuando la disponibilidad de alimento es limitante (Yépez 1972, Gowen 1979, Gowen y Quénéhervé 1990).



Figura 2. Necrosis en la corteza de la raíz causado por Radopholus similis. Fuente: American Samoa Community College 2004

Los fitonematodos provocan la necrosis y muerte de las raíces y de los tejidos del cormo así como limitan la capacidad de la planta de absorber agua y nutrientes del suelo, por lo que restringe su crecimiento y el peso del racimo. Esto puede aumentar considerablemente el periodo entre cosechas y disminuye la longevidad de la plantación. La planta presenta un aspecto raquítico y con frecuencia se cae debido a la destrucción de su sistema de anclaje y al peso del racimo, principalmente justo antes de la cosecha o en temporadas de fuertes vientos. Esto constituye la extrema expresión del daño en la producción de banano a gran escala orientada a los mercados de exportación en América Central, América del Sur, Oeste de África, Costa de Marfil y Australia (Blake 1966, Yépez 1972, Pinochet 1986, Gowen y Quénéhervé 1990, Gowen 1993, Pinochet 1996). Adicionalmente, el daño causado por el nematodo en el sistema radical puede favorecer la infección de la planta con hongos y bacterias fitopatógenos (Taylor 1971, Speijer y Gold 1996, Araya 2004). Por ejemplo, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Cylindrocarpon musae* y *Acremonium stromaticum* pueden ser aislados de lesiones causadas por diferentes nematodos endoparásitos migratorios, especialmente *R. similis*. Dado que son parte de la flora radical e invasores de las heridas de la raíz, no presentan daños en ausencia de nematodos. Se convierten en patógenos cuando hay heridas en la raíz (Pinochet 1996).

4.1 Control químico

Los productos químicos registrados para el control de nematodos resultan altamente tóxicos, de alto valor económico y requieren de personal capacitado para su aplicación (Pinochet 1986, Gowen y Quénéhervé 1990, Tabora *et al.* 2002, Araya 2004, Athman *et al.* 2006). Las nematicidas se usan en promedio dos veces al año a las dosis recomendadas por las casas comerciales. Tanto los carbamatos (Carbofuran y Oxamil) como los organofosforados (Terbufos, Ectoproth, Fenamiphos, Cadusafos) son inhibidores de las acetilcolinesterasas presentes en múltiples formas moleculares en la neuroanatomía del nematodo y dependiendo de la dosis y la concentración pueden actuar como nematotoxicos (matan los nematodos) o nematostáticos (inhiben su funcionamiento normal). En Costa Rica, nematicidas carbamatos y organofosforados son utilizados de forma rotacional en dos o tres aplicaciones al año (Marín 2003). El mayor efecto de estos productos es en la reproducción y no en la mortalidad de los nematodos, con una efectividad que fluctúa entre un 50 y 90%, grandemente afectada por las propiedades físico-químicas del suelo y las condiciones climáticas de la zona (Araya 2004).

Una de las principales limitantes del uso de los nematicidas es que su aplicación frecuente modifica la microflora y microfauna del suelo alterando las cadenas tróficas, eliminando los microorganismos antagonistas de los nematodos fitoparásitos (Araya 2004). Además, el uso indiscriminado de una determinada molécula generalmente resulta en pérdida de efectividad, debido a su biodegradación a metabolitos no tóxicos por la acción de hongos y bacterias del suelo (Moens *et al.* 2004). Otro aspecto importante es que para que el nematicida mate o inactive al nematodo debe haber contacto entre ellos, ya sea a través de la penetración de la cutícula o por ingestión durante la alimentación, por lo que no afecta a los nematodos al interior de la planta (Gowen 1979).

4.2 Control biológico e inducción de resistencia

Los fitonematodos coexisten en la rizosfera con gran diversidad de microorganismos, muchos de los cuales han sido aislados e identificados como antagonistas de los nematodos, ya que ejercen algún tipo de control biológico (Sikora 1992). Estos enemigos naturales de los nematodos pueden ser depredadores, que los matan y se los comen, como hongos y otros

nematodos, o parásitos que viven a expensas suyas causando su muerte paulatina, entre los que se pueden mencionar virus, protozoos, bacterias y hongos (Taylor 1971, Yépez 1972, Coosemans 1993, López 2004, Khan *et al.* 2006).

Se han identificado suelos supresivos a los fitonematodos, es decir, sistemas de producción en los cuales se mantiene un equilibrio entre las poblaciones de nematodos y sus enemigos naturales permitiendo la permanencia de cultivos susceptibles durante varios años sin presentar una reducción en su rendimiento (Cooke 1968, Kerry *et al.* 1982, Sikora 1992). Está completamente documentado que ciertas bacterias de la rizosfera, conocidas como rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR), producen compuestos que pueden afectar positivamente el crecimiento y desarrollo de las plantas, desde su germinación hasta la senescencia (Kloepper *et al.* 1999). Un gran número de rizobacterias han sido utilizadas como agentes de biocontrol en diversos cultivos y tienen gran potencial para el control de nematodos, especialmente las *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. Las rizobacterias generalmente colonizan las raíces promoviendo el crecimiento de las plantas y previenen el establecimiento de patógenos. Además, desencadenan una serie de reacciones de defensa en la planta hospedera (Kuc 1995, Shönbeck y Steiner 1997, Pieterse y van Loon 1999).

La resistencia sistémica inducida (ISR) es una respuesta de defensa de la planta ante la presencia y actividad de un agente biológico no patogénico, específico, que reduce la severidad o la incidencia de la enfermedad o daño causado por un patógeno que se encuentra espacialmente separado del agente inductor (Kloepper *et al.* 2004, Kloepper y Ryu 2006). La resistencia sistémica también puede ser inducida por sustancias químicas o por la presencia de patógenos, denominándose entonces resistencia sistémica adquirida (SAR). De acuerdo con Pieterse *et al.* (1998), las diferencias entre ISR y SAR son el agente inductor y los signos que presenta la planta. ISR es un fenómeno independiente del ácido salicílico, el etileno y el ácido jasmónico, y no produce la acumulación de proteínas relacionadas con la patogencidad (PR). Las proteínas PR son acumuladas en la SAR, inducida por patógenos y/o químicos. Además, SAR es dependiente del ácido salicílico (van Loon *et al.* 1998, Zhang *et al.* 2002a). En cultivos como tomate (Yan *et al.* 2002), pepino (Wei *et al.* 1991) y tabaco (Zhang *et al.* 2002b), se ha demostrado ISR contra diversas plagas y enfermedades a partir de la colonización de las raíces de las plantas por rizobacterias (PGPR) y microorganismos

endofíticos (Kloepper *et al.* 2004, Kloepper y Ryu 2006). Recientemente, Vu *et al.* (2006) demostraron la inducción de resistencia contra *Radopholus similis* en plantas de banano con la inoculación de aislamientos endofíticos de cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum* en pruebas de split-root system, con reducciones en la penetración de *R. similis* de hasta 45% en la parte no tratada de la planta.

5. Potencial antagonista de microorganismos endófitos (endofíticos)

La palabra endófito se deriva del griego *endon*, que significa dentro y *phyte* que significa planta. De Barry fue el primero en utilizar este término, en el año 1866, al referirse a hongos viviendo dentro de los tejidos de una planta (Petrini 1986). A través de los años, diferentes autores han propuesto definiciones más complejas, coincidiendo en que la naturaleza endofítica permite colonizar tejidos internos de plantas sin producir signos visibles de enfermedad (Petrini 1991, Hallmann *et al.* 1997, Schulz y Boyle 2006). Se documenta, además, el potencial de estos organismos como agentes controladores de patógenos (Carrol 1988). Este fenómeno de biocontrol se presenta debido a que los endofíticos pueden establecer una relación mutualista con la planta desde su interior, mediante la cual le confieren protección contra factores bióticos y abióticos adversos (Carrol 1990, Schulz y Boyle 2006).

Para considerar un microorganismo endofítico como potencial agente de biocontrol se requieren ciertas características. En primer lugar, que no sea patógeno de plantas, hombres o animales. Debe tener una elevada capacidad de colonización y reproducción en los tejidos internos después de su inoculación en las plantas, ya que una población que declina rápidamente tiene una baja capacidad competitiva con la microflora presente en la planta (Schippers *et al.* 1987, Weller 1988, Lugtenberg y Dekkers 1999). Además, que tenga capacidad de reducir o suprimir eficientemente la población de nematodos por debajo del nivel crítico. También es muy importante que tenga la capacidad de reproducirse abundantemente en condiciones *in vitro* para asegurar su reproducción y conservación a nivel comercial; además, debe ser de fácil aplicación (Cook 1993, Hernández y Escalona 2003).

Investigaciones realizadas durante los últimos diez años en el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Costa Rica, han demostrado que poblaciones endofíticas de bacterias y hongos presentes en el tejido interno de raíces de banano y plátano pueden ser utilizadas como agentes biológicos de control de fitonematodos (Pocasangre *et al.* 2004, Nuñez 2006).

6. Bacterias endofíticas (BE)

Las bacterias endofíticas forman parte de la gran cantidad de bacterias benéficas presentes en la rizosfera, que favorecen el crecimiento y desarrollo de las plantas y las protegen contra otros organismos del suelo que causan enfermedades (Weller 1988, Hallmann *et al.* 1997). Ecológicamente, a esta relación benéfica entre las bacterias y las plantas se le denomina “mutualismo”, el cual se define como la condición en la que dos seres vivos de diversas especies viven juntos habitualmente, aunque no necesariamente, con beneficio recíproco para el hospedero y para el simbiote. La mayoría de estas asociaciones ocurre a nivel de la rizosfera; que es toda aquella porción de suelo que está fuertemente influenciada por las raíces de las plantas. La aplicación de este tipo de rizobacterias en diversos cultivos ha dado como resultado la promoción evidente del crecimiento de las plantas, observándose un incremento en la emergencia, vigor, producción de biomasa y desarrollo del sistema radical (Kloepper *et al.* 1999).

La promoción de crecimiento en las plantas inoculadas con rizobacterias ocurre por varios factores; uno de ellos es la síntesis de ciertas sustancias reguladoras de crecimiento, como giberelinas, citocininas y auxinas, las cuales estimulan la densidad y longitud de los pelos radicales, aumentando así la cantidad de raíces en las plantas. Esto favorece la capacidad de absorción de agua y nutrientes, permitiendo que las plantas sean más vigorosas, productivas y tolerantes a condiciones climáticas adversas (Lugtenberg y Dekkers 1999, Hernández y Escalona 2003, Vessey 2003, Berg y Hallmann 2006). Los mecanismos involucrados en este proceso incluyen la fijación de nitrógeno, solubilización del fósforo y la producción de fitohormonas (Kloepper *et al.* 1991). Por ejemplo, las *Pseudomonas* spp. al solubilizar algunos elementos poco móviles del suelo, como el fósforo, mejoran el ingreso de este macronutriente hacia la planta, lo que se traduce en una mayor producción de biomasa.

Otras especies, como *Rhizobium* sp. y *Bradyrhizobium* sp., aumentan el aporte de nitrógeno, influyendo directamente en el crecimiento, desarrollo y rendimiento. Además, ciertos metabolitos secundarios, que funcionan como antagonistas de microorganismos perjudiciales, permiten que las plantas se desarrollen en un ambiente idóneo libre de patógenos (Thomashow y Weller 1996, Lugtenberg y Dekkers 1999, Berg y Hallmann 2006).

Estas rizobacterias, que pertenecen mayormente al grupo de *Pseudomonas* y *Bacillus*, son antagonistas de importantes patógenos de la raíz en muchos cultivos de importancia económica (Schroth y Hancock 1982, Hallmann y Berg 2006). Bajo condiciones de invernadero, su aplicación ha generado prometedores resultados en vegetales, frutas y plantas ornamentales. Por otra parte, poblaciones endofíticas, tanto de *Pseudomonas* como de *Bacillus*, aisladas de tejidos internos de banano, han evidenciado un gran potencial como agentes biológicos de control de *Radopholus similis* en condiciones de invernadero (Nuñez 2006). En cuanto a condiciones de campo, algunos aislamientos han demostrado eficacia y consistencia como agentes de biocontrol y actualmente se reproducen a nivel comercial, especialmente *Bacillus* (Mena *et al.* 2003, Hass y Défago 2005).

6.1 *Bacillus* spp.

El género *Bacillus* incluye una importante variedad de especies Gram-positivas, no patogénicas, con propiedades antagonistas. Son buenas secretoras de proteínas y metabolitos, fáciles de cultivar y altamente eficientes para el control de plagas y enfermedades (Berg y Hallmann 2006). Los mecanismos de acción de *Bacillus* spp. incluyen competencia por espacio y nutrientes (Handelsmann y Stabb 1996), antibiosis (Loeffler *et al.* 1986) e inducción de resistencia (Kloepper y Ryu 2006). Además, tienen comprobado efecto en la promoción de crecimiento de las plantas (Kloepper *et al.* 2004). La capacidad de *Bacillus* spp. de formar esporas que sobreviven y permanecen metabolitamente activas bajo condiciones adversas (Rodgers 1989), las hace apropiadas para la formulación de productos viables y estables para el control biológico. *B. subtilis* es uno de los más eficientes agentes de biocontrol, el cual exhibe actividad antagonista contra varios hongos y bacterias patogénicos. Este antagonismo se ha atribuido a la producción de antibióticos y a la capacidad de

colonización en la planta (Loeffler *et al.* 1986, McKeen *et al.* 1986, Bochow y Gantcheva 1995).

Otros productos comercialmente disponibles son: a) *Bacillus subtilis* cepas GB03 y MBI 600, ampliamente utilizadas para el biocontrol de *Rhizoctonia*, *Fusarium*, *Alternaria* y *Aspergillus* spp. b) *Bacillus cereus* BP01, utilizada para la promoción de crecimiento en el cultivo de algodón y c) *Bacillus licheniformis* cepa SB3086, antagonista de gran cantidad de hongos fitopatógenos (Haas y Défago 2005, EPA 2007). En Cuba, la determinación de la actividad nematocida de *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* cepa LBT-3 y su posterior extensión a las áreas agrícolas, fundamentalmente en plátano y banano, ha constituido una importante alternativa de control biológico contra *R. similis* y *M. incognita* (Fernández *et al.* 2003), permitiendo un significativo ahorro de divisas al disminuir las importaciones de plaguicidas, además de incidir en la protección del medio ambiente. El empleo de la cepa LBT-3 como nematocida biológico ha sido introducido en la práctica productiva, fundamentalmente en la provincia de Camagüey, donde se trataron con este nematocida biológico entre 1997 y el año 2001, un total de 6.790 hectáreas de plátano y banano (Mena *et al.* 2003).

6.2 *Pseudomonas* spp.

Las rizobacterias del género *Pseudomonas* han sido estudiadas como importantes agentes de biocontrol por su capacidad de inhibir el crecimiento de ciertos patógenos, como bacterias, hongos, nematodos y virus, mismos que podrían llegar a reducir considerablemente las cosechas en los cultivos establecidos tanto en invernadero como en campo. Estos organismos ejercen ciertos mecanismos de acción antagonista que involucran la producción de compuestos bacterianos, como sideróforos, ácido cianhídrico (HCN) y antibióticos (Loper 1988, Hamdan *et al.* 1991, Mazzola *et al.* 1992, Thomashow y Weller 1995, Haas y Défago 2005, Berg y Hallmann 2006). Además, se ha comprobado que en algunos casos inducen un sistema de resistencia en las plantas que hace que puedan tolerar el ataque de diversos patógenos del suelo (Weller y Cooke 1983, Kloepper y Ryu 2006).

Con relación a la producción de antibióticos, *P. fluorescens* y *P. putida* tienen la capacidad de sintetizar algunos compuestos que causan la muerte de aquellos microorganismos que entren

en contacto con ellas (Hamdan *et al.* 1991). Los sideróforos son producidos por muchos microorganismos para capturar hierro en la rizosfera en condiciones limitantes de este elemento y le dan a *Pseudomonas* la capacidad de tener actividad fungistática y bacteriostática cuando el hierro es bajo (Loper 1988, Haas y Défago 2005). *P. putida* produce pseudobactina la cual es un tipo de sideróforo que incrementa el antagonismo de *F. oxysporum* no patogénico contra el *F. oxysporum* patogénico, ya que hace a esta raza patogénica más sensitiva a la competencia por glucosa (Alabouvette y Couteaudier 1992).

En cuanto al control de nematodos, cepas de *Pseudomonas fluorescens* y *P. putida* han demostrado actividad antagonista contra *Radopholus similis* y *Meloidogyne* spp. en banano, maíz y tomate (Becker *et al.* 1988, Aalten *et al.* 1998). Un aislamiento endofítico de *P. aeruginosa* produjo compuestos tóxicos *in vitro* que resultó en alta mortalidad de los estadios juveniles de *M. javanica* (Siddiqui y Ehteshamul-Haque 2001). Asimismo, el compuesto 2,4-diacetylpholoroglucinol producido por *P. fluorescens* redujo la eclosión de huevos de *M. javanica* (Siddiqui y Shaukat 2003). Nuñez (2006) encontró que aislamientos endofíticos de *Pseudomonas* spp. redujeron significativamente la población de *R. similis* en plantas de banano bajo condiciones de invernadero, en comparación con plantas no tratadas.

7. Hongos endofíticos (HE)

Está ampliamente documentado que existen relaciones simbióticas entre hongos endofíticos y una amplia variedad de plantas. La colonización de HE puede generar beneficios para la planta hospedera, incluyendo la actividad antagonista y la inducción de resistencia contra patógenos, así como la promoción de crecimiento mediante la secreción de fitohormonas y la movilización de nutrientes de la rizosfera hacia la planta (Harman *et al.* 2004, Schulz 2006). Según investigaciones recientes sobre poblaciones de HE presentes en tejidos internos de raíces de banano y plátano, se ha determinado que *Trichoderma* y *Fusarium* son los géneros más abundantes y tienen un alto potencial como antagonistas de los nematodos. Se han encontrado reducciones de hasta un 90% en la población final de *R. similis* en el sistema radical de plantas de banano protegidas con HE de los géneros *Fusarium* y *Trichoderma*. Además, se ha evidenciado un incremento en el peso y longitud radical, y en el peso foliar de dichas plantas, en comparación con plantas no protegidas (Pocasangre *et al.* 2004).

7.1 *Trichoderma* spp.

Por su versatilidad, adaptabilidad y fácil manipulación, los hongos del género *Trichoderma* han sido estudiados y utilizados como fungicidas biológicos en la agricultura, además, son conocidos como estimuladores de crecimiento en las plantas. *Trichoderma* spp. es un hongo anaeróbico facultativo, perteneciente a los Deuteromycetes, caracterizados por no presentar un estado sexual determinado. Se encuentra distribuido a nivel mundial en un amplio rango de zonas de vida y hábitat, especialmente en aquellos donde se encuentra un alto contenido de materia orgánica o desechos vegetales en descomposición. Crece rápido, esporula abundantemente y presenta gran habilidad para colonizar rápidamente las raíces de las plantas. Además, ha desarrollado mecanismos para atacar y parasitar a otros organismos (Howell 2003, Harman *et al.* 2004, López 2004).

Trichoderma spp. produce tres tipos de propágulo: hifas, clamidosporas y conidios, estas son activas contra fitopatógenos en diferentes fases del ciclo del vida, desde la germinación de esporas hasta la esporulación. Los mecanismos de acción utilizados para desplazar al fitopatógeno son básicamente los siguientes: micoparasitismo, antibiósisis y competencia directa por espacio y nutrientes (Harman *et al.* 2004, Lu *et al.* 2004, Chet *et al.* 2006). En el caso particular de control de fitonematodos, *Trichoderma* exhibe la capacidad de envolver al nematodo en micelio, y produce metabolitos que actúan como nematocidas, tales como Trichodermin, Suzukacilina, Alameticina, Dermadina, entre otros. Además, frecuentemente, las raíces colonizadas por *Trichoderma* spp. presentan mejor crecimiento y peso radical que las plantas no tratadas, incrementando la productividad del cultivo y su resistencia a factores bióticos y abióticos adversos (Rey *et al.* 2000, Howell 2003, Pocasangre *et al.* 2004).



Figura 3. *Trichoderma atroviride* aislado del tejido interno de raíces de banano (*Musa AAA*)

7.2 *Fusarium spp.*

Las cepas patogénicas y no patogénicas de *Fusarium* son comunes en todo tipo de suelos. Las cepas no patogénicas viven saprofiticamente, aunque pueden colonizar la superficie de las raíces de las plantas sin inducir síntomas de daño, incluso pueden penetrar en el interior de las raíces y generar reacciones de defensa en la planta (Bacon y Yates 2006, Vu *et al.* 2006). Su crecimiento se caracteriza por la producción de tres tipos de esporas: micronidias, macronidias y clamidosporas, estas últimas tienen paredes muy gruesas, lo cual las hace muy resistentes a condiciones ambientales desfavorables (Olivain *et al.* 2003).

Cepas no patogénicas de *F. oxysporum* han sido ampliamente documentadas como antagonistas de los nematodos fitoparásitos. Se ha observado que ciertos metabolitos producidos por esta especie provocan la muerte de los nematodos en diversos cultivos (Crump 1987, Quadri y Saleh 1990). En tomate, por ejemplo, Hallmann y Sikora (1994) encontraron que raíces colonizadas por cepas endofíticas no patogénicas de *F. oxysporum* presentaron una reducción del 50% en el ataque de *Meloidogyne incognita* debido a la producción de metabolitos secundarios tóxicos para el nematodo. En plantas de banano se han encontrado cepas no patogénicas de *F. oxysporum* como endofíticos naturales y han sido detectados en el sistema radical de diferentes cultivares en varios países, algunas de ellas ya han demostrado su habilidad de afectar positivamente la salud y productividad de las plantas. Asimismo, se ha demostrado la actividad antagonista de los aislamientos endofíticos contra poblaciones de *R. similis* provocando parálisis y muerte del nematodo tanto en pruebas *in vitro* como *in vivo* (Hallmann y Sikora 1996, Harman *et al.* 2004, Pocasangre *et al.* 2004, Athman *et al.* 2006).



Figura 4. *Fusarium oxysporum* aislado del tejido interno de raíces de banano (*Musa AAA*)

8. Referencias bibliográficas

- Aalten, PM; Vitour, D; Blanvillain, D; Gowen, SR; Sutra, L. 1998. Effect of rhizosphere fluorescent *Pseudomonas* strains on plant-parasitic nematodes *Radopholus similis* and *Meloidogyne* spp. Letters in Applied Microbiology 27:357-361.
- Alabouvette, C; Couteaudier, Y. 1992. Biological control of *Fusarium* wilts with nonpathogenic fusaria. In Tjamos, EC; Papavizas, GC; Cook, R. eds. Biological control of plant diseases: progress and challenges for the future. New York, Plenum Press. p. 415-426.
- American Samoa Community College. 2004. Banana nematodes (en línea). Pest and diseases of American Samoa No. 9. Consultado 27 nov. 2006. Disponible en www.ctahr.hawaii.edu/adap2/ascc_landgrant/Dr_Brooks/BrochureNo9.pdf.
- Araya, M. 2004. Situación actual del manejo de nematodos en banano (*Musa* AAA) y plátano (*Musa* AAB) en el trópico americano. In Rivas, G; Rosales, FE. eds. Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de las musáceas en los trópicos. Actas del taller “Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de las musáceas” celebrado en Guayaquil, Ecuador. 11-13 de agosto, 2003. Montpellier, FR. INIBAP. p. 79-102.
- Athman, SY; Dubois, T; Viljoen, A; Labuschagne, N; Coyne, D; Ragama, P; Gold, CS; Niere, B. 2006. *In vitro* antagonism of endophytic *Fusarium oxysporum* isolates against the burrowing nematode *Radopholus similis*. Nematology 8(4):627-636.
- Bacon, CW; Yates, IE. 2006. Endophytic root colonization by *Fusarium* species: histology, plant interactions and toxicity. In Schulz, B; Boyle, C; Sieber, T. eds. Microbial root endophytes. Berlin-Heidelberg, DE, Springer-Verlag. p. 133-152. (Soil Biology Vol. 9).
- Becker, JO; Zavaleta-Mejia, E; Colbert, SF; Schroth, MN; Weinhold, AR; Hancock, JG; Van Gundy, SD. 1988. Effects of rhizobacteria on root-knot nematodes and gall formation. Phytopathology 78:1466-1469.
- Berg, G; Hallmann, J. 2006. Control of plant pathogenic fungi with bacteria endophytes. In Schulz, B; Boyle, C; Sieber, T. eds. Microbial root endophytes. Berlin-Heidelberg, DE, Springer-Verlag. p. 53-69. (Soil Biology Vol. 9).
- Blake, CD. 1966. The histological changes in banana roots caused by *Radopholus similis* and *Helicotylenchus multicinctus*. Nematológica 12:129-137.
- Bochow, H; Gantcheva, K. 1995. Soil introductions of *Bacillus subtilis* as biocontrol agent and its population and activity dynamic. Acta Horticulturae 382:164-172.

- Carrol, GC. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. *Ecology* 69(1):2-9.
- Carrol, GC. 1990. Fungal endophytes in vascular plants: Mycological research opportunities in Japan. *Transactions of the Mycological Society of Japan* 31:103-116.
- Chet, I; Viterbo, A; Brotman, Y; Lousky, T. 2006. Enhancement of plant disease resistance by the biocontrol agent *Trichoderma*. *Life Sciences*. Weizmann Institute of Science. p. 1-2.
- Cook, RJ. 1993. Making greater use of introduced microorganisms for biological control of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology* 31: 53-80.
- Cooke, R. 1968. Relationships between nematode-destroying fungi and soil-borne phytonematodes. *Phytopathology* 58:909-913.
- Coosemans, J. 1993. Possibilities for the biological control of nematodes, and their distribution in the soil of highland banana and plantain as a base for sampling. *In* Gold, CS; Gemmill, B. eds. *Biological and integrated control of highland banana and plantain pest and diseases*. Proceedings of a research coordination meeting. Cotonou, Benin, 12-14 November, 1991. p. 240-251.
- Crane, JH; Balerdi, CF. 1998. Los plátanos en Florida (en línea). Universidad de Florida. Consultado 20 oct. 2006. Disponible en <http://fruitscapes.ifas.ufl.edu>.
- Crump, DH. 1987. Effect of time sampling, method isolation and age of nematode on the species of fungi isolate from females of *Heterodera schachtii* and *H. avenae*. *Revue de Nématologie* 10:369-373.
- Davide, RG. 1992. Studies on chemical and biological control of banana nematodes. *In* Davide, RG. ed. *Studies on nematodes affecting bananas in the Philippines*. Los Baños, Philippine Agriculture and Resources Research Foundation, PH. p. 107-110.
- Davide, RG. 1996. Overview of nematodes as a limiting factor in *Musa* production. *In* Frison, EA; Horry, JP; De Waele, D. eds. *New frontiers in resistance breeding for nematode, Fusarium and Sigatoka*. Montpellier, FR, INIBAP. p. 27-31.
- Dochez, C; Speijer, PR; Hartman, J; Vuylsteke, D; De Waele, D. 2000. Cribado de híbridos de *Musa* para la resistencia a *Radopholus similis*. *INFOMUSA* 9(2):3-4.
- EPA (Environmental Protection Agency, US). 2007. Biopesticide ingredient and product lists (en línea). Consultado 16 nov, 2007. Disponible en http://www.epa.gov/pesticides/biopesticides/ingredients/index_ab.htm#b
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization, FR) 2006. Distribution maps of quarantine pests for Europe (en línea). Consultado 23 nov, 2006. Disponible en: http://www.eppo.org/QUARANTINE/nematodes/Radopholus_similis/RADOSI_map.htm

- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2005. Banano estadísticas 2005 (en línea). Consultado 10 Set. 2007. Disponible en <http://www.fao.org/es>
- Fernández, E; Mena, J; González, J; Márquez, ME. 2003. Biological control of nematodes in banana. *In* Turner, DW; Rosales, FE. eds. Banana root system: towards a better understanding for its productive management. Proceedings of an international symposium held in San José, Costa Rica, 3-5 November 2003. San José, CR, CORBANA. p. 193-200.
- Gold, CS; Dubois, T. 2005. Novel application methods for microbial control products: IITA's research against banana weevil and burrowing nematode. *Biocontrol News and Information* 26(3):86-89.
- Gowen, SR. 1979. Some consideration of problems associated with the nematode pests of bananas. *Nematropica* 9(1):79-91.
- Gowen, SR; Quénéhervé, P. 1990. Nematode parasites of bananas, plantains and abaca. *In* Luc, M; Sikora, RA; Bridge, J. eds. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Wallingford, UK, CAB International. p. 431-460.
- Gowen, SR. 1993. Yield losses caused by nematodes on different banana varieties and some management techniques appropriate for farmers in Africa. *In* Gold, CS; Gemmill, B. eds. Biological and integrated control of highland banana and plantain pest and diseases. Proceedings of a research coordination meeting. Cotonou, Benin, 12-14 November, 1991. p. 199-208.
- Hallmann, J; Sikora, RA. 1994. *In vitro* and *in vivo* control of *Meloidogyne incognita* with culture filtrates from nonpathogenic *Fusarium oxysporum* on tomato. *Journal of Nematology* 26(1):102.
- Hallmann, J; Sikora, RA. 1996. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 102:155-162.
- Hallmann, J; Quadt-Hallmann, A; Mahaffee, WF; Kloepper, JW. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Canadian Journal of Microbiology* 43:895-914.
- Hallmann, J; Berg, G. 2006. Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. *In* Schulz, B; Boyle, C; Sieber, T. eds. Microbial root endophytes. Berlin-Heidelberg, DE, Springer-Verlag. p. 15-32. (Soil Biology Vol. 9).
- Hamdan, H; Weller, DM; Thomashow, LS. 1991. Relative importance of fluorescent siderophores and other factors in biological control of *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by *Pseudomonas fluorescens* 2-79 and M4-80R. *Applied and Environmental Microbiology* 57:3270-3277.

- Handelsmann, J; Stabb, EV. 1996. Biocontrol of soilborne pathogens. *Plant Cell* 8:1855-1869.
- Harman, GE; Howell, CR; Viterbo, A; Chet, I; Lorito, M. 2004. *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nature Reviews Microbiology* 2:43-56.
- Hass, D; Défago, G. 2005. Biological control of soil-borne pathogens by fluorescent pseudomonads. *Nature Reviews Microbiology* 3(4):307-319.
- Hemeng, OB. 1993. Studies on parasitic nematodes associated with plantain. *In* Gold, CS; Gemmill, B. eds. Biological and integrated control of highland banana and plantain pest and diseases. Proceedings of a research coordination meeting. Cotonou, Benin, 12-14 November, 1991. p. 252-259.
- Hernández, LG; Escalona, MA. 2003. Microorganismos que benefician a las plantas: las bacterias PGPR (en línea). *La ciencia y el hombre. Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana* 16(1). Consultado 27 nov. 2006. Disponible en <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol16num1/articulos/microorganismos/micro.htm>
- Howell, CR. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87(1):4-10.
- Jones, DR. 2000. The genera *Musa* and *Ensete*. *In* Jones, DR. ed. Diseases of banana, abaca and enset. Wallingford, Oxon, UK, CAB International. p. 1-36.
- Kerry, BR; Crump, DH; Mullen, LA. 1982. Studies of the cereal cyst nematode, *Heterodera avenae*, under continuous cereals, 1974-1978. I. Plant growth and nematode multiplication. *Annals Of Applied Biology* 100:477-487.
- Khan, A; Williams, KL; Nevalainen, HK. 2006. Infection of plant-parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum*. *BioControl* 51:659-678.
- Kloepper, JW; Zablotowicz, RM; Tipping, EM; Lifshitz, R. 1991. Plant growth promotion mediated by bacterial rhizosphere colonizers. *In* Keister, DL; Cregan, PB. eds. The rhizosphere and plant growth. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. p. 310-330.
- Kloepper, JW; Rodríguez-Ubana, R; Zehnder, GW; Murphy, JF; Sikora, E; Fernández, C. 1999. Plant root-bacterial interactions in biological control of soilborne diseases and potential extension to systemic and foliar diseases. *Australasian Plant Pathology* 28:21-26.
- Kloepper, JW; Ryu, C-M; Zhang, S. 2004. Induced systemic resistance and promotion of plant growth by *Bacillus* spp. *Phytopathology* 94:1259-1266.

- Kloepper, JW; Ryu, C-M. 2006. Bacterial endophytes as elicitors of induced systemic resistance. *In* Schulz, B; Boyle, C; Sieber, T. eds. Microbial root endophytes. Berlin-Heidelberg, DE, Springer-Verlag. p. 33-52. (Soil Biology Vol. 9).
- Kuc, J. 1995. Induced systemic resistance. An overview. *In* Hammerschmidt, R; Kuc, J. eds. Induced resistance to disease in plants. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. p. 169-175.
- Loeffler, W; Tschen, SM; Vamittanakoon, N; Kugler, M; Knorpp, E; Hsieh, TF; Wu, TG. 1986. Antifungal effects of Bacilysin and Fengymycin from *Bacillus subtilis* F-29-3. A comparison with activities of other *Bacillus* antibiotics. *Journal of Phytopathology* 115:204-213.
- Loper, J. 1988. Role of fluorescent siderophore production in biological control of *Pythium ultimum* by a *Pseudomonas fluorescens* strain. *Phytopathology* 78:166-172.
- López, P. 2004. Control biológico de nematodos parásitos de plantas. *In* Control biológico de plagas agrícolas. Turrialba, CR, CATIE. p. 189-191. (Serie Técnica. Manual Técnico N° 53).
- Lu, Z; Tombolini, R; Woo, S; Zeilinger, S; Lorito, M; Jansson, JK. 2004. In vivo study of Trichoderma-pathogen-plant interactions, using constitutive and inducible green fluorescent protein reporter systems. *Applied and Environmental Microbiology* 70(5):1073-3081.
- Lugtenberg, BJ; Dekkers LC. 1999. What makes *Pseudomonas* bacteria rhizosphere competent? *Environmental Microbiology* 1(1):9-13.
- Marín, DH; Sutton, TB; Barker, KR. 2002. Diseminación del banano en Latinoamérica y el Caribe y su relación con la presencia de *Radopholus similis*. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* 66:62-75.
- Marín, DH. 2003. Research in progress and future perspectives on the root system management (abstract). *In* Turner, DW; Rosales, FE. eds. Banana root system: towards a better understanding for its productive management. Proceedings of an international symposium held in San José, Costa Rica, 3-5 November 2003. San José, CR, CORBANA. p. 23.
- Mazzola, M; Cook, RJ; Thomashow, LS; Weller, DM; Pierson, LS. 1992. Contribution of Phenazine antibiotic biosynthesis to the ecological competence of fluorescent pseudomonads in soil habitats. *Applied and Environmental Microbiology* 58(8):2616-2624.
- McKeen, CD; Reilly, CC; Pusey, PL. 1986. Production and partial characterization of antifungal substances antagonistic to *Monilinia fructicola* from *Bacillus subtilis*. *Phytopathology* 76:136-139.

- Mena, J; Pimentel, E; Veloz, L; Hernández, AT; León, L; Ramírez, Y; Sánchez, I; Mencho, JD; López, A; Pujol, M; Borroto, C; Ramos, E; Alvarez, JM; Marín, M; Jiménez, G; García, G; Pico, VM; Expósito, M; Coca, Y; Gómez, M; Olazabal, A; Hernández, A; Falcón, V; De la Rosa, M; Menéndez, I; Raíces, M. 2003. Aislamiento y determinación de cepas bacterianas con actividad nematocida. Mecanismo de acción de *C. paurometabolum* C-924 sobre nematodos. *Biotecnología Aplicada* 20(4):248-252.
- Moens, T; Araya, M; Swennen, R; De Waele, D. 2004. Biodegradación acelerada de nematocidas en *Musa*. In Rivas, G; Rosales, FE. eds. Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de las musáceas en los trópicos. Actas del taller “Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de las musáceas” celebrado en Guayaquil, Ecuador. 11-13 de agosto, 2003. INIBAP, Montpellier, FR. p. 105-117.
- Núñez, CT. 2006. Estudio de poblaciones de bacterias endofíticas de la rizosfera del banano para el bicontrol del nematodo barrenador *Radopholus similis*. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 62 p.
- Olivain, Ch; Trouvelot, S; Binet, MN; Cordier, Ch; Pugin, A; Alabouvette, C. 2003. Colonization of flax roots and early physiological responses of flax cells inoculated with pathogenic and nonpathogenic strains of *Fusarium oxysporum*. *Applied and Environmental Microbiology* 69(9):5453-5462.
- Pereira, JO; Carneiro Vierira, ML; Azevedo, JL. 1999. Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 15:37-40.
- Petrini, O. 1986. Taxonomy of endophytic fungi in aerial plant tissues. In Fokkema, NJ; van den Heuvel, J. eds. *Microbiology of the phyllosphere*. Cambridge, UK, Cambridge University. p. 175-187.
- Petrini, O. 1991. Fungal endophytes of tree leaves. In Andrews, J; Hirano, S. eds. *Microbial ecology of leaves*. Berlin Heidelberg, New York, Springer. p. 179-197.
- Pieterse, CMJ; van Wees, SCM; van Pelt, JA; Knoester, M; Laan, R; Gerrits, H; Weisbeek, PJ; van Loon, LC. 1998. A novel signaling pathway controlling induced systemic in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 10:1571-1580.
- Pieterse, CMJ; van Loon, LC. 1999. Salicylic acid-independent plant defense pathways. *Trends in Plant Science* 22:291-296.
- Pinochet, J. 1986. A note on nematode control practices on bananas in Central America. *Nematotica* 16(2):197-203.

- Pinochet, J. 1996. Review of past research on *Musa* Germplasm and nematode interactions. In Frison, EA; Horry, JP; De Waele, D. eds. New frontiers in resistance breeding for nematode, *Fusarium* and *Sigatoka*. Montpellier, FR, INIBAP. p. 32-43.
- Pocasangre, LE. 2002. Mejoramiento biológico de vitroplantas de banano mediante la utilización de hongos endofíticos para el control del nematodo barrenador *Radopholus similis*. In Riveros, AS; Pocasangre, LE; Rosales, FE. eds. Taller internacional sobre inducción de resistencia y uso de tecnologías limpias para el manejo de plagas en plantas. Turrialba (Costa Rica). 27-30 Ago 2002. p. 33-39.
- Pocasangre, LE; zum Felde, A; Cañizares, C; Riveros, AS; Rosales, FE; Sikora, R. 2004. Manejo alternativo de fitonematodos en banano y plátano. In Memorias, XVI reunión internacional de ACORBAT, Oaxaca, MX. p. 106-112.
- Quadri, AN; Saleh, HM. 1990. Fungi associated with *Heterodera schachtii* (Nematoda in Jordan, II). Effect on *H. schachtii* and *Meloidogyne javanica*. Nematologica 36:104-113.
- Rey, M; Delgado-Jarana, J; Rincón, AM; Limón, MC; Benítez, T. 2000. Mejora de cepas de *Trichoderma* para su empleo como biofungicidas. Revista Iberoamericana de Micología 17:S31-S36.
- Rodgers, PB. 1989. Potential of biological control organisms as a source of antifungal compounds for agrochemical and pharmaceutical product development. Pesticide Science 27:155-164.
- Sarah, JL. 1989. Banana nematodes and their control in Africa. Nematropica 9(2):199-216.
- Sarah, JL. 1999. Las prácticas culturales como medio de control de nematodos en el banano. In Rosales, FE; Tripon, SC; Cerna, J. eds. Producción de banano orgánico y, o, ambientalmente amigable. Memorias del taller internacional realizado en la EARTH, Guácimo, Costa Rica (27-29 de julio de 1998). Montpellier, FR, Red internacional para el mejoramiento del banano y plátano. p. 138-151.
- Schippers, B; Bakker, AW; Bakker, PAHM. 1987. Interactions of deleterious and beneficial rhizosphere microorganisms and the effect of cropping practices. Annual Review of Phytopathology 25:339-358.
- Schroth, MN; Hancock, JG. 1982. Disease-suppressive soil and root-colonizing bacteria. Science 216:1376-1381.
- Shönbeck, F; Steiner, U. 1997. Induced resistance. In Hartleb, H; Heitefuss, R; Hoppe, HH. eds. Resistance of crop plant against fungi. p. 272-297.
- Shulz, B. 2006. Mutualistic interactions with fungal root endophytes. In Schulz, B; Boyle, C; Sieber, T. eds. Microbial root endophytes. Berlin-Heidelberg, DE, Springer-Verlag. p. 261-279. (Soil Biology Vol. 9).

- Shulz, B; Boyle, C. 2006. What are endophytes? *In* Schulz, B; Boyle, C; Sieber, T. eds. Microbial root endophytes. Berlin-Heidelberg, DE, Springer-Verlag. p. 1-13. (Soil Biology Vol. 9).
- Siddiqui, IA; Ehteshamul-Haque, S. 2001. Suppression of the root rot-root knot disease complex by *Pseudomonas aeruginosa* in tomato: the influence of inoculum density, nematode populations, moisture and other plant-associated bacteria. *Plant Soil* 237:81-89.
- Siddiqui, IA; Shaikat, SS. 2003. Suppression of root-knot disease by *Pseudomonas fluorescens* CHA0 in tomato: importance of bacterial secondary metabolite, 2,4-diacetylphloroglucinol. *Soil Biology and Biochemistry* 35:1615-1623.
- Sikora, RA. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for biological control of plant parasitic nematodes. *Phytopathology* 30:245-270.
- Speijer, PR; Gold, CS. 1996. *Musa* root health assessment: a technique for the evaluation of *Musa* germplasm for nematode resistance. *In* Frison, EA; Horry, JP; De Waele, D. eds. New frontiers in resistance breeding for nematode, *Fusarium* and Sigatoka. Montpellier, FR, INIBAP. p. 62-78.
- Tabora, P; Okumoto, S; Elango, F. 2002. Organic and transition bananas: experience with effective microorganisms (EM). *In* Riveros, AS; Pocasangre, LE; Rosales, FE. eds. Taller internacional sobre inducción de resistencia y uso de tecnologías limpias para el manejo de plagas en plantas. Turrialba (Costa Rica). 27-30 Ago 2002. p. 33-39.
- Taylor, AL. 1971. Introducción a la nematología vegetal aplicada. Guía de la FAO para el estudio y combate de los nematodos parásitos de las plantas. Roma, IT, FAO. 131 p.
- Thomashow, LS; Weller, DM. 1996. Current concepts in the use of introduced bacteria for biological disease control: Mechanisms and antifungal metabolites. *In* Stacey, G; Keen, NT. eds. Plant-Microbe Interactions, Volume 1. New York, Chapman and Hall. p. 187-236.
- van Loon, LC; Bakker, PAHM; Pieterse, CMJ. 1998. Systemic resistance induced by rhizobacteria. *Annual Review of Phytopathology* 36:453-483.
- Vessey, KJ. 2003. Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant Soil* 255:571-586.
- Vu, T; Hauschild, R; Sikora, RA. 2006. *Fusarium oxysporum* endophytes induced systemic resistance against *Radopholus similis* on banana. *Nematology* 8(6):847-852.
- Wei, G; Kloepper, JW; Tuzun, S. 1991. Induction of systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum orbiculare* by select strains of plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 81:1508-1512.

- Weller, DM; Cooke, RJ. 1983. Suppression of take-all of wheat by seed-treatment with fluorescent pseudomonads. *Phytopathology* 73:463-469.
- Weller, DM. 1988. Biological control of soilborne plant pathogens in the rhizosphere with bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 26:379-407.
- Yan, Z; Reddy, MS; Ryu, C-M; McInroy, JA; Wilson, M; Kloepper, JW. 2002. Induced systemic resistance against tomato late blight elicited by plant growth-promoting rhizobacteria. *Phytopathology* 92:1329-1333.
- Yépez, G. 1972. Los nemátodos; enemigos de la agricultura. Maracay, VE, Universidad Central. 220 p.
- Zhang, S; Moyne, AL; Reddy, MS; Kloepper, JW. 2002a. The role of salicylic acid in induced systemic resistance elicited by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. *Biological Control* 25:288-296.
- Zhang, S; Reddy, MS; Kloepper, JW. 2002b. Development of assays for assessing induced systemic resistance by plant growth-promoting rhizobacteria against blue mold of tobacco. *Biological Control* 23:79-86.

V. Artículo 1.

Estudios sobre interacciones biológicas entre hongos y bacterias endofíticas y su patrón de colonización en plantas de banano del cultivar “Gran Enano” (*Musa AAA*)

1. Introducción

La efectividad de los microorganismos endofíticos como antagonistas de los fitonematodos ha sido ampliamente estudiada y comprobada en diversos cultivos. En el caso particular del cultivo de banano (*Musa AAA*), se ha demostrado que diferentes aislamientos endofíticos de hongos y bacterias tienen efecto antagonista contra *Radopholus similis* por diversos mecanismos de acción (Pocasangre 2004, Núñez 2006). Por lo tanto la aplicación combinada de estos agentes de biocontrol podría representar una estrategia viable que incremente el control del nematodo.

Existen casos documentados en los que las combinaciones de agentes biológicos no han tenido mejores resultados en el control de patógenos comparando con las aplicaciones individuales. Las interacciones positivas y/o negativas que ocurren entre los microorganismos de biocontrol, en inoculaciones múltiples, pueden afectar su comportamiento en la rizosfera y limitar su capacidad de colonización en el sistema radical. Se ha demostrado que existe una relación directamente proporcional entre la densidad poblacional del agente de biocontrol y la supresión del patógeno, por lo que se debe alcanzar un cierto nivel poblacional para que la supresión ocurra. Si en una combinación de agentes de biocontrol uno o ambos agentes no alcanzan el umbral poblacional, debido a algún tipo de antagonismo entre ellos, no se expresará el efecto de biocontrol esperado (de Boer 1999). Por lo tanto, es indispensable que los agentes de biocontrol seleccionados para inoculaciones múltiples, además de su potencial antagonista contra determinado patógeno, sean compatibles (Baker 1990).

El objetivo de este estudio fue evaluar las interacciones biológicas entre las bacterias y hongos endofíticos seleccionados y determinar si existe compatibilidad en el crecimiento *in vitro* de los agentes biológicos, así como su patrón de colonización en vitroplantas de banano.

2. Materiales y métodos

2.1 Localización del estudio

El trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de nematología y el invernadero de Musáceas del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), ubicado en el cantón de Turrialba de la provincia de Cartago, Costa Rica. Localizado a 9°52'' latitud norte y 83°38'' latitud oeste, a una altura de 602msnm, con un rango de temperatura que oscila entre los 22 y 28°C, con precipitación promedio anual de 2600mm y 87% de humedad relativa.

2.2 Material experimental

Dos cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum* recolectadas en Sixaola y Talamanca, Costa Rica, y dos de *Trichoderma atroviride*, provenientes de suelos supresivos de Guatemala y Costa Rica (zum Felde 2002, Cañizares 2003) fueron utilizados en este estudio. Asimismo, se seleccionaron dos bacterias del género *Bacillus* spp. (B21 y B31) y dos de *Pseudomonas* spp. (P52 y P58), provenientes de fincas comerciales de banano en la Zona Atlántica de Costa Rica (Núñez 2006). Estos aislamientos fueron identificados como antagonistas de *R. similis* en pruebas *in vitro* e *in vivo* realizadas en el laboratorio de fitopatología de CATIE en el periodo de enero 2002 a diciembre 2006 (Cañizares 2003, Meneses *et al.* 2003, Núñez 2006, zum Felde *et al.* 2006). La compatibilidad de los aislamientos fue evaluada en este estudio mediante la inoculación combinada hongo-bacteria y bacteria-bacteria *in vitro* e *in vivo* en el laboratorio de fitopatología y el invernadero de Musáceas de CATIE. Los estudios histológicos se llevaron a cabo en el laboratorio de histología del mismo centro de investigación.

Cuadro 2. Descripción de los tratamientos de suspensiones mixtas hongo-bacteria y bacteria-bacteria evaluados en las pruebas de compatibilidad in vitro e in vivo

Tratamiento	Código	Género
1	E3 B21	<i>F. oxysporum</i> (E3) / <i>Bacillus</i> spp. B21
2	E3 B31	<i>F. oxysporum</i> (E3) / <i>Bacillus</i> spp. B31
3	E3 P52	<i>F. oxysporum</i> (E3) / <i>Pseudomonas</i> spp. P52
4	E3 P58	<i>F. oxysporum</i> (E3) / <i>Pseudomonas</i> spp. P58
5	E4 B21	<i>F.oxysporum</i> (E4) / <i>Bacillus</i> spp. B21
6	E4 B31	<i>F.oxysporum</i> (E4) / <i>Bacillus</i> spp. B31
7	E4 P52	<i>F. oxysporum</i> (E4) / <i>Pseudomonas</i> spp. P52
8	E4 P58	<i>F. oxysporum</i> (E4) / <i>Pseudomonas</i> spp. P58
9	E1 B21	<i>T. atroviride</i> (E1) / <i>Bacillus</i> spp. B21
10	E1 B31	<i>T. atroviride</i> (E1) / <i>Bacillus</i> spp. B31
11	E1 P52	<i>T. atroviride</i> (E1) / <i>Pseudomonas</i> spp. P52
12	E1 P58	<i>T. atroviride</i> (E1) / <i>Pseudomonas</i> spp. P58
13	E2 B21	<i>T. atroviride</i> (E2) / <i>Bacillus</i> spp. B21
14	E2 B31	<i>T. atroviride</i> (E2) / <i>Bacillus</i> spp. B31
15	E2 P52	<i>T. atroviride</i> (E2) / <i>Pseudomonas</i> spp. P52
16	E2 P58	<i>T. atroviride</i> (E2) / <i>Pseudomonas</i> spp. P58
17	B21 B31	<i>Bacillus</i> spp. B21 / <i>Bacillus</i> spp. B31
18	B21 P52	<i>Bacillus</i> spp. B21 / <i>Pseudomonas</i> spp. P52
19	B21 P58	<i>Bacillus</i> spp. B21 / <i>Pseudomonas</i> spp. P58
20	B31 P52	<i>Bacillus</i> spp. B31 / <i>Pseudomonas</i> spp. P52
21	B31 P58	<i>Bacillus</i> spp. B31 / <i>Pseudomonas</i> spp. P58
22	P52 P58	<i>Pseudomonas</i> spp. P52 / <i>Pseudomonas</i> spp. P58
Testigo	TA	Testigo absoluto

2.3 Determinación de unidades formadoras de colonias (ufc) y potencial de inóculo

2.3.1 Preparación de bacterias endofíticas

Bacterias endofíticas cultivadas en Agar Nutritivo durante tres días fueron utilizadas para la obtención de una suspensión de células. Se agregaron 10ml de agua destilada al plato Petri que contenía el cultivo de bacteria y se hizo un raspado con un asa esterilizada para desprender las células; la suspensión obtenida fue filtrada en un beaker a través de una gasa esterilizada y se llevó a un volumen de 500ml con agua destilada. El recuento de ufc se

realizó utilizando un hematocímetro de Neubauer en un microscopio Olympus BH2 con aumento 40x (Figura 5).



Figura 5. Protocolo para el recuento de ufc y determinación del potencial de inóculo de las bacterias endofíticas

2.3.2 Preparación de hongos endofíticos

Cultivos de dos semanas de crecimiento en Agar Papa Dextrosa (PDA) al 100% fueron utilizados para la preparación de una suspensión de esporas. La determinación de ufc se realizó mediante el procedimiento descrito en el numeral 2.3.1 (Figura 6).



Figura 6. Protocolo para el recuento de ufc y determinación del potencial de inóculo de los hongos endofíticos

2.4 Prueba biológica *in vitro* para determinar la compatibilidad entre bacterias y hongos endofíticos

2.4.1 Cocultivo de bacterias y hongos endofíticos

Suspensiones individuales de bacterias y hongos endofíticos fueron obtenidas mediante el procedimiento descrito en los numerales 2.3.1 y 2.3.2 y fueron ajustadas a una concentración de 1×10^6 ufc/ml en condiciones asépticas. Posteriormente, se hicieron las combinaciones

hongo-bacteria y bacteria-bacteria en una relación 50:50 de acuerdo a cada uno de los tratamientos establecidos (Cuadro 2). Utilizando una micro pipeta calibrada se colocó 0.1 ml de la suspensión mixta en un plato Petri con PDA al 100% y se dispersó cuidadosamente por todo el plato utilizando una asa previamente esterilizada. Cada plato fue identificado y sellado con papel parafilm y almacenado en cámara oscura a 26°C. Se estableció un testigo absoluto y cinco repeticiones para cada tratamiento. La compatibilidad de los agentes biológicos se determinó evaluando la presencia o ausencia de cada microorganismo en los cocultivos en platos Petri. Las observaciones se realizaron cada 24 horas, durante siete días consecutivos.

2.5 Prueba biológica *in vivo* para determinar la compatibilidad entre bacterias y hongos endofíticos y su patrón de colonización en la planta

2.5.1 Protección de vitroplantas con agentes biológicos

Vitroplantas de banano del cultivar “Gran Enano” (AAA) de cuatro semanas de endurecimiento colectivo en invernadero fueron inoculadas con suspensiones mixtas de bacterias y hongos endofíticos para determinar el porcentaje de colonización en los órganos de la planta. La inoculación se realizó sumergiendo el sistema radical de las vitroplantas en una suspensión de 1×10^6 ufc/ml, de acuerdo a cada tratamiento, por 5 minutos. Posteriormente las plantas fueron sembradas en vasos plásticos de 250ml con una mezcla esterilizada de tierra y arena en una relación 1:1. La esterilización del sustrato se realizó en horno eléctrico a 300°C durante 8 horas. Se establecieron cinco repeticiones por tratamiento, colocando las plantas al azar, con espacio entre ellas para evitar contaminación durante el riego, y permanecieron en invernadero a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$ durante siete días.



Figura 7. Protocolo de inoculación de vitroplantas de banano con aislamientos endofíticos

2.5.2 Desinfección superficial de tejidos para evaluación de colonización

Siete días después de la inoculación con los agentes biológicos, las plantas fueron trasladadas al laboratorio de raíces del CATIE. Las raíces fueron lavadas y separadas del cormo mediante un bisturí, al igual que el pseudotallo. Posteriormente, se establecieron muestras compuestas a partir de las cinco plantas de cada tratamiento y se cortaron segmentos de aproximadamente 1cm. de los tejidos de raíz, cormo y pseudotallo. En condiciones asépticas, los segmentos de raíz fueron sumergidos en una solución de cloro al 2,5% por tres minutos con agitación constante, seguidamente se hicieron dos lavados con agua destilada estéril, tres minutos cada uno. Un total de veinte segmentos cortados transversalmente, fueron tomados al azar y cultivados en PDA 10%. El mismo procedimiento se realizó para los segmentos de cormos y de pseudotallos. El crecimiento de micelio de los hongos endofíticos y de las células de las bacterias endofíticas en cada uno de los segmentos fue evaluado diariamente durante siete días. El porcentaje de colonización fue calculado dividiendo la cantidad de segmentos colonizados entre el total de segmentos evaluados y el resultado obtenido se multiplicó por 100.



Figura 8. Protocolo de desinfección superficial de raíces, cormos y pseudotallos para prueba de colonización

2.6 Estudios histológicos

Los ocho tratamientos de suspensiones mixtas hongo-bacteria y bacteria-bacteria que presentaron mejor efecto en la disminución del porcentaje de penetración de *R. similis* (Art.2) fueron seleccionados para evaluar los patrones de colonización de los agentes biológicos en los tejidos internos del sistema radical (cuadro 3). Para esto se utilizaron vitroplantas de banano del cultivar “Gran Enano” (*Musa AAA*) de cuatro semanas de endurecimiento colectivo en invernadero, las cuales fueron inoculadas con las suspensiones mixtas mediante

el procedimiento descrito en el apartado 2.5.1 y sembradas en vasos plásticos de 250ml, con arena esterilizada. Siete días después, las plantas fueron trasladadas al laboratorio de raíces donde el sistema radical de cada planta fue lavado y separado del corno utilizando un bisturí. Las raíces fueron clasificadas en raíces de primer orden, de segundo orden y de tercer orden. Se tomaron secciones de cada muestra de aproximadamente 1cm. de largo y se colocaron en viales que contenían una solución fijadora FAA (Formaldehído al 40%, Alcohol etílico al 95%, Ácido acético glacial y agua) durante 48 horas. Posteriormente, las muestras fueron llevadas al laboratorio de histología de CATIE para su análisis.

Cuadro 3. Tratamientos seleccionados para estudios histológicos

Tratamiento	Código	Género
1	E3 B31	<i>F. oxysporum</i> / <i>Bacillus</i>
2	E3 P58	<i>F. oxysporum</i> / <i>Pseudomonas</i>
3	E4 B31	<i>F.oxysporum</i> / <i>Bacillus</i>
4	E4 P52	<i>F. oxysporum</i> / <i>Pseudomonas</i>
5	E4 P58	<i>F. oxysporum</i> / <i>Pseudomonas</i>
6	E1 B21	<i>T. atroviride</i> / <i>Bacillus</i>
7	E2 P58	<i>T. atroviride</i> / <i>Pseudomonas</i>
8	B21 P52	<i>Bacillus</i> / <i>Pseudomonas</i>
Testigo	TA	Testigo absoluto

2.6.1 Procesamiento de muestras

Las muestras fueron procesadas en el laboratorio de histología de CATIE. Después de 48 horas en FAA, las muestras fueron deshidratadas en una serie ascendente de concentración de etanol (50-70-80-90-95-100), durante una hora en cada concentración. Posteriormente, fueron colocadas por categoría en historesina a 4°C por 12 horas. Una vez endurecida la historesina, se formaron bloques y se procedió a realizar cortes de láminas de resina de 4 micras de grosor con un micrómetro rotatorio. Cada lámina fue colocada sobre portaobjetos y se hizo una tinción del tejido radical utilizando Toluidina azul al 1%. El crecimiento de los agentes biológicos en los tejidos internos de las raíces fue observado en un microscopio óptico Nikon Microphot FX (Figura 9).



Figura 9. Protocolo de procesamiento de muestras de tejido radical para estudios histológicos

2.7 Diseño experimental y análisis estadístico para pruebas de compatibilidad *in vivo*

La evaluación *in vivo* consistió en 16 inoculaciones combinadas hongo-bacteria y 6 inoculaciones combinadas bacteria-bacteria, con dos aislamientos pertenecientes al género *Fusarium* (E2, E3), dos aislamientos pertenecientes al género *Trichoderma* (E1, E2), dos bacterias del género *Bacillus* (B21, B31) y dos bacterias del género *Pseudomonas* (P52, P58) y un testigo absoluto, sin agentes de biocontrol. Se utilizó un Análisis de Varianza para un diseño completamente al azar para comparar los porcentajes de colonización de los agentes biológicos al séptimo día de la evaluación. El modelo estadístico para este arreglo de tratamientos se define matemáticamente de la siguiente manera:

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

- Y_{ij}** = variable a medir
- μ** = media general
- T_i** = efecto del i-ésimo tratamiento
- e_{ij}** = error experimental

Los datos fueron analizados mediante el programa estadístico INFOSTAT 2007.

3. Resultados

3.1 Determinación de unidades formadoras de colonias (ufc) y potencial de inóculo

Los resultados obtenidos en el recuento de ufc demuestran que las bacterias tienen mayor potencial de inóculo en comparación con los hongos. La cantidad de ufc/ml fue significativamente mayor en las bacterias que en los hongos ($p \leq 0,0001$).

Cuadro 4. Unidades formadoras de colonias (ufc) de las bacterias y hongos endofíticos evaluados

Código	Género	ufc/ml		Caracterización
B31	<i>Bacillus</i> spp. ²	4,50x10 ⁷	e	Translúcida, rugosa, brillante, bastón
P58	<i>Pseudomonas</i> spp. ²	1,48x10 ⁷	d	Blanca, translúcida, lisa, varilla
P52	<i>Pseudomonas</i> spp. ²	1,16x10 ⁷	c	Blanca, translúcida, lisa, varilla
B21	<i>Bacillus</i> spp. ²	6,30x10 ⁶	b	Blanca, rugosa, bastón
E1	<i>Trichoderma atroviride</i> ¹	5,86x10 ⁶	b	Redonda
E3	<i>Fusarium oxysporum</i> ¹	3,28x10 ⁶	a	Curvada
E2	<i>Trichoderma atroviride</i> ¹	2,72x10 ⁶	a	Redonda
E4	<i>Fusarium oxysporum</i> ¹	1,69x10 ⁶	a	Curvada

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

¹Contabilizado en cultivos de dos semanas de crecimiento en PDA 100%

²Contabilizado en cultivos de tres días de crecimiento en AN 100%

3.1.1 Descripción morfológica de las estructuras de los agentes biológicos en estudio

Las bacterias presentaron patrones de crecimiento muy similares entre ellas, excepto por B21 que exhibe un crecimiento particular que asemeja la producción de micelio, de color blanco y apariencia rugosa. Las colonias de P52 y P58 presentaron apariencia lisa y con una coloración blanquecina, translúcida. Por su parte, B31 exhibió un crecimiento amorfo, sin una coloración definida, translúcida y brillante (Figura 10).

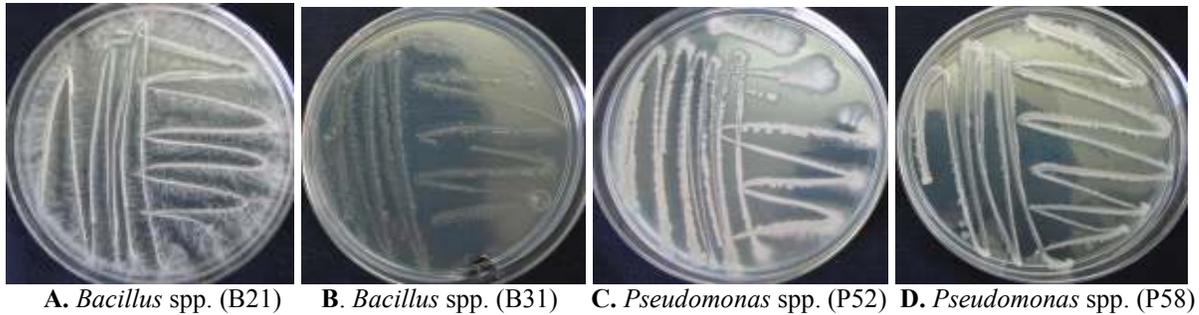


Figura 10. Crecimiento de bacterias endofíticas en Agar Nutritivo tres días después de cultivadas

Los hongos endofíticos presentaron variabilidad en la apariencia y coloración de las colonias entre géneros. Los aislamientos de *T. atroviride* presentaron coloración en tonos de verde y crecieron más rápidamente en comparación con las cepas no patogénicas de *F. oxysporum*. La superficie de la colonia fue granular, con desarrollo difuso que cubrió todo el plato. Por su parte, los aislamientos de *F. oxysporum* presentaron coloración en tonos violeta, crecimiento de micelio más lento y superficie con apariencia algodonosa (Figura 11).

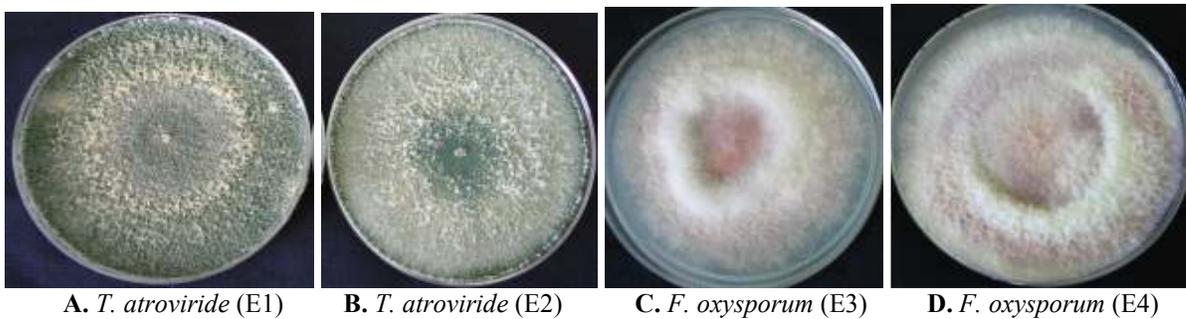


Figura 11. Crecimiento de hongos endofíticos en Agar Papa Dextrosa al 100% dos semanas después de cultivados

3.1.2 Descripción de las estructuras reproductivas de los agentes biológicos en estudio

Las colonias de bacterias pertenecientes al género *Bacillus* fueron diferentes entre ellas en forma, tamaño y en cantidad de ufc/ml. B21 presentó la forma de bastón, característica de su género más grande y menos abundante que B31. Por otra parte, la forma, tamaño y cantidad de ufc/ml fue muy similar entre los dos aislamientos del género *Pseudomonas*. Tanto P52 como P58 presentaron forma de varilla, más pequeñas y abundantes que la B21, pero semejantes a la B31.

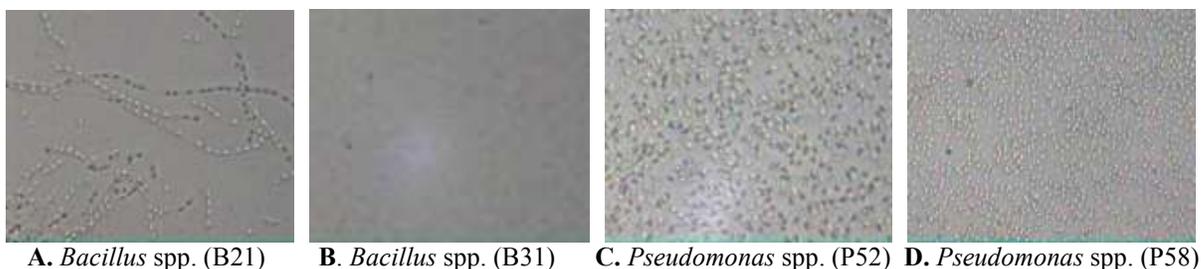


Figura 12. Colonias de bacterias endofíticas observadas a una resolución de 40x

Las estructuras reproductivas de los hongos endofíticos observadas fueron micelio, micro y macroconidias y clamidosporas, con características diferentes entre los géneros *Trichoderma* y *Fusarium* (Figura 13). Las conidias de *T. atroviride* presentaron forma redondeada, más pequeñas que las de *Fusarium*. Las macroconidias de *Fusarium* fueron curvadas, pluriseptadas con una célula apical más o menos puntiaguda; en tanto las microconidias presentaron forma redondeada. No se observaron diferencias en las estructuras reproductivas entre aislamientos del mismo género.

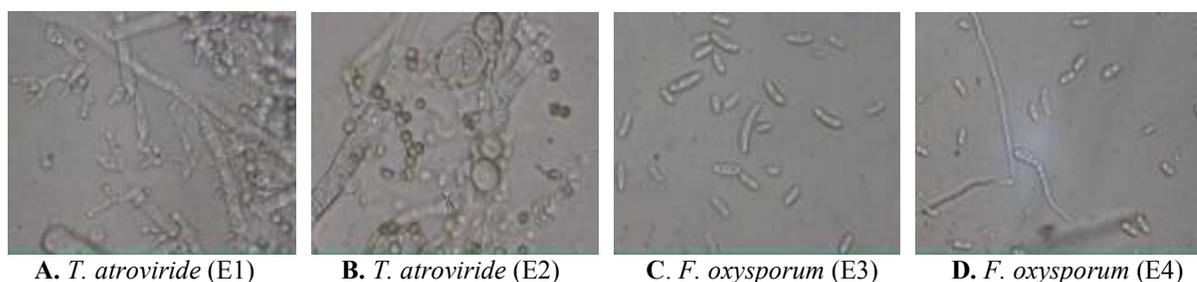


Figura 13. Estructuras reproductivas de los hongos endofíticos observadas a una resolución de 40x

3.2 Prueba biológica *in vitro* para determinar la compatibilidad entre bacterias y hongos endofíticos

En este bioensayo se evaluó la presencia o ausencia de los agentes biológicos cocultivados en platos Petri con PDA al 100%. Todos los tratamientos evaluados presentaron crecimiento de los dos organismos presentes en cada combinación. NO se presentó ningún caso de incompatibilidad (Figura 14).

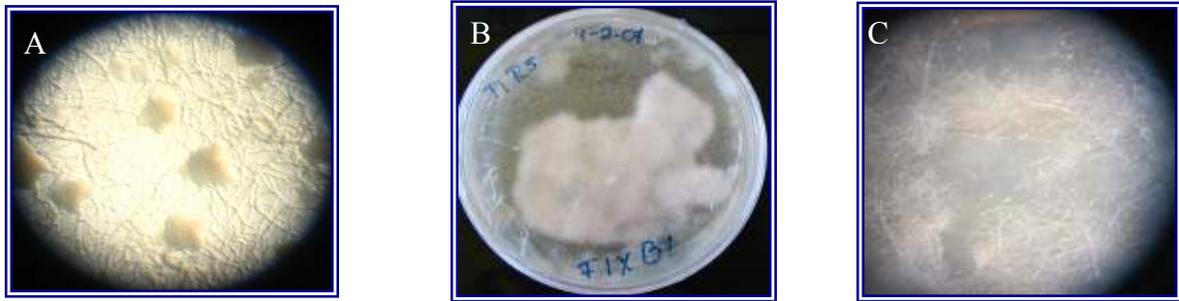


Figura 14. Compatibilidad *in vitro* entre bacterias y hongos endofíticos después de 72 horas de cocultivo. A, no hay incompatibilidad entre *Trichoderma atroviride* E1 y *Bacillus* spp. B31; B, no hay incompatibilidad entre *Fusarium oxysporum* E3 y *Bacillus* spp. B21; C, no hay incompatibilidad entre *Trichoderma atroviride* E1 y *Pseudomonas* spp. P52

3.3 Prueba biológica *in vivo* para determinar la compatibilidad entre bacterias y hongos endofíticos y su patrón de colonización en la planta

En este bioensayo se evaluó la colonización de los agentes biológicos en los tejidos internos de las plantas (raíz, cormo y pseudotallo). Todos los tratamientos evaluados presentaron colonización en todos los tejidos. NO se observaron casos de incompatibilidad.

En general, todos los agentes de biocontrol evaluados fueron muy eficientes en colonizar cormo, raíz, y pseudotallo (Cuadro 5). Los mayores porcentajes de colonización combinada de hongos y bacterias se encontraron en los cormos (90,31%), seguida de pseudotallos (55,94), y en menor grado en las raíces (55,78). En las suspensiones mixtas bacteria-bacteria, los mayores porcentajes de colonización se encontraron en los cormos (100%), raíces (91,67%) y en menor grado en los pseudotallos con 78,33%.

Cuadro 5. Colonización de bacterias y hongos endofíticos en los órganos de las vitroplantas

Sección	% de Colonización			
	HE	BE	H B	B B
Cormo	80,63 b	100,00 b	90,31 b	100,00 b
Raíz	22,50 a	89,06 a	55,78 a	91,67 ab
Pseudotallo	25,00 a	86,88 a	55,94 a	78,33 a

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

Considerando porcentajes de colonización promedio por planta, independientemente del órgano colonizado, en lo que corresponde a bacterias en inoculaciones combinadas hongo-bacteria, se encontró que todos los tratamientos presentaron valores superiores a 78%, incluso en 11 de los tratamientos se obtuvo porcentajes de colonización igual o superiores a 90% (Cuadro 6). Los 3 mejores tratamientos son aquellos en los que están presentes las bacterias del género *Pseudomonas* con 100% de colonización independientemente del hongo asociado, sin diferir estadísticamente del resto ($p \leq 0,8480$).

Cuadro 6. Porcentaje de colonización de suspensiones mixtas de bacterias y hongos endofíticos en tejidos internos de vitroplantas de banano cv. "Gran Enano" a los siete días de evaluación (énfasis en colonización de bacterias)

Trata	Código	Género	% de Colonización								
			Raíz		Cormo		Pseudotallo		Promedio		
			B	H	B	H	B	H	B	H	
3	E3P52	<i>F. oxysporum /Pseudomonas</i>	100	35	100	100	100	55	100,00	a	63,33
4	E3P58	<i>F. oxysporum /Pseudomonas</i>	100	10	100	85	100	60	100,00	a	51,67
11	E1P52	<i>T.atroviride /Pseudomonas</i>	100	0	100	90	100	25	100,00	a	38,33
10	E1B31	<i>T. atroviride /Bacillus</i>	100	15	100	100	95	30	98,33	a	48,33
6	E4B31	<i>F.oxysporum /Bacillus</i>	90	5	100	70	100	15	96,67	a	30,00
8	E4P58	<i>F. oxysporum /Pseudomonas</i>	100	15	100	25	85	0	95,00	a	13,33
9	E1B21	<i>T. atroviride /Bacillus</i>	85	90	100	85	100	45	95,00	a	73,33
16	E2P58	<i>T.atroviride /Pseudomonas</i>	100	30	100	85	85	10	95,00	a	41,67
12	E1P58	<i>T.atroviride /Pseudomonas</i>	85	40	100	100	95	70	93,33	a	70,00
7	E4P52	<i>F. oxysporum /Pseudomonas</i>	75	0	100	55	95	20	90,00	a	25,00
15	E2P52	<i>T.atroviride /Pseudomonas</i>	100	5	100	100	70	0	90,00	a	35,00
5	E4B21	<i>F.oxysporum /Bacillus</i>	70	5	100	55	90	20	86,67	a	26,67
2	E3B31	<i>F.oxysporum /Bacillus</i>	70	0	100	90	85	30	85,00	a	40,00
14	E2B31	<i>T. atroviride /Bacillus</i>	100	55	100	50	55	0	85,00	a	35,00
1	E3B21	<i>F.oxysporum /Bacillus</i>	50	0	100	100	100	20	83,33	a	40,00
13	E2B21	<i>T. atroviride /Bacillus</i>	100	55	100	100	35	0	78,33	a	51,67

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

En el caso de los hongos, el porcentaje de colonización fue mucho más bajo, encontrándose en un rango de 13 a 73% y sólo 5 tratamientos estuvieron por encima del 50% (Cuadro 7). Los mayores porcentajes de colonización de hongo se observan en dos combinaciones donde está presente *T. atroviride* con más de 70% de colonización independientemente de la bacteria asociada.

Cuadro 7. Porcentaje de colonización de suspensiones mixtas de bacterias y hongos endofíticos en tejidos internos de vitroplantas de banano cv. “Gran Enano” a los siete días de evaluación (énfasis en colonización de hongos)

Trata	Código	Género	% de Colonización							
			Raíz		Cormo		Pseudotallo		Promedio Planta	
			B	H	B	H	B	H	B	H
9	E1B21	<i>T. atroviride</i> / <i>Bacillus</i>	85	90	100	85	100	45	95,00	73,33 e
12	E1P58	<i>T. atroviride</i> / <i>Pseudomonas</i>	85	40	100	100	95	70	93,33	70,00 de
3	E3P52	<i>F. oxysporum</i> / <i>Pseudomonas</i>	100	35	100	100	100	55	100,00	63,33 cde
4	E3P58	<i>F. oxysporum</i> / <i>Pseudomonas</i>	100	10	100	85	100	60	100,00	51,67 bcde
13	E2B21	<i>T. atroviride</i> / <i>Bacillus</i>	100	55	100	100	35	0	78,33	51,67 bcde
10	E1B31	<i>T. atroviride</i> / <i>Bacillus</i>	100	15	100	100	95	30	98,33	48,33 abcde
16	E2P58	<i>T. atroviride</i> / <i>Pseudomonas</i>	100	30	100	85	85	10	95,00	41,67 abcde
1	E3B21	<i>F. oxysporum</i> / <i>Bacillus</i>	50	0	100	100	100	20	83,33	40,00 abcde
2	E3B31	<i>F. oxysporum</i> / <i>Bacillus</i>	70	0	100	90	85	30	85,00	40,00 abcde
11	E1P52	<i>T. atroviride</i> / <i>Pseudomonas</i>	100	0	100	90	100	25	100,00	38,33 abcde
14	E2B31	<i>T. atroviride</i> / <i>Bacillus</i>	100	55	100	50	55	0	85,00	35,00 abcd
15	E2P52	<i>T. atroviride</i> / <i>Pseudomonas</i>	100	5	100	100	70	0	90,00	35,00 abcd
6	E4B31	<i>F. oxysporum</i> / <i>Bacillus</i>	90	5	100	70	100	15	96,67	30,00 abc
5	E4B21	<i>F. oxysporum</i> / <i>Bacillus</i>	70	5	100	55	90	20	86,67	26,67 ab
7	E4P52	<i>F. oxysporum</i> / <i>Pseudomonas</i>	75	0	100	55	95	20	90,00	25,00 ab
8	E4P58	<i>F. oxysporum</i> / <i>Pseudomonas</i>	100	15	100	25	85	0	95,00	13,33 a

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

En cuanto a la colonización promedio de las combinaciones hongo-bacteria, todos los tratamientos estuvieron por encima del 50% (Cuadro 8). Para maximizar el porcentaje de colonización tanto de hongo como de bacteria dentro de las plantas de manera general (raíz, cormo y pseudotallo) los tratamientos más interesantes son: en primer lugar la combinación *Trichoderma atroviride* E1 y *Bacillus* spp. B21 con 84%, seguido de *Fusarium oxysporum* E3

y *Pseudomonas* spp. P52; y *Trichoderma atroviride* E1 con *Pseudomonas* spp. P58, las cuales también presentaron porcentajes de colonización superiores al 80%.

Cuadro 8. Porcentaje de colonización promedio de suspensiones mixtas de bacterias y hongos endofíticos en tejidos internos de vitroplantas de banano cv. “Gran Enano” a los siete días de evaluación

Trata	Código	Género	% de Colonización						Promedio H y B
			Raíz		Cormo		Pseudotallo		
			B	H	B	H	B	H	
9	E1B21	<i>T. atroviride</i> / <i>Bacillus</i>	85	90	100	85	100	45	84,17 b
3	E3P52	<i>F. oxysporum</i> / <i>Pseudomonas</i>	100	35	100	100	100	55	81,67 bde
12	E1P58	<i>T. atroviride</i> / <i>Pseudomonas</i>	85	40	100	100	95	70	81,67 bd
4	E3P58	<i>F. oxysporum</i> / <i>Pseudomonas</i>	100	10	100	85	100	60	75,83 bdef
10	E1B31	<i>T. atroviride</i> / <i>Bacillus</i>	100	15	100	100	95	30	73,33 bdef
11	E1P52	<i>T. atroviride</i> / <i>Pseudomonas</i>	100	0	100	90	100	25	69,17 aef
16	E2P58	<i>T. atroviride</i> / <i>Pseudomonas</i>	100	30	100	85	85	10	68,33 abcdef
13	E2B21	<i>T. atroviride</i> / <i>Bacillus</i>	100	55	100	100	35	0	65,00 c
6	E4B31	<i>F. oxysporum</i> / <i>Bacillus</i>	90	5	100	70	100	15	63,33 aef
2	E3B31	<i>F. oxysporum</i> / <i>Bacillus</i>	70	0	100	90	85	30	62,50 cdef
15	E2P52	<i>T. atroviride</i> / <i>Pseudomonas</i>	100	5	100	100	70	0	62,50 acdef
1	E3B21	<i>F. oxysporum</i> / <i>Bacillus</i>	50	0	100	100	100	20	61,67 cdef
14	E2B31	<i>T. atroviride</i> / <i>Bacillus</i>	100	55	100	50	55	0	60,00 bcdef
7	E4P52	<i>F. oxysporum</i> / <i>Pseudomonas</i>	75	0	100	55	95	20	57,50 acf
5	E4B21	<i>F. oxysporum</i> / <i>Bacillus</i>	70	5	100	55	90	20	56,67 acf
8	E4P58	<i>F. oxysporum</i> / <i>Pseudomonas</i>	100	15	100	25	85	0	54,17 a

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

La velocidad de crecimiento de las bacterias fue evidentemente mayor con respecto a los hongos. En 14 de los 16 tratamientos de inoculación combinada hongo-bacteria, las bacterias presentaron porcentajes de colonización superiores al 50% en las primeras 48 horas de evaluación (Figura 15). Para el día 5, las bacterias en el 87,5% de los tratamientos (14 de 16) habían alcanzado valores de colonización entre 80% y 100%.

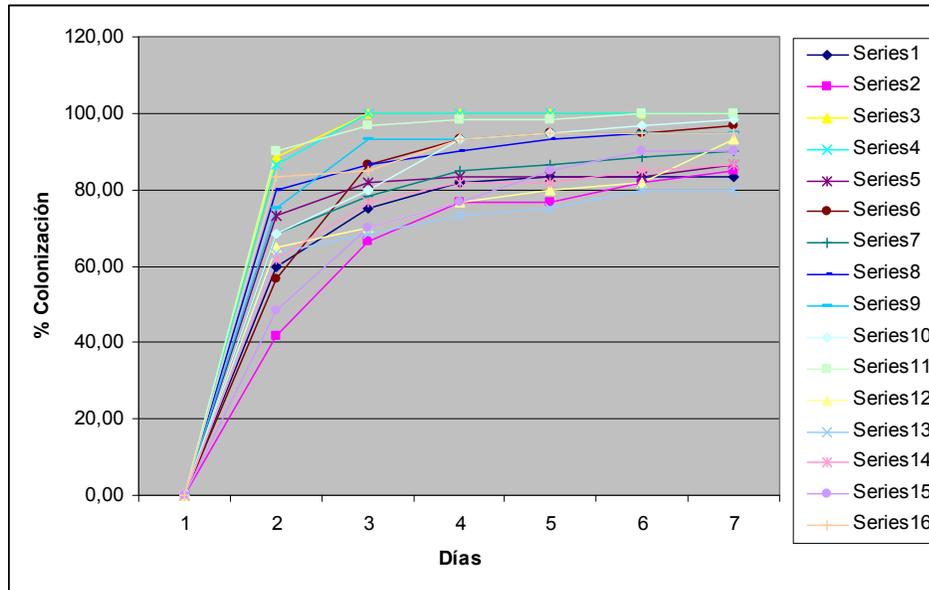


Figura 15. Porcentaje de colonización de bacterias endofíticas en los tratamientos de suspensiones mixtas hongo-bacteria evaluado en vitroplantas de banano cv. “Gran Enano”

En el caso de los hongos, fue necesario esperar hasta siete días para observar porcentajes de colonización superiores al 30% en por lo menos el 50% de los tratamientos (Figura 16).

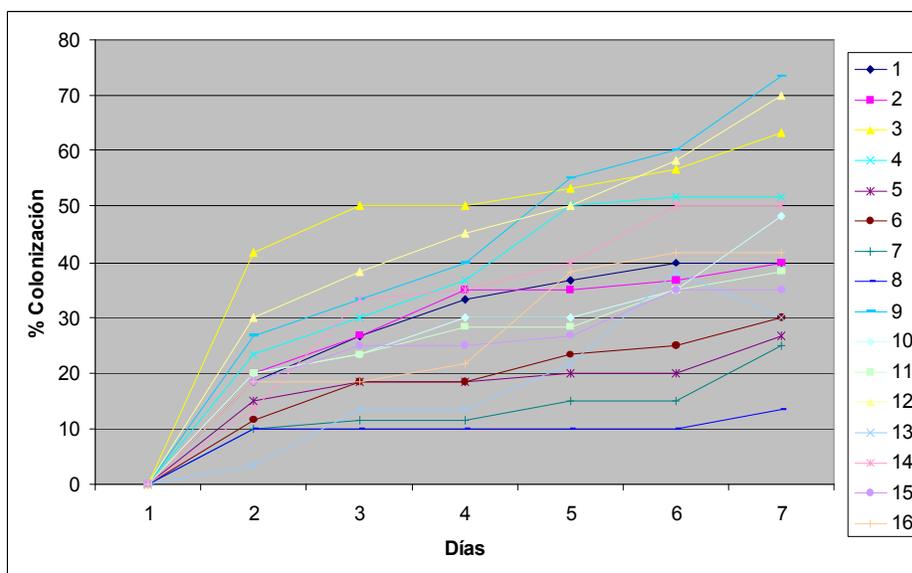


Figura 16. Porcentaje de colonización de hongos endofíticos en los tratamientos de suspensiones mixtas hongo-bacteria evaluado en vitroplantas de banano cv. “Gran Enano”

Los seis tratamientos correspondientes a inoculaciones combinadas bacteria-bacteria, presentaron porcentajes de colonización superiores al 68%. Todas las combinaciones de *Bacillus* spp. con *Pseudomonas* spp. estuvieron por encima del 80% (Cuadro 9).

Cuadro 9. Porcentaje de colonización de suspensiones mixtas de bacterias en los tejidos internos de vitroplantas de banano cv. “Gran Enano” a los siete días de evaluación

Trata	Código	Género	% de Colonización			
			Raíz	Cormo	Tallo	Promedio
18	B21P52	<i>Bacillus</i> / <i>Pseudomonas</i>	100	100	100	100,00 b
17	B21B31	<i>Bacillus</i> / <i>Bacillus</i>	100	100	95	98,33 b
21	B31P58	<i>Bacillus</i> / <i>Pseudomonas</i>	100	100	95	98,33 b
19	B21P58	<i>Bacillus</i> / <i>Pseudomonas</i>	100	100	75	91,67 b
20	B31P52	<i>Bacillus</i> / <i>Pseudomonas</i>	65	100	85	83,33 ab
22	P52P58	<i>Pseudomonas</i> / <i>Pseudomonas</i>	85	100	20	68,33 a

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

3.4 Estudios histológicos

Siete días después de la inoculación con suspensiones mixtas hongo-bacteria y bacteria-bacteria, fue posible evidenciar la presencia de los agentes biológicos en los tejidos internos de las raíces, especialmente en el caso de los hongos endofíticos. Fue evidente la presencia de micelio y clamidosporas de *T. atroviride* y *F. oxysporum* en raíces de segundo y tercer orden (Figura 17).

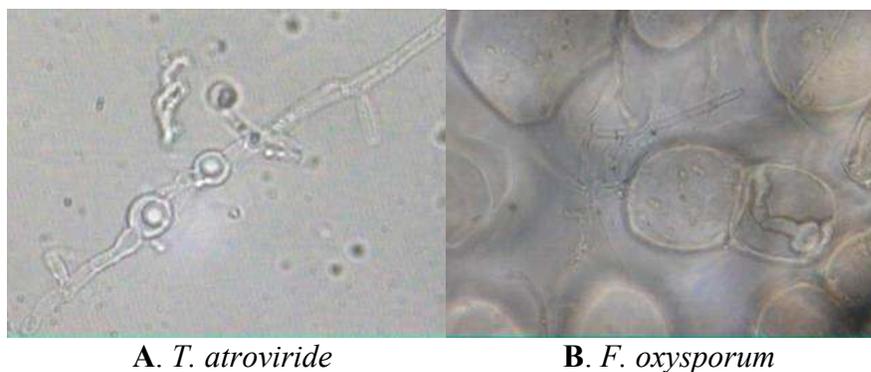


Figura 17. Hongos endofíticos en los tejidos internos de raíces de segundo orden de vitroplantas de banano del cv. “Gran Enano” siete días después de la inoculación, observadas a una resolución de 20x

No fue posible observar colonias de bacterias del género *Pseudomonas* en los tejidos internos de las raíces analizadas. En cuanto a las colonias del género *Bacillus*, se logró observar claramente la presencia de *Bacillus* spp. B21 en el tejido interno de raíces de segundo orden (Figura 18). No se observaron colonias de *Bacillus* spp. B31.



Figura 18. Bacillus spp. B21 en los tejidos internos de raíces de segundo orden de vitroplantas de banano del cv. “Gran Enano” siete días después de la inoculación, observadas a una resolución de 40x

4. Discusión

4.1 Determinación de unidades formadoras de colonias (ufc) y potencial de inóculo

Sikora (2002) sugiere que el control de fitoparásitos y patógenos de la raíz es más efectivo cuando los agentes de biocontrol son altamente competentes en la rizosfera, o bien, son capaces de colonizar el tejido radical endofíticamente. Por lo tanto, evidenciar el potencial de inóculo es clave para predecir la habilidad de un microorganismo de colonizar el sistema radical. Asimismo, un alto número de ufc, indica que se requerirá menor cantidad de inóculo para la protección del material de siembra, ya sea semillas, plántulas o material proveniente de cultivo de tejidos, lo cual representaría un menor costo económico para su implementación. Esto se comprobó con los resultados obtenidos en esta investigación, ya que para las inoculaciones requeridas en el ensayo de colonización se requirió una menor cantidad de inóculo de las bacterias en comparación con los hongos, ya que las primeras presentaron mayor cantidad de ufc/ml.

4.2 Prueba biológica *in vitro* para determinar la compatibilidad entre bacterias y hongos endofíticos

De acuerdo con los resultados obtenidos en condiciones *in vitro* los cuatro agentes biológicos evaluados son compatibles, aún cuando todos fueron aislamientos de tejidos internos de las raíces del banano y por lo tanto es posible que ocupen nichos ecológicos similares, no hay evidencia de competencia ni antagonismo entre sí, incluso es probable que se complementen uno al otro y por lo tanto expresen un efecto sinérgico en el biocontrol de patógenos. Por otra parte, está completamente demostrado que tanto *Bacillus* como *Pseudomonas* pueden establecer relaciones simbióticas con otros microorganismos de la rizosfera, como por ejemplo micorrizas (Lindermann 1992), lo cual también tiene un efecto positivo en la protección de la planta. Asimismo, existe información de referencia en cuanto a la combinación de hongos endofíticos con éxito en el biocontrol de nematodos en el cultivo de banano (zum Felde *et al.* 2006) y se ha demostrado compatibilidad de bacterias y hongos en el biocontrol de patógenos del suelo en otros cultivos (Guetsky *et al.* 2001).

4.3 Prueba biológica *in vivo* para determinar la compatibilidad entre bacterias y hongos endofíticos y su patrón de colonización en la planta

Según los resultados de las pruebas de colonización no hay casos de incompatibilidad en el crecimiento *in vivo* de las poblaciones endofíticas evaluadas. La mayoría de las combinaciones de bacterias y hongos endofíticos tuvieron la capacidad de colonizar todos los órganos de la planta analizados: raíz, cormo y pseudotallo. Esta capacidad de colonización vertical en toda la planta evidencia el comportamiento endofítico tanto de las bacterias como de los hongos. Los mayores porcentajes de colonización se presentaron en los cormos y en menor grado en pseudotallo. Esto debido probablemente a características propias de los tejidos internos de los cormos (almacenamiento de nutrientes) que les confieren mayor atracción hacia los microorganismos. Papanu *et al.* (2004) registraron resultados similares al evaluar los porcentajes de colonización de dos cepas no patogénicas de *F. oxysporum* en vitroplantas de banano de los cultivares Kibuzi y Nabusa. Los porcentajes de colonización obtenidos fueron mayores ($p < 0,05$) en cormos y menores en raíces, con 33,67% y 17,84% respectivamente. Sin embargo, la colonización en cormos decayó en el transcurso de 12 semanas en tanto la colonización en raíces se mantuvo constante. Es posible que la habilidad

de los agentes biológicos de colonizar y persistir en un órgano determinado de la planta esté relacionada con su origen (órgano de la planta del cual fueron aislados), y con las características fisiológicas de ese órgano en particular (Gold y Dubois 2005).

Independientemente del órgano colonizado, tanto el grupo de *Pseudomonas* como *Bacillus* presentaron porcentajes de colonización superiores a 75%, destacándose el grupo de *Pseudomonas*. Resultados similares fueron encontrados por Nuñez (2006) quien comparó el porcentaje de colonización de *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. de forma individual en vitroplantas de banano cv. “Gran Enano”. El proceso de colonización de las raíces por parte de *Pseudomonas* y *Bacillus* ha sido bien estudiado por diversos autores, quienes coinciden en que tal proceso presenta varios pasos: en primer lugar las células de la bacteria se adhieren a sitios adecuados de la raíz, seguidamente se multiplican y distribuyen a lo largo del sistema radical compitiendo con otros microorganismos por espacio y sitios de penetración. Una vez la bacteria penetra al interior del sistema radical tiene la ventaja de no tener mucha competencia y puede reproducirse con mayor facilidad (Weller 1983, Loper *et al.* 1985, Liftchitz *et al.* 1987). Los altos porcentajes de colonización de *Pseudomonas* y *Bacillus* observados en esta investigación posiblemente se deben a que ambos géneros fueron aislados de material sano de raíces de banano y la condición de ser endofíticas naturales les confiere la habilidad de crecer rápidamente en el interior de la planta. Sin embargo, es importante destacar que la habilidad de un microorganismo de crecer más rápido que otro no necesariamente indica que es mejor en el control del patógeno, especialmente cuando se encuentra en combinación con otros agentes de biocontrol (Guetsky *et al.* 2001).

Las interacciones negativas y/o positivas entre agentes de biocontrol inoculados en la planta, o entre estos y los microorganismos nativos de la rizosfera, pueden influenciar su comportamiento en la colonización del sistema radical, de ahí la importancia de que los agentes de biocontrol seleccionados para inoculaciones múltiples sean endofíticos compatibles (Hallmann y Berg 2006). La compatibilidad puede evaluarse en pruebas *in vitro* y predecir de alguna manera los resultados en la planta, no obstante, se podrían presentar casos en que la combinación de agentes biológicos incompatibles *in vitro* aumente la supresión del patógeno, ya que los agentes co-inoculados no influyen el uno en el otro *in vivo* debido a la separación espacial dentro del sistema radical. O bien, la producción de

compuestos secundarios antagonistas *in vitro* tienen lugar en la fase estacionaria pero no juegan un rol importante en los procesos de colonización (Duffy *et al.* 1996, de Boer 1999).

4.4 Estudios histológicos

Como resultado de los estudios histológicos realizados, fue posible observar e identificar algunas de las estructuras reproductivas de los hongos endofíticos en los tejidos internos del sistema radical de las vitroplantas de banano siete días después de su inoculación. Asimismo, fue posible comprobar la presencia de colonias de *Bacillus* B21 en los tejidos internos de raíces de segundo y tercer orden. Esto comprueba la habilidad de colonización de los agentes biológicos evaluados. Aunque las bacterias demostraron ser mejores colonizadoras que los hongos en todos los tratamientos evaluados en pruebas de compatibilidad *in vivo*, la presencia de los hongos fue más evidente en los estudios histológicos en comparación con las bacterias. Esto puede deberse a las características particulares de tamaño y forma de cada uno de los agentes evaluados. Las bacterias, aunque son más abundantes, tienen menor tamaño y requieren otro tipo de equipo y de metodologías para su observación, como por ejemplo la microscopía electrónica. Un microscopio electrónico de barrido (SEM) puede ampliar los objetos 200.000 veces o más y al contrario que los microscopios de transmisión o los microscopios ópticos, produce imágenes tridimensionales realistas de la superficie del objeto (Bloemberg y Carvajal 2006).

5. Conclusiones

5.1 Determinación de unidades formadoras de colonias (ufc) y potencial de inóculo

- Las bacterias pertenecientes al género *Bacillus* fueron diferentes entre ellas en tamaño y en cantidad de ufc/ml. B21 presentó forma de bastón, más grande y menos abundante que B31.
- La forma, tamaño y cantidad de ufc/ml fue muy similar entre los dos aislamientos del género *Pseudomonas*. Tanto P52 como P58 presentaron forma de varilla, más pequeñas y abundantes que la *Bacillus* B21, pero semejantes a la B31.

- Las estructuras reproductivas de los hongos endofíticos presentaron características diferentes entre géneros, no así entre aislamientos del mismo género. Las conidias de *Trichoderma* son redondeadas, más pequeñas y abundantes que las de *Fusarium*. Las macroconidas de *Fusarium* son curvadas, pluriseptadas con una célula apical puntiaguda, en tanto las microconidias son de forma redondeada.

5.2 Prueba biológica *in vitro* para determinar la compatibilidad entre bacterias y hongos endofíticos

- No se presentaron casos de incompatibilidad en los tratamientos hongo-bacteria ni en los tratamientos bacteria-bacteria en las pruebas *in vitro*.
- La evaluación de crecimiento de hongos y bacterias en plato Petri se debe realizar a partir de las 24 horas de cocultivo, ya que el crecimiento de las bacterias es muy rápido y podría no observarse una vez desarrollado el micelio del hongo cocultivado.

5.3 Prueba biológica *in vivo* para determinar la compatibilidad entre bacterias y hongos endofíticos y su patrón de crecimiento en la planta

- No se presentaron casos de incompatibilidad entre las bacterias y hongos endofíticos evaluados en vitroplantas de banano del cultivar “Gran Enano”. Todos los agentes biológicos evaluados fueron capaces de colonizar raíz, cormo y pseudotallo de la planta.
- Las bacterias fueron mejores colonizadoras de órganos de la planta que los hongos, presentando un rango de 78 a 100% de colonización promedio en combinaciones hongo-bacteria y un rango de 68 a 100% de colonización en combinaciones bacteria-bacteria, mientras los hongos presentaron un rango de colonización de 13 a 73%.
- Las combinaciones hongo-bacteria presentaron porcentajes de colonización promedio en un rango de 54 a 84%, destacándose la combinación de *T. atroviride* E1 y *Bacillus* B21.
- Las combinaciones *Bacillus-Pseudomonas* presentaron porcentajes de colonización promedio de 83 a 100%, destacándose la combinación *Bacillus* B21 y *Pseudomonas* P52.

- Para evaluar porcentaje de colonización de combinaciones bacteria-bacteria se requiere un máximo de cinco días, ya que las bacterias colonizan rápidamente. Para evaluar porcentaje de colonización de combinaciones hongo-bacteria es importante realizar las observaciones diariamente durante al menos siete días, ya que las primeras colonias de bacterias se pueden observar 24 horas después del cocultivo, pero el crecimiento del hongo es más lento.
- El porcentaje de colonización de combinaciones hongo-bacteria es mayor en los cormos (90%) y menor en las raíces y pseudotallos (56%). Asimismo, el porcentaje de colonización de combinaciones bacteria-bacteria es mayor en los cormos (100%) y menor en raíces (91,67%) y en pseudotallos (78,33%).

6. Referencias bibliográficas

- Baker, R. 1990. An overview of current and future strategies and models for biological control. *In* Hornby, D. ed. Biological control of soil-borne plant pathogens. Wallingford, UK, CAB International. p. 375-388.
- Bloemberg, GV; Camacho, MM. 2006. Microbial interactions with plants: a hidden world? *In* Schulz, B; Boyle, C; Sieber, T. eds. Microbial root endophytes. Berlin-Heidelberg, DE, Springer-Verlag. p. 321-336. (Soil Biology Vol. 9).
- de Boer, M; van der Sluis, I; van Loon, L; Bakker, P. 1999. Combining fluorescent *Pseudomonas* spp. strains to enhance suppression of fusarium wilt of radish. *European Journal of Plant Pathology* 105:201-210.
- Cañizares, C. 2003. Estudio sobre poblaciones de hongos endofíticos provenientes de suelos supresivos al nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorne en plantaciones comerciales de plátano en la zona de Talamanca, Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 75 p.
- Duffy, BK; Simon, A; Weller, DM. 1996. Combination of *Trichoderma koningii* with fluorescent pseudomonads for control of take-all on wheat. *Phytopathology* 86:188-194.
- Gold, CS; Dubois, T. 2005. Novel application methods for microbial control products: IITA's research against banana weevil and burrowing nematode. *Biocontrol News and Information* 26(3):86-89.
- Guetsky, R; Shtienberg, D; Elad, Y; Dinoor, A. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. *Phytopathology* 91(7):621-627.
- Hallmann, J; Berg, G. 2006. Spectrum and population dynamics of bacterial root endophytes. *In* Schulz, B; Boyle, C; Sieber, T. eds. Microbial root endophytes. Berlin-Heidelberg, DE, Springer-Verlag. p. 15-32. (Soil Biology Vol. 9).
- Liftchitz, R; Kloepper, JW; Kozlosky, M; Simonson, C; Carlson, J; Tipping, EM; Zaleska, I. 1987. Growth promotion of canola (rapessed) seedling by a strain of *Pseudomonas putida* under gnotobiotic condition. *Canadian Journal of Plant Pathology* 33:390-395.
- Lindermann, RG. 1992. Vesicular-arbuscular mycorrhizae and soil microbial interactions. *In* Betlen-Falvay, GJ; Linderman, RG. Eds. Mycorrhizae in sustainable agricultura. ASA Special Publication No. 54, Madison. p. 45-70.
- Loper, J; Corbell, E; Graus, N; Nowack-Thompson, J; Henkels, M; Carnegie, S. 1985. Contributions of molecular biology towards understanding mechanisms by which rhizosphere pseudomonad affect biological control. *In* Ryder, MH; Stephens, PM; Bowen, GD. eds. Improving plant productivity with rhizosphere bacteria. p. 89-96.

- Meneses, A; Pocasangre, LE; Somarriba, E; Riveros, A; Rosales, F. 2003. Diversidad de hongos endofíticos y abundancia de nematodos en plantaciones de banano y plátano en la parte baja de los territorios indígenas de Talamanca. *Agroforestería en las Américas* 10(37-38):59-62.
- Núñez, CT. 2006. Estudio de poblaciones de bacterias endofíticas de la rizosfera del banano para el bicontrol del nematodo barrenador *Radopholus similis*. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 62 p.
- Paparu, P; Dubois, T; Gold, CS; Adipala, E; Niere, B; Coyne, D. 2004. Inoculation, colonization and distribution of fungal endophytes in *Musa* tissue culture plants. *Uganda Journal of Agricultural Sciences* 9:583-589.
- Pocasangre, LE. 2004. Nuevas estrategias para el manejo de nematodos en musáceas. *In* Rivas, G; Rosales, FE. eds. Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de las musáceas en los trópicos. Actas del taller “Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de las musáceas” celebrado en Guayaquil, Ecuador. 11-13 de agosto, 2003. Montpellier, FR, INIBAP. p. 121.
- Sikora, RA. 2002. Characterization and importance of microbial biodiversity in agricultural soil-ecosystems for plant root health. *In* Riveros, AS; Pocasangre, LE; Rosales, FE. eds. Inducción de resistencia y uso de tecnologías limpias para el manejo de plagas en plantas. Memorias del taller internacional realizado en el CATIE, Turrialba, Costa Rica 27-30 de Agosto 2002. p. 11-12.
- Weller, DM. 1983. Colonization of wheat roots by a fluorescent pseudomonad suppressive to take-all. *Phytopathology* 73:1548-1553.
- 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. Thesis. Bonn, DE, University of Bonn. 53 p.
- zum Felde, A; Pocasangre, LE; Cañizares, CA; Sikora, RA; Rosales, FE; Riveros, AS. 2006. Efecto de inoculaciones combinadas de hongos endofíticos en el biocontrol de *Radopholus similis*. *Infomusa* 15(1-2):12-18.

VI. Artículo 2.

Efecto de las inoculaciones combinadas de hongos y bacterias endofíticas sobre el biocontrol de *Radopholus similis* y en la promoción de crecimiento de plantas de banano del cultivar “Gran Enano” (*Musa* AAA)

1. Introducción

El nematodo barrenador *Radopholus similis* es uno de los principales causantes de pérdidas en la producción en el cultivo de banano en las zonas tropicales y subtropicales. El nematodo penetra el sistema radical y se alimenta del tejido celular, debilitando la absorción de nutrientes y el sistema de anclaje de la planta (Pinochet 1986, Gowen y Quénéhervé 1990). El control generalizado de los fitonematodos en banano se ha basado en el uso de dos a tres aplicaciones de nematicidas alcanzando un valor de USD 350 a 400 por hectárea por año (Pocasangre *et al.* 2004, Martinuz *et al.* 2007). Por otra parte, está completamente comprobado el efecto negativo de los nematicidas en el ambiente y la salud humana. Por lo tanto, es necesario desarrollar nuevas estrategias de manejo como lo es el uso de agentes biológicos de control de patógenos (Sikora 1992, Araya *et al.* 1995).

Se ha demostrado que la aplicación de una combinación de agentes de biocontrol podría simular la situación natural de colonizaciones múltiples de microorganismos en la planta y representar una estrategia de control más consistente que la aplicación individual de los mismos (Pierson y Weller 1994). Sin embargo, la mayoría de las investigaciones se han basado en la aplicación individual de agentes biológicos y no en las mezclas. En el caso particular de banano (*Musa* AAA), se ha profundizado en el estudio de los microorganismos endofíticos. Investigaciones realizadas en CATIE, por más de diez años, demuestran que el 10% de los hongos endofíticos colectados presentan actividad antagonista sobre *Radopholus similis*, en plantas del subgrupo Cavendish (Pocasangre *et al.* 2004). Reducciones de hasta 90% en la población final del nematodo en el sistema radical han sido encontradas (Pocasangre *et al.* 2000). Resultados similares han sido hallados en estudios realizados en el Instituto Internacional de Agricultura Tropical, en Uganda. Dubois *et al.* (2004) y Paparu *et al.* (2004) han documentado que hongos endofíticos del género *Fusarium* tienen gran

potencial de biocontrol por su comprobada habilidad de colonización y su actividad antagonista contra *R. similis* en el sistema radical de banano. Recientemente, aplicaciones individuales de bacterias endofíticas de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* han evidenciado una actividad de biocontrol de *R. similis* superior al 80% en condiciones de invernadero (Nuñez 2006, Quesada 2006).

Existen pocos estudios sobre el efecto de las combinaciones de agentes de biocontrol contra nematodos, y estos por lo general se refieren más a la combinación de hongos-hongos que a la combinación hongos-bacterias. zum Felde *et al.* (2006) estudiaron la eficacia de inoculaciones combinadas de hongos endofíticos sobre el control de *R. similis* y demostraron que la combinación de aislamientos del género *Trichoderma* y cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum* produjo una reducción mayor de la cantidad final de *R. similis* en comparación con las inoculaciones individuales. Sin embargo, no existen estudios de combinaciones de bacterias con bacterias y bacterias con hongos endofíticos para el biocontrol de *R. similis* en banano. Consecuentemente, la presente investigación tuvo como objetivo evaluar el efecto de la inoculación individual y combinada de bacterias y hongos endofíticos en el biocontrol de *R. similis* mediante la evaluación de la reducción en la penetración y tasa de reproducción del nematodo en el sistema radical. Adicionalmente, se evaluó, en experimentos separados, el efecto de las combinaciones de los agentes biológicos sobre la promoción de crecimiento de las plantas en ausencia de *R. similis*, en condiciones de invernadero.

2. Materiales y métodos

2.1 Material experimental

Para este estudio se realizaron tres bioensayos utilizando vitroplantas de banano (*Musa AAA*) del cultivar “Gran Enano” provenientes de un laboratorio comercial de cultivo de tejidos. Los agentes biológicos evaluados fueron dos bacterias del género *Bacillus* spp. (B21 y B31) y dos de *Pseudomonas* spp. (P52 y P58), provenientes de fincas comerciales de banano en la Zona Atlántica de Costa Rica. Además, dos cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum* recolectadas en Sixaola y Talamanca, Costa Rica, y dos de *Trichoderma atroviride*,

provenientes de suelos supresivos de Guatemala y Costa Rica. Todos los aislamientos fueron seleccionados por su conocida actividad de biocontrol sobre *R. similis* (Nuñez 2006, zum Felde *et al.* 2006). Se evaluó un total de ocho inoculaciones individuales de los agentes biológicos, 22 combinaciones hongo-bacteria y bacteria-bacteria, un testigo absoluto, un testigo referencial y un testigo químico (Cuadro 10).

Cuadro 10. Tratamientos evaluados en bioensayos de penetración y biocontrol de Radopholus similis, y en la promoción de crecimiento de vitroplantas de banano cv. “Gran Enano” (AAA)

Tratamiento	Código	Género
1	E3	<i>Fusarium oxysporum</i>
2	E4	<i>Fusarium oxysporum</i>
3	E1	<i>Trichoderma atroviride</i>
4	E2	<i>Trichoderma atroviride</i>
5	B21	<i>Bacillus</i> spp.
6	B31	<i>Bacillus</i> spp.
7	P52	<i>Pseudomonas</i> spp.
8	P58	<i>Pseudomonas</i> spp.
1	E3 B21	<i>F. oxysporum</i> (E3) / <i>Bacillus</i> spp. B21
2	E3 B31	<i>F. oxysporum</i> (E3) / <i>Bacillus</i> spp. B31
3	E3 P52	<i>F. oxysporum</i> (E3) / <i>Pseudomonas</i> spp. P52
4	E3 P58	<i>F. oxysporum</i> (E3) / <i>Pseudomonas</i> spp. P58
5	E4 B21	<i>F. oxysporum</i> (E4) / <i>Bacillus</i> spp. B21
6	E4 B31	<i>F. oxysporum</i> (E4) / <i>Bacillus</i> spp. B31
7	E4 P52	<i>F. oxysporum</i> (E4) / <i>Pseudomonas</i> spp. P52
8	E4 P58	<i>F. oxysporum</i> (E4) / <i>Pseudomonas</i> spp. P58
9	E1 B21	<i>T. atroviride</i> (E1) / <i>Bacillus</i> spp. B21
10	E1 B31	<i>T. atroviride</i> (E1) / <i>Bacillus</i> spp. B31
11	E1 P52	<i>T. atroviride</i> (E1) / <i>Pseudomonas</i> spp. P52
12	E1 P58	<i>T. atroviride</i> (E1) / <i>Pseudomonas</i> spp. P58
13	E2 B21	<i>T. atroviride</i> (E2) / <i>Bacillus</i> spp. B21
14	E2 B31	<i>T. atroviride</i> (E2) / <i>Bacillus</i> spp. B31
15	E2 P52	<i>T. atroviride</i> (E2) / <i>Pseudomonas</i> spp. P52
16	E2 P58	<i>T. atroviride</i> (E2) / <i>Pseudomonas</i> spp. P58
17	B21 B31	<i>Bacillus</i> spp. B21 / <i>Bacillus</i> spp. B31
18	B21 P52	<i>Bacillus</i> spp. B21 / <i>Pseudomonas</i> spp. P52
19	B21 P58	<i>Bacillus</i> spp. B21 / <i>Pseudomonas</i> spp. P58
20	B31 P52	<i>Bacillus</i> spp. B31 / <i>Pseudomonas</i> spp. P52
21	B31 P58	<i>Bacillus</i> spp. B31 / <i>Pseudomonas</i> spp. P58
22	P52 P58	<i>Pseudomonas</i> spp. P52 / <i>Pseudomonas</i> spp. P58
Testigo	TA	Testigo absoluto (sin BE, sin HE, sin <i>R. similis</i>)
Testigo	TQ	Testigo químico (con <i>R. similis</i> y Terbufos 10GR)
Testigo	TR	Testigo referencial (con <i>R. similis</i>)

2.2 Bioensayo de penetración de *Radopholus similis* en vitroplantas de banano (*Musa* AAA)

2.2.1 Protección y siembra de vitroplantas

Vitroplantas de banano en fase cuatro, con cuatro semanas de endurecimiento colectivo en invernadero, fueron inmersas por 5 minutos en una suspensión a una concentración de 1×10^6 ufc/ml de acuerdo a los diferentes tratamientos (Cuadro 10). Posteriormente las plantas fueron sembradas en una mezcla esterilizada de tierra y arena en una relación 1:1 contenida en vasos plásticos de 250ml de capacidad. El sustrato utilizado fue esterilizado en un horno eléctrico durante 8 horas a una temperatura de 300°C. Las plantas fueron distribuidas al azar en el invernadero, separando individualmente cada planta para evitar contaminación durante el riego, y permanecieron en invernadero durante siete días a una temperatura de $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Se establecieron cinco repeticiones para cada tratamiento.



Figura 19. Protocolo de inoculación de vitroplantas de banano con aislamientos endofíticos

2.2.2 Cultivo monoxénico de *Radopholus similis*

R. similis obtenidos de subcultivos en discos de zanahoria esterilizados preparados en CATIE, fueron reproducidos según la metodología descrita por O'Bannon y Taylor (1968) y Dochez *et al.* (2000). En condiciones asépticas, zanahorias frescas previamente desinfectadas con detergente líquido, fueron asperjadas con alcohol al 95% y flameadas por tres veces consecutivas. La cáscara de las zanahorias fue removida y se realizaron cortes transversales con un bisturí sobre papel toalla previamente esterilizado, para obtener discos de 3 a 5mm aproximadamente. Cada disco fue transferido con pinzas estériles a platos Petri de 35mm debidamente identificados y sellados con papel parafilme (Figura 20).



Figura 20. Protocolo de preparación de discos de zanahoria para la reproducción de *Radopholus similis*

Cultivos asépticos de *R. similis* en discos de zanahoria fueron seleccionados para realizar subcultivos del nematodo. En condiciones estériles se procedió al lavado de los platos que contenían los cultivos para obtener una suspensión de nematodos que fue recolectada en un tubo de ensayo estéril. Para la esterilización superficial de los nematodos se preparó una solución de 6000ppm de sulfato de estreptomicina, la cual fue agregada al tubo de ensayo que contenía los nematodos y se dejó reposar durante tres horas. Posteriormente, se procedió a retirar el sobrenante y hacer dos lavados con agua destilada estéril.

Una vez desinfectados los nematodos, se procedió a la inoculación de los discos de zanahoria en platos Petri, aplicando tres gotas de la suspensión de aproximadamente 100 nematodos en 10 μ l de agua en tres diferentes puntos de cada disco, utilizando una micropipeta calibrada. Los platos Petri fueron identificados y sellados con papel parafilm, y almacenados en incubadoras bajo condiciones de oscuridad a una temperatura de 27°C.



Figura 21. Protocolo de preparación de *Radopholus similis* para su inoculación en discos de zanahoria

2.2.3 Inoculación de vitroplantas con *Radopholus similis*

Dos semanas después de la inoculación con los agentes biológicos, las plantas fueron inoculadas con 500 nematodos/planta. La inoculación se realizó aplicando 3ml de una suspensión calibrada de *R. similis* en tres agujeros de 1 a 2cm de profundidad, alrededor del área radical de cada planta utilizando una pipeta Ependorf calibrada, agitando la suspensión continuamente mediante un motor de aire, para asegurar una aplicación homogénea de los nematodos. El efecto de las inoculaciones individuales y combinadas de agentes biológicos en la reducción de la penetración de *R. similis* en el sistema radical de la planta fue comparado con un control absoluto, un control referencial y un testigo químico que consistió en la aplicación de Terbufos 10GR a una concentración de 10ppm en la mezcla de suelo (Cuadro 10).



Figura 22. Metodología utilizada en el bioensayo de penetración

2.2.4 Evaluación del porcentaje de penetración de *Radopholus similis*

La cantidad de nematodos presentes en el sistema radical de las plantas fue obtenida por el método de licuado y tamizado utilizado en el Laboratorio de Nematología de Corbana S.A. descrito por Araya (2002). El porcentaje de penetración fue determinado comparando la actividad de inhibición de la penetración en plantas tratadas con respecto al testigo referencial inoculado con nematodos, sin agentes biológicos.



Figura 23. Proceso de extracción de nematodos utilizado en el bioensayo de penetración

2.3 Prueba de biocontrol de *Radopholus similis* en vitroplantas de banano (*Musa AAA*)

En este bioensayo se utilizaron vitroplantas de seis semanas de endurecimiento colectivo en invernadero. El efecto de las inoculaciones individuales y combinadas de los agentes biológicos en el biocontrol de *R. similis* fue comparado con un testigo absoluto, un testigo referencial y un testigo químico (Cuadro 10).

La protección de plantas se realizó según la metodología descrita en el numeral 2.2.1. Luego las plantas fueron sembradas en sustrato estéril en bolsas plásticas de 1,5 litros de capacidad. Dos semanas después de la protección, se realizó la inoculación de los nematodos siguiendo la metodología descrita en el numeral 2.2.3. Posteriormente, las plantas fueron distribuidas al azar y permanecieron en invernadero durante seis semanas a una temperatura de $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.



Figura 24. Protocolo de inoculación de vitroplantas de banano con aislamientos endofíticos

La extracción de los nematodos se realizó mediante la metodología descrita en el numeral 2.2.4. El porcentaje de biocontrol de *R. similis* de los tratamientos evaluados se determinó comparando la población final del nematodo en el sistema radical de las plantas protegidas con respecto a la cantidad final de *R. similis* presente en las plantas testigo referencial.



Figura 25. Protocolo de extracción de nematodos utilizado en la prueba de biocontrol de Radopholus similis

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

Para la evaluación del efecto de los agentes biológicos sobre la promoción de crecimiento de vitroplantas de banano del cultivar “Gran Enano” se estableció un bioensayo con la misma metodología descrita para la prueba de biocontrol pero sin la inoculación de *R. similis*. Las plantas fueron distribuidas al azar y permanecieron en invernadero durante ocho semanas a $25\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Después de ocho semanas, se procedió a la evaluación de los parámetros de promoción de crecimiento. Para esto, las plantas fueron trasladadas al laboratorio de raíces del CATIE. Las raíces fueron lavadas y separadas del cormo; una vez pesadas se colocaron en contenedores plásticos de 250ml con agua corriente, tapados y debidamente identificados. Se registró también el peso del sistema foliar de cada planta. Finalmente, se analizó la morfología del sistema radical mediante un escaneo con el Hewlett Packard Scan Jet 6100C/T y el programa WinRhizo® (Version 5.1; Regent Instruments, Canadá). Se determinó longitud (cm/m^3), diámetro promedio (mm), volumen (cm^3) y área superficial (cm^2) del sistema radical de cada planta. El efecto individual y combinado de los agentes biológicos fue comparado con un testigo absoluto y un testigo químico, ya que no existió tratamiento con inoculación de nematodos.

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

Se utilizó un Diseño Completamente al Azar para evaluar los bioensayos de penetración, biocontrol y promoción de crecimiento con un Análisis de Varianza individual para cada variable estudiada (Cuadro 11). El modelo estadístico para este arreglo de tratamientos se define matemáticamente de la siguiente manera:

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

Y_{ij} = Variable a medir

μ = MEDIA general

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento

e_{ij} = Error experimental

Cuadro 11. Variables de respuesta a evaluar para determinar la actividad biocontroladora de los endofíticos (bacterias y hongos) contra Radopholus similis y su efecto en la promoción de crecimiento de vitroplantas de banano cv. "Gran Enano"

Evaluación <i>In vivo</i>	
Actividad antagonista de bacterias y hongos endofíticos contra <i>Radopholus similis</i>	Promoción de crecimiento y morfología de las raíces
Nematodos totales	Peso del sistema foliar (g)
Nematodos por gramo de raíz	Peso fresco de raíces (g)
% de biocontrol de nematodos	Diámetro de raíces (mm)
	Volumen radical (cm ³)
	Área superficial de las raíces (cm ²)
	Longitud radical/volumen (cm/m ³)

3. Resultados

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

Siete días después de la inoculación con *R. similis*, el número de nematodos en las raíces fue menor en las plantas inoculadas con los agentes biológicos que en las plantas testigo referencial (TR), con diferencias altamente significativas ($p \leq 0,0001$). Los porcentajes de penetración de los diferentes tratamientos oscilaron en un rango de 3 a 26%, en comparación con 29% del TR. En 28 de los tratamientos evaluados, el efecto de los agentes biológicos en la penetración de *R. similis* fue estadísticamente similar al efecto observado con la aplicación de Terbufos 10GR (5%) con porcentajes de penetración entre 3 y 18%. Las inoculaciones combinadas redujeron aún más la penetración de nematodos que las inoculaciones individuales, siendo las combinaciones hongo-bacteria las que presentaron mejores resultados (Cuadro 12).

En cuanto al comportamiento de los hongos en las combinaciones, *F. oxysporum* presentó un mejor efecto en reducir la penetración de *R. similis* que *T. atroviride*, independientemente de la bacteria asociada. En el caso de las bacterias, tanto *Pseudomonas* como *Bacillus* mostraron su potencial antagonista en todas las combinaciones hongo-bacteria y bacteria-bacteria, sin embargo, en el caso de P58 y B21, no se presentaron diferencias significativas con respecto al testigo referencial cuando fueron inoculadas de forma individual. En general, los mejores tratamientos, con porcentaje de penetración igual o menor al testigo químico fueron las combinaciones E4P58, E4B21, E4P52, E2P58, E1B21 y la inoculación individual de B31.

Cuadro 12. Porcentaje de penetración de *Radopholus similis* en plantas de banano cv. “Gran Enano” siete días después de la inoculación

Trata.	Código	Género	Nematodos		Penetración %
			Totales		
16	E4 P58	<i>F. oxysporum</i> / <i>Pseudomonas</i>	16	a	3,12
14	E4 B31	<i>F. oxysporum</i> / <i>Bacillus</i>	19	ab	3,75
15	E4 P52	<i>F. oxysporum</i> / <i>Pseudomonas</i>	22	abc	4,37
6	B31	<i>Bacillus</i>	25	abcd	5,00
17	E1 B21	<i>T. atroviride</i> / <i>Bacillus</i>	25	abcd	5,00
24	E2 P58	<i>T. atroviride</i> / <i>Pseudomonas</i>	25	abcd	5,00
TQ		Testigo químico	25	abcd	5,00
4	E2	<i>T. atroviride</i>	28	abcd	5,62
12	E3 P58	<i>F. oxysporum</i> / <i>Pseudomonas</i>	31	abcd	6,25
26	B21 P52	<i>Bacillus</i> / <i>Pseudomonas</i>	31	abcd	6,25
2	E4	<i>F. oxysporum</i>	38	abcd	7,50
10	E3 B31	<i>F. oxysporum</i> / <i>Bacillus</i>	38	abcd	7,50
21	E2 B21	<i>T. atroviride</i> / <i>Bacillus</i>	44	abcde	8,75
27	B21 P58	<i>Bacillus</i> / <i>Pseudomonas</i>	47	abcdef	9,37
3	E1	<i>T. atroviride</i>	50	abcdefg	10,00
11	E3 P52	<i>F. oxysporum</i> / <i>Pseudomonas</i>	50	abcdefg	10,00
13	E4 B21	<i>F. oxysporum</i> / <i>Bacillus</i>	50	abcdefg	10,00
23	E2 P52	<i>T. atroviride</i> / <i>Pseudomonas</i>	50	abcdefg	10,00
1	E3	<i>F. oxysporum</i>	53	abcdefg	10,62
9	E3 B21	<i>F. oxysporum</i> / <i>Bacillus</i>	53	abcdefg	10,62
7	P52	<i>Pseudomonas</i>	59	abcdefg	11,87
30	P52 P58	<i>Pseudomonas</i> / <i>Pseudomonas</i>	59	abcdefg	11,87
20	E1 P58	<i>T. atroviride</i> / <i>Pseudomonas</i>	63	abcdefg	12,50
25	B21 B31	<i>Bacillus</i> / <i>Bacillus</i>	63	abcdefg	12,50
28	B31 P52	<i>Bacillus</i> / <i>Pseudomonas</i>	66	abcdefg	13,12
18	E1 B31	<i>T. atroviride</i> / <i>Bacillus</i>	81	abcdefgh	16,25
22	E2 B31	<i>T. atroviride</i> / <i>Bacillus</i>	81	abcdefgh	16,25
29	B31 P58	<i>Bacillus</i> / <i>Pseudomonas</i>	88	abcdefgh	17,50
19	E1 P52	<i>T. atroviride</i> / <i>Pseudomonas</i>	91	abcdefghi	18,12
8	P58	<i>Pseudomonas</i>	109	hij	21,87
5	B21	<i>Bacillus</i>	131	ij	26,25
TR		Testigo referencial	147	j	29,37

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

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

Seis semanas después de la inoculación con nematodos, veintiséis de los tratamientos con agentes biológicos presentaron una disminución en la población final de *R. similis* en el sistema radical de 29 a 93% en comparación con el testigo referencial, presentándose diferencias altamente significativas ($p \leq 0,0001$). Veintiún tratamientos, correspondientes al 70% del total evaluado con agentes biológicos, presentaron actividad antagonista

estadísticamente similar al testigo químico (88%), correspondiendo a porcentajes de biocontrol entre 62 y 93%. Las combinaciones E1P58, E1P52, y la aplicación individual de B31 presentaron porcentajes de biocontrol mayores que el testigo químico, sin diferir estadísticamente. Además, siete tratamientos presentaron entre el 80 y 90% de biocontrol, mientras otros cinco estuvieron en un rango de 70 a 80%; ocho se ubicaron en el rango de 50 a 70% y los tres tratamientos restantes no alcanzaron el 50% de biocontrol. Las inoculaciones combinadas redujeron aún más la cantidad de nematodos que las inoculaciones individuales, siendo las combinaciones hongo-bacteria las que presentaron mejores resultados (Cuadro 13).

Cuadro 13. Rangos de efecto de los tratamientos evaluados para el biocontrol de Radopholus similis en vitroplantas de banano cv. "Gran Enano", con diferencias significativas con respecto al testigo referencial

Tratamientos	Biocontrol (%)	Tratamientos	
		Cantidad	Porcentaje
E1P58, E1P52, B31	> 90	3	9
E2P52, TQ , E1B21, P52, B21P58, B21, P58, B21P52	80 - 90	7	21
E2, E4P52, E1B31, E3P52, E1	70 - 80	5	15
E3, E4P58, E3B21, E3B31, E4B21, E4, B31P58, E2B31	50 -70	8	24
E2B21, E4B31, P52P58, TR	< 50	3	9

En cuanto al comportamiento de los hongos en las combinaciones, *T. atroviride* presentó un mejor efecto en reducir la población final de *R. similis* que *F. oxysporum* independientemente de la bacteria asociada. Por su parte las bacterias del género *Pseudomonas* presentaron mejor actividad de biocontrol en combinación con hongos que las bacterias del género *Bacillus* (Cuadro 14).

La protección de plantas con agentes de biocontrol tuvo un importante efecto en la reducción de la tasa de reproducción del nematodo, es decir, el número de veces que *R. similis* se reprodujo respecto a la cantidad de nematodos inoculados inicialmente. En 12 de los tratamientos evaluados con plantas protegidas con endofíticos, la tasa de reproducción fue menor que 1, lo cual indica que *R. similis* no se reprodujo. La tasa de reproducción en plantas no protegidas fue de 3,91 (cuadro 14).

Cuadro 14. Efecto de inoculaciones individuales y combinadas de bacterias y hongos endofíticos sobre el control de *Radopholus similis* en vitroplantas cv. "Gran Enano", seis semanas después de la inoculación con nematodos

Trata.	Código	Género	Peso raíz (g)		Nem. Total #		Biocontrol %	Tasa Reproducción		Densidad <i>R. similis</i> /g de raíz	
20	E1 P58	<i>T. atroviride</i> / <i>Pseudomonas</i>	10,24	abcd	128	a	93	0,26	a	13	a
19	E1 P52	<i>T. atroviride</i> / <i>Pseudomonas</i>	10,29	abcd	141	a	93	0,28	a	14	ab
6	B31	<i>Bacillus</i>	10,50	abcd	163	a	92	0,33	a	15	abc
23	E2 P52	<i>T. atroviride</i> / <i>Pseudomonas</i>	11,55	cd	228	ab	88	0,46	ab	20	abcd
	TQ	Testigo químico	10,41	abcd	244	abc	88	0,49	abc	23	abcd
17	E1 B21	<i>T. atroviride</i> / <i>Bacillus</i>	9,64	abc	306	abcd	84	0,61	abcd	32	abcde
7	P52	<i>Pseudomonas</i>	9,55	abc	316	abcd	84	0,63	abcd	33	abcde
27	B21 P58	<i>Bacillus</i> / <i>Pseudomonas</i>	9,38	abc	325	abcd	83	0,65	abcd	35	abcdef
5	B21	<i>Bacillus</i>	9,81	abc	350	abcd	82	0,70	abcd	36	cdefg
8	P58	<i>Pseudomonas</i>	10,20	abcd	353	abcd	82	0,71	abcd	35	abcde
26	B21 P52	<i>Bacillus</i> / <i>Pseudomonas</i>	9,00	abc	369	abcd	81	0,74	abcd	41	abcdef
4	E2	<i>T. atroviride</i>	9,54	abc	450	abcde	77	0,90	abcde	47	abcdef
15	E4 P52	<i>F. oxysporum</i> / <i>Pseudomonas</i>	9,78	abc	481	abcde	75	0,96	abcde	49	abcdef
18	E1 B31	<i>T. atroviride</i> / <i>Bacillus</i>	11,10	bcd	491	abcde	75	0,98	abcde	44	abcdef
11	E3 P52	<i>F. oxysporum</i> / <i>Pseudomonas</i>	9,06	abc	522	abcdef	73	1,04	abcdef	58	abcdef
3	E1	<i>T. atroviride</i>	10,33	abcd	584	abcdef	70	1,17	abcdef	57	abcdef
1	E3	<i>F. oxysporum</i>	8,44	ab	640	abcdef	67	1,28	abcdef	76	efg
16	E4 P58	<i>F. oxysporum</i> / <i>Pseudomonas</i>	8,06	a	703	bcdefg	64	1,41	bcdefg	87	fg
9	E3 B21	<i>F. oxysporum</i> / <i>Bacillus</i>	10,76	abcd	716	bcdefg	63	1,43	bcdefg	66	bcdefg
10	E3 B31	<i>F. oxysporum</i> / <i>Bacillus</i>	10,25	abcd	741	cdefg	62	1,48	cdefg	72	bcdefg
2	E4	<i>F. oxysporum</i>	10,10	abcd	744	cdefg	62	1,49	cdefg	74	defg
13	E4 B21	<i>F. oxysporum</i> / <i>Bacillus</i>	11,23	bcd	744	cdefg	62	1,49	cdefg	66	abcdefg
29	B31 P58	<i>Bacillus</i> / <i>Pseudomonas</i>	9,64	abc	797	defg	59	1,59	defg	83	efg
22	E2 B31	<i>T. atroviride</i> / <i>Bacillus</i>	13,04	d	878	efg	55	1,76	efg	67	bcdefg
21	E2 B21	<i>T. atroviride</i> / <i>Bacillus</i>	8,38	ab	1016	fgh	48	2,03	fgh	121	gh
14	E4 B31	<i>F. oxysporum</i> / <i>Bacillus</i>	9,68	abc	1184	ghi	39	2,37	ghi	122	gh
30	P52 P58	<i>Pseudomonas</i> / <i>Pseudomonas</i>	8,04	a	1388	hi	29	2,78	hi	173	hi
25	B21 B31	<i>Bacillus</i> / <i>Bacillus</i>	9,55	abc	1547	ij	21	3,09	ij	162	hi
12	E3 P58	<i>F. oxysporum</i> / <i>Pseudomonas</i>	9,16	abc	1566	ij	20	3,13	ij	171	i
28	B31 P52	<i>Bacillus</i> / <i>Pseudomonas</i>	9,50	abc	1607	ij	18	3,21	ij	169	i
24	E2 P58	<i>T. atroviride</i> / <i>Pseudomonas</i>	10,00	abc	1941	j	1	3,88	j	194	i
	TR	Testigo referencial	9,08	abc	1956	j	0	3,91	j	216	i

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

Los mejores diez tratamientos con actividad de biocontrol contra *R. similis* se describen en el cuadro 15. El porcentaje de biocontrol osciló entre 81 y 93% y no difieren estadísticamente del control químico Terbufos 10GR que presentó 88% de biocontrol.

Cuadro 15. Selección de los mejores diez tratamientos con base en el efecto sobre el biocontrol de *Radopholus similis* en vitroplantas cv. “Gran Enano”, seis semanas después de la inoculación con nematodos

Código	Género	Peso raíz (g)	Nem. Total #	Biocontrol %	Tasa Reproducción	Densidad <i>R. similis</i> /g raíz
E1 P58	<i>T. atroviride</i> / <i>Pseudomonas</i>	10,24 abcd	128 a	93	0,26 a	13 a
E1 P52	<i>T. atroviride</i> / <i>Pseudomonas</i>	10,29 abcd	141 a	93	0,28 a	14 ab
B31	<i>Bacillus</i>	10,50 abcd	163 a	92	0,33 a	15 abc
E2 P52	<i>T. atroviride</i> / <i>Pseudomonas</i>	11,55 cd	228 ab	88	0,46 ab	20 abcd
TQ	Testigo químico	10,41 abcd	244 abc	88	0,49 abc	23 abcd
E1 B21	<i>T. atroviride</i> / <i>Bacillus</i>	9,64 abc	306 abcd	84	0,61 abcd	32 abcde
P52	<i>Pseudomonas</i>	9,55 abc	316 abcd	84	0,63 abcd	33 abcde
B21 P58	<i>Bacillus</i> / <i>Pseudomonas</i>	9,38 abc	325 abcd	83	0,65 abcd	35 abcdef
B21	<i>Bacillus</i>	9,81 abc	350 abcd	82	0,70 abcd	36 cdefg
P58	<i>Pseudomonas</i>	10,20 abcd	353 abcd	82	0,71 abcd	35 abcde
B21 P52	<i>Bacillus</i> / <i>Pseudomonas</i>	9,00 abc	369 abcd	81	0,74 abcd	41 abcdef
TR	Testigo referencial	9,08 abc	1956 j	0	3,91 j	216 i

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

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

Ocho semanas después de protegidas las plantas con los agentes biológicos, se encontraron diferencias altamente significativas ($p \leq 0,0001$) en las variables de promoción de crecimiento representadas por peso de raíz y peso total de la planta, al comparar los tratamientos con el testigo absoluto y el testigo químico; a excepción de las plantas protegidas con la inoculación individual de *Pseudomonas* P58 (Cuadro 16). Veinte de los tratamientos evaluados presentaron un incremento en el peso radical de 26 a 58% en comparación con el testigo absoluto (TA), alcanzando valores que oscilaron entre 7,59 y 9,50g en comparación con 6,03g del TA. Asimismo, plantas protegidas con inoculaciones combinadas de agentes biológicos presentaron un mejor efecto en la promoción de crecimiento que la inoculación de los mismos agentes por separado. Por otra parte, no se encontraron diferencias significativas entre el testigo químico y el TA. El tratamiento 30, correspondiente a la combinación de dos aislamientos del género *Pseudomonas*, fue el que presentó los valores más altos en las variables de promoción de crecimiento con un incremento en el peso de raíz y peso total de la planta de 58 y 13% respectivamente, con respecto al TA.

Cuadro 16. Efecto de las inoculaciones individuales y combinadas de bacterias y hongos endofíticos sobre la promoción de crecimiento de vitroplantas cv. “Gran Enano”, después de ocho semanas de crecimiento en invernadero

Trata.	Cod.	Género	Peso Total (g)	Peso foliar (g)	Peso raíz (g)
30	P52 P58	<i>Pseudomonas/Pseudomonas</i>	38,53 fgh	29,03 efghij	9,50 i
28	B31 P52	<i>Bacillus/Pseudomonas</i>	40,41 h	31,08 j	9,34 hi
26	B21 P52	<i>Bacillus/Pseudomonas</i>	37,83 efgh	29,26 fghij	8,56 ghi
23	E2 P52	<i>T. atroviride/Pseudomonas</i>	35,15 bcdefg	26,71 abcdef	8,44 ghi
3	E1	<i>T. atroviride</i>	38,36 fgh	29,93 ghij	8,44 ghi
2	E4	<i>F. oxysporum</i>	33,26 abcd	24,96 a	8,30 ghi
13	E4 B21	<i>F. oxysporum/Bacillus</i>	46,83 i	38,54 k	8,29 ghi
11	E3 P52	<i>F. oxysporum/Pseudomonas</i>	36,59 defgh	28,30 bcdefghij	8,29 ghi
4	E2	<i>T. atroviride</i>	33,43 abcd	25,16 ab	8,27 ghi
14	E4 B31	<i>F. oxysporum/Bacillus</i>	38,90 gh	30,65 ij	8,25 ghi
5	B21	<i>Bacillus</i>	33,14 abcd	24,91 a	8,23 ghi
25	B21 B31	<i>Bacillus/Bacillus</i>	38,49 fgh	30,33 hij	8,16 ghi
10	E3 B31	<i>F. oxysporum/Bacillus</i>	36,25 defg	28,11 bcdefghij	8,14 fghi
16	E4 P58	<i>F. oxysporum/Pseudomonas</i>	34,04 abcde	26,01 abcde	8,03 fghi
27	B21 P58	<i>Bacillus/Pseudomonas</i>	34,71 bcdef	26,75 abcdef	7,96 efghi
20	E1 P58	<i>T. atroviride/Pseudomonas</i>	38,54 fgh	30,66 ij	7,88 efgh
6	B31	<i>Bacillus</i>	34,09 abcde	26,28 abcdef	7,81 efgh
12	E3 P58	<i>F. oxysporum/Pseudomonas</i>	36,41 defgh	28,74 defghij	7,68 defg
17	E1 B21	<i>T. atroviride/Bacillus</i>	36,04 defg	28,40 cdefghij	7,64 defg
19	E1 P52	<i>T. atroviride/Pseudomonas</i>	35,05 bcdefg	27,46 abcdefgh	7,59 defg
29	B31 P58	<i>Bacillus spp./Pseudomonas</i>	34,06 abcde	26,58 abcdef	7,49 cdefg
22	E2 B31	<i>T. atroviride/Bacillus</i>	35,55 cdefg	28,10 bcdefghij	7,45 cdefg
9	E3 B21	<i>F. oxysporum/Bacillus</i>	34,10 abcde	26,71 abcdef	7,39 cdefg
18	E1 B31	<i>T. atroviride/Bacillus</i>	34,84 bcdefg	27,57 abcdefghi	7,27 cdefg
1	E3	<i>F. oxysporum</i>	34,06 abcde	26,98 abcdefg	7,09 bcdefg
15	E4 P52	<i>F. oxysporum/Pseudomonas</i>	34,84 bcdefg	27,79 abcdefghi	7,06 bcdefg
24	E2 P58	<i>T. atroviride/Pseudomonas</i>	32,75 abcd	26,15 abcde	6,60 bcdef
21	E2 B21	<i>T. atroviride/Bacillus</i>	33,95 abcde	27,49 abcdefgh	6,46 abcde
7	P52	<i>Pseudomonas</i>	31,84 abc	25,63 abc	6,21 abcd
	TA	Testigo absoluto	34,06 abcde	28,04 bcdefghij	6,03 abc
	TQ	Testigo químico	31,48 ab	25,93 abcd	5,55 ab
8	P58	<i>Pseudomonas</i>	30,33 a	25,34 ab	4,99 a

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

En cuanto a la caracterización morfológica realizada con el programa WinRhizo, se encontraron diferencias altamente significativas para las variables longitud, diámetro, volumen y área superficial del sistema radical ($p \leq 0,0001$) al comparar las plantas protegidas con agentes biológicos y el testigo absoluto (TA). Las inoculaciones combinadas presentaron un mejor efecto en el desarrollo de las raíces que la inoculación de los mismos agentes por separado. Además, no se encontraron diferencias significativas entre el TA y el testigo químico (TQ).

De los 30 tratamientos correspondientes a inoculaciones individuales y combinadas de los agentes biológicos, 14 presentaron un incremento en la longitud radical de 25 a 54% con respecto al TA ($1271,07\text{cm}/\text{m}^3$), con valores que oscilaron entre $1588,25$ y $1957,91\text{cm}/\text{m}^3$. Asimismo, 8 tratamientos fueron estadísticamente diferentes al TA en la variable diámetro radical en un rango de $0,88$ a $0,90\text{mm}$. En lo que respecta a la variable volumen radical, 20 tratamientos presentaron diferencias altamente significativas con respecto al TA con valores de $8,53$ a $10,98\text{cm}^3$. Finalmente, para la variable área superficial del sistema radical las diferencias se presentaron en 18 tratamientos en un rango de $403,56$ a $510,15\text{cm}^2$. En todos los casos, las inoculaciones combinadas presentaron un mejor efecto que la aplicación individual de los agentes biológicos. Los mejores resultados se obtuvieron con las combinaciones bacteria-bacteria.

Cuadro 17. Efecto de las inoculaciones individuales y combinadas de bacterias y hongos endofíticos en el crecimiento y desarrollo del sistema radical de vitroplantas analizadas mediante el software WinRhizo

Trata. Cod.	Género	Longitud (cm/m3)	Diametro (mm)	Volumen (cm3)	Área Superficial (cm2)
27 B21 P58	<i>Bacillus/Pseudomonas</i>	1957,91 o	0,80 abc	10,00 ijkl	494,64 ij
4 E2	<i>T. atroviride</i>	1946,00 no	0,78 ab	9,41 efghijkl	479,11 hij
30 P52 P58	<i>Pseudomonas/Pseudomonas</i>	1893,01 mno	0,84 bcdefgh	10,50 kl	499,07 ij
3 E1	<i>T. atroviride</i>	1889,22 mno	0,86 cdefghi	10,98 l	510,15 j
18 E1 B31	<i>T. atroviride/Bacillus</i>	1868,40 lmno	0,83 bcdef	10,25 jkl	489,86 ij
25 B21 B31	<i>Bacillus/Bacillus</i>	1851,28 klmno	0,84 bcdefgh	10,31 jkl	489,04 ij
28 B31 P52	<i>Bacillus/Pseudomonas</i>	1771,42 jklmno	0,87 efghi	10,63 kl	486,05 ij
20 E1 P58	<i>T. atroviride/Pseudomonas</i>	1691,40 ijklmno	0,86 cdefghi	9,91 hijkl	458,5 ghij
5 B21	<i>Bacillus</i>	1673,44 hijklmno	0,85 cdefghi	9,63 fghijkl	449,21 fghij
2 E4	<i>F. oxysporum</i>	1663,45 hijklmno	0,87 defghi	9,86 hijkl	453,22 ghij
11 E3 P52	<i>F. oxysporum/Pseudomonas</i>	1656,38 ghijklmn	0,84 bcdefg	9,30 defghijkl	439,36 efghij
24 E2 P58	<i>T. atroviride/Pseudomonas</i>	1635,42 fghijklm	0,75 a	7,49 abcd	400,11 abcdefgh
1 E3	<i>F. oxysporum</i>	1601,29 efghijklm	0,80 abc	8,10 abcdefgh	403,56 abcdefgh
23 E2 P52	<i>T. atroviride/Pseudomonas</i>	1588,25 defghijkl	0,86 cdefghi	9,19 defghijkl	427,18 cdefghi
10 E3 B31	<i>F. oxysporum/Bacillus</i>	1567,53 cdefghijkl	0,89 fghi	9,71 ghijkl	434,16 defghij
16 E4 P58	<i>F. oxysporum/Pseudomonas</i>	1561,65 cdefghijkl	0,89 fghi	9,52 fghijkl	431,04 cdefghi
29 B31 P58	<i>Bacillus spp./Pseudomonas</i>	1561,51 cdefghijkl	0,88 efghi	9,44 fghijkl	429,57 cdefghi
12 E3 P58	<i>F. oxysporum/Pseudomonas</i>	1557,12 cdefghijk	0,87 defghi	9,35 efghijkl	426,29 cdefghi
26 B21 P52	<i>Bacillus/Pseudomonas</i>	1537,95 bcdefghij	0,90 hi	9,76 ghijkl	433,9 defghij
15 E4 P52	<i>F. oxysporum/Pseudomonas</i>	1489,92 abcdefghij	0,85 cdefghi	8,49 abcdefghij	398,05 abcdefgh
22 E2 B31	<i>T. atroviride/Bacillus</i>	1464,80 abcdefghi	0,84 bcdefgh	8,21 abcdefghi	387,75 abcdefg
19 E1 P52	<i>T. atroviride/Pseudomonas</i>	1443,40 abcdefghi	0,88 fghi	8,83 cdefghijk	399,89 abcdefgh
17 E1 B21	<i>T. atroviride/Bacillus</i>	1426,92 abcdefghi	0,90 i	8,98 cdefghijk	400,91 abcdefgh
9 E3 B21	<i>F. oxysporum/Bacillus</i>	1389,85 abcdefgh	0,86 cdefghi	7,96 abcdefg	372,34 abcdef
14 E4 B31	<i>F. oxysporum/Bacillus</i>	1361,73 abcdefg	0,90 fghi	8,53 bcdefghij	380,43 abcdefg
6 B31	<i>Bacillus</i>	1333,10 abcdef	0,87 defghi	7,83 abcdef	360,63 abcde
21 E2 B21	<i>T. atroviride/Bacillus</i>	1330,94 abcdef	0,86 cdefghi	7,50 abcde	353,09 abcd
TQ	Testigo químico	1326,73 abcde	0,82 bcde	6,88 ab	337,63 ab
7 P52	<i>Pseudomonas</i>	1300,57 abcd	0,81 abcd	6,62 a	328,5 ab
TA	Testigo absoluto	1271,07 abc	0,82 bcde	6,58 a	323,38 a
13 E4 B21	<i>F. oxysporum/Bacillus</i>	1247,55 ab	0,90 ghi	7,89 abcdefg	351,27 abc
8 P58	<i>Pseudomonas</i>	1238,37 a	0,87 defghi	7,15 abc	332,68 ab

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

Los diez mejores tratamientos fueron seleccionados con base en su efecto sobre la promoción de crecimiento representado en las variables peso total y peso radical. Los valores registrados estuvieron en un rango de 35,15 a 46,83g para peso total y de 7,88 a 9,50g para peso radical, superando al testigo absoluto que presentó valores de 34,06g y 6,03g, y al testigo químico que

con valores de 31,48 y 5,55g para peso total y peso radical, respectivamente (cuadro 18). Por otra parte, para las variables analizadas mediante WinRhizo, representadas principalmente por diámetro y volumen del sistema radical, los diez tratamientos presentaron valores superiores que el testigo absoluto y el testigo químico, con valores que oscilaron entre 0,84 y 0,90 mm para diámetro radical y entre 7,89 y 10,50cm³ para volumen radical. Para la variable longitud radical nueve de los diez tratamientos presentaron valores superiores al testigo absoluto y testigo químico, oscilando entre 1361,73 y 1893,01cm/m³ (Cuadro 18).

Cuadro 18. Selección de los mejores diez tratamientos con base en el efecto sobre la promoción de crecimiento de vitroplantas cv. "Gran Enano", después de ocho semanas de crecimiento en invernadero

Trata.	Cod.	Género	Peso Total (g)	Peso raíz (g)	Longitud/volumen (cm/m ³)	Diametro (mm)	Volumen (cm ³)
30	P52 P58	<i>Pseudomonas /Pseudomonas</i>	38,53 fgh	9,50 i	1893,01 mno	0,84 bcdefgh	10,50 kl
28	B31 P52	<i>Bacillus /Pseudomonas</i>	40,41 h	9,34 hi	1771,42 jklmno	0,87 efghi	10,63 kl
26	B21 P52	<i>Bacillus /Pseudomonas</i>	37,83 efgh	8,56 ghi	1537,95 bcdefghij	0,90 hi	9,76 ghijkl
23	E2 P52	<i>T. atroviride /Pseudomonas</i>	35,15 bedefg	8,44 ghi	1588,25 defghijkl	0,86 cdefghi	9,19 defghijkl
13	E4 B21	<i>F. oxysporum /Bacillus</i>	46,83 i	8,29 ghi	1247,55 ab	0,90 ghi	7,89 abcdefg
11	E3 P52	<i>F. oxysporum /Pseudomonas</i>	36,59 defgh	8,29 ghi	1656,38 ghijklmn	0,84 bcdefg	9,30 defghijkl
14	E4 B31	<i>F. oxysporum /Bacillus</i>	38,90 gh	8,25 ghi	1361,73 abcdefg	0,90 fghi	8,53 bcdefghij
25	B21 B31	<i>Bacillus /Bacillus</i>	38,49 fgh	8,16 ghi	1851,28 klmno	0,84 bcdefgh	10,31 jkl
10	E3 B31	<i>F. oxysporum /Bacillus</i>	36,25 defg	8,14 fghi	1567,53 cdefghijkl	0,89 fghi	9,71 ghijkl
20	E1 P58	<i>T. atroviride /Pseudomonas</i>	38,54 fgh	7,88 efgh	1691,40 ijklmno	0,86 cdefghi	9,91 hijkl
	TA	Testigo absoluto	34,06 abcde	6,03 abc	1271,07 abc	0,82 bcde	6,58 a
	TQ	Testigo químico	31,48 ab	5,55 ab	1326,73 abcde	0,82 bcde	6,88 ab

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

4. Discusión

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

Está completamente comprobado que inoculaciones individuales de hongos endofíticos del género *Trichoderma* y cepas no patogénicas de *Fusarium* reducen significativamente la penetración de *R. similis* en el sistema radical de plantas del subgrupo Cavendish (Pocasangre 2000, Niere 2001, Vu 2005). En la presente investigación, se registró que el uso de combinaciones de agentes biológicos en la protección de vitroplantas de banano presentó un mejor efecto en la reducción de la penetración de *R. similis* en el sistema radical, en comparación con inoculaciones individuales de cada agente. Resultados similares fueron

documentados por Mendoza *et al.* (2006) quienes encontraron que la combinación de *Paecilomyces lilacinus* cepa 251 con *Fusarium oxysporum* cepa 162 redujo significativamente la penetración de *R. similis* en comparación con las inoculaciones individuales de cada uno de los hongos. Los mismos autores demostraron que *P. lilacinus* tiene un efecto de parasitismo, que la cepa no patogénica de *F. oxysporum* tiene un efecto de inducción de resistencia y que el efecto aditivo de ambos mecanismos de acción es el responsable de la reducción de la penetración del nematodo. Por otra parte, zum Felde *et al.* (2006) sugieren que el efecto de los hongos endofíticos sobre la penetración de los nematodos está relacionado con un proceso de repelencia, el cual evita que el nematodo se adhiera al sistema radical y luego penetre al interior de las raíces. De igual manera, los mismos autores consideran que la repelencia a la penetración es un mecanismo de biocontrol más plausible que el propio biocontrol que se da al interior de las raíces de la planta.

En la presente investigación, tanto las combinaciones de *F. oxysporum* con *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. como las combinaciones de *Trichoderma* con *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. fueron capaces de reducir significativamente la penetración de *R. similis* en comparación con el testigo referencial. Estos resultados sugieren que existe un efecto aditivo entre hongos y bacterias que es responsable de la reducción de la penetración del nematodo. Asimismo, es muy probable que mecanismos de repelencia y antibiosis estén asociados con este fenómeno.

En otros cultivos también se ha evidenciado que aislamientos de *Pseudomonas* spp. y *Bacillus* spp. son capaces de producir compuestos volátiles tóxicos y antibióticos que pueden afectar a patógenos del suelo. Por ejemplo en tomate, la aplicación de *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *B. sphaericus*, *Agrobacterium radiobacter*, *Pseudomonas fluorescens*, *P. chlororaphis* y *Burkholderia cepacia*, redujo la penetración e inhibió la reproducción de *Meloidogyne incognita* dentro del sistema radical (Jonathan *et al.* 2000). Del mismo modo, Siddiqui *et al.* (2005) encontraron seis aislamientos de rizobacterias *Bacillus* spp. y *Pseudomonas fluorescens* con la habilidad de colonizar las raíces e inhibir la eclosión y la penetración de *Meloidogyne incognita* y *Heterodera* en el cultivo de frijol gandul en India. Padgham y Sikora (2007) documentan más de 40% de reducción en la penetración de *Meloidogyne graminicola* en raíces de arroz con la inoculación de *Bacillus megaterium* en comparación con raíces no tratadas.

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

Los resultados obtenidos en esta investigación demostraron que la combinación de agentes de biocontrol redujo sustancialmente la reproducción de *R. similis* en el sistema radical de las plantas en comparación con el uso individual de cada agente, y que posiblemente los mecanismos de acción sean distintos entre los agentes de biocontrol evaluados, lo cual resulta en un efecto aditivo y sinérgico de biocontrol. Resultados similares fueron documentados por zum Felde *et al.* (2006), quienes trabajaron con inoculaciones individuales y combinadas de los mismos hongos endofíticos evaluados en la presente investigación contra *R. similis* en plantas de banano cv. “Williams” y encontraron que plantas protegidas con combinaciones de dos o más aislamientos presentaron reducciones en la reproducción del nematodo entre 80 y 86% en comparación con 62 a 73% de las inoculaciones individuales. De igual manera, otros autores sugieren que el uso de combinaciones de dos o más agentes puede resultar en una supresión más eficaz y persistente contra los patógenos, ya que sus mecanismos de acción combinados les confiere un efecto antagonista aditivo y/o sinérgico (Pierson y Weller 1994, Raupach y Kloepper 1998, Guetsky *et al.* 2001, Meyer y Roberts 2002).

Está completamente establecido que cepas de *Pseudomonas* spp. y cepas no patogénicas de *Fusarium* spp. han sido eficaces en el control de patógenos del suelo en varios cultivos. Por ejemplo, en el combate de la marchites causada por *Fusarium* en pepino, Park *et al.* (1988) demostraron que la combinación de aislamientos de *Pseudomonas fluorescens* y cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum* redujo la incidencia de la enfermedad, pero fueron inefectivas cuando se aplicaron por separado. La presencia de *F. oxysporum* no patogénico parece aumentar la producción de exudados radicales, los cuales incrementan la densidad de *P. fluorescens*, que a su vez reduce la germinación de clamidosporas de *F. oxysporum* patogénico en la rizosfera de las plantas de pepino. Lemanceau *et al.* (1993) hallaron que la combinación de un aislamiento de *F. oxysporum* no patogénico, el cual compite por carbohidratos, y una cepa de *P. putida*, que compite por hierro, causó un mayor porcentaje de reducción de la marchites causada por *Fusarium*, en comparación con la aplicación individual de cada agente.

Existen diferentes mecanismos por medio de los cuales los microorganismos endofíticos actúan como antagonistas de nematodos fitoparásitos. Sin duda, uno de los principales mecanismos de acción involucra la producción de metabolitos secundarios tóxicos para los fitonematodos (Carrol 1988, Sharon *et al.* 2001, Mena *et al.* 2003, Athman *et al.* 2006). Hallmann y Sikora (1996) demostraron que un aislamiento endofítico de *Fusarium oxysporum* de tomate produjo toxinas contra *Meloidogyne incongnita in vitro*. Padgham y Sikora (2007) encontraron que metabolitos secundarios producidos por *B. megaterium* redujeron significativamente la eclosión de huevos de *M. graminicola in vitro* en comparación con el testigo. Sikora *et al.* (2003) sugieren que la producción de metabolitos tóxicos dentro de la planta, no sólo paraliza el nematodo sino que también inhibe el proceso de infección y la búsqueda de alimentación del patógeno, provocando su muerte. Es posible que aún cuando no establecieran contacto directo con el nematodo, la producción de toxinas de los agentes biológicos pueda inducir mecanismos de defensa en la planta (Pocasangre *et al.* 2004, Athman *et al.* 2006). Sin embargo, existe poca información disponible sobre las toxinas específicas involucradas en la actividad antagonista, tanto de hongos como de bacterias, contra los nematodos.

El parasitismo es otra forma de control que ejercen los endofíticos contra los nematodos. Pocasangre (2002) encontró que cuatro aislamientos endofíticos élite de *Fusarium* y *Trichoderma* fueron capaces de parasitar larvas de *R. similis* en 24 horas de cocultivo. Asimismo, Meneses (2003) estudió el potencial antagonista de hongos endofíticos contra *R. similis* y encontró que la mayoría de los aislamientos evaluados tuvo actividad nematicida superior al 70%. Además, indica que los tratamientos pertenecientes al género *Fusarium* inmovilizan el nematodo con el micelio y generan sustancias que provocan la desintegración del nematodo, mientras que los aislamientos del género *Trichoderma* presentaron un involucramiento miceliar agresivo que paraliza al nematodo pero sin evidenciar algún tipo de destrucción del mismo. Athman *et al.* (2006) demostraron que aislamientos endofíticos de *F. oxysporum*, obtenidos de raíces y cormos de banano, causaron la parálisis y muerte en los estadios móviles de *R. similis* e inhibieron la eclosión de los huevos del nematodo en pruebas *in vitro*.

La inoculación múltiple de agentes biológicos representa una estrategia de control de *R. similis* que podría, incluso, afectar otros patógenos a la vez, ya que se ha demostrado que existen aislamientos con potencial antagonista contra más de un patógeno (Gold y Dubois 2005). Por ejemplo, Dubois *et al.* (2004) encontraron que el aislamiento V5w2 de *F. oxysporum* puede actuar contra *Cosmopolites sordidus in vitro* y contra *R. similis in vitro e in vivo*. Adicionalmente, la inoculación múltiple de agentes biológicos, con efectos de biocontrol similares o incluso mejores a los obtenidos con la aplicación de Terbufos 10GR, podría constituir una importante opción dentro de una estrategia de manejo integrado de nematodos, ya que la inoculación temprana de plantas derivadas del cultivo de tejidos puede complementar los beneficios del uso de material limpio, garantizando la protección de la planta desde su interior, previniendo la penetración y reproducción de los nematodos, especialmente en las primeras etapas del cultivo (Pocasangre *et al.* 2004, Gold y Dubois 2005). En el caso de sistemas de producción orgánica, la estrategia de protección temprana del material de siembra se complementa con la aplicación de enmiendas al suelo que, además de incrementar la disponibilidad de nutrientes en el suelo, puede mejorar los mecanismos de acción de los agentes biológicos, tales como la competencia, la depredación y la antibiosis, generando un efecto importante en el crecimiento radical y en el desarrollo de la planta (Chen *et al.* 2000, Tabora *et al.* 2002, Marín 2003).

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

Los resultados de esta investigación demostraron que la mayoría de los tratamientos de plantas protegidas con agentes biológicos presentaron un incremento altamente significativo en variables como peso radical (g) y peso total (g) de la planta. Este efecto de los endofíticos en la promoción de crecimiento de las plantas, en ausencia de nematodos, fue señalado por Pocasangre (2002), quien halló que el peso radical y peso total de las plantas fue incrementado significativamente en plantas inoculadas con hongos endofíticos en comparación con el testigo absoluto. Resultados similares fueron documentados por zum Felde (2002), quien encontró que plantas inoculadas con aislamientos endofíticos del género *Trichoderma* y *Fusarium* incrementaron el peso radical y foliar de plantas de banano en un 35 y 19% respectivamente, en comparación con plantas no inoculadas. Asimismo, Meneses (2003) demostró que plantas de banano cv. “Gran Enano”, protegidas con inoculaciones

individuales de hongos endofíticos, presentaron un incremento promedio en el peso radical y peso foliar de 39 y 29% respectivamente, comparando con el testigo absoluto. Por su parte, Cañizares (2003) encontró un incremento de 24% en el peso radical de plantas protegidas con el aislamiento *Fusarium oxysporum* S9 en comparación con el testigo absoluto.

La caracterización radical realizada en esta investigación, mediante el programa WinRhizo, demostró, una vez más, que las inoculaciones combinadas de los agentes de biocontrol tienen un mejor efecto que la inoculación de cada agente por separado. Los tratamientos de inoculación combinada registraron un incremento en las variables de longitud, volumen, diámetro y área superficial del sistema radical en comparación con el testigo absoluto y el testigo químico. La longitud de las raíces fue considerada una de las variables más importantes en este estudio, ya que de acuerdo con Turner (2003) la longitud cuantifica la capacidad que tiene el sistema radical de explorar en el suelo en busca de agua y nutrientes para su desarrollo. Asimismo, Pocasangre *et al.* 2004 sugieren que a mayor superficie de exploración y absorción de nutrientes del sistema radical, mayor efecto en el vigor general de las plantas.

Está ampliamente documentado que los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus* son las bacterias más frecuentemente aisladas de la rizosfera y tienen un efecto sobre la promoción de crecimiento en varios cultivos de importancia económica (Sikora 1992). Los resultados de esta investigación demostraron que las combinaciones de *Pseudomonas-Pseudomonas* y *Pseudomonas-Bacillus* presentaron los mejores incrementos en las variables de promoción de crecimiento representadas por peso, longitud, diámetro, volumen y área superficial del sistema radical. Por otra parte, el efecto individual de cada una de las bacterias no presentó un incremento significativo en la promoción de crecimiento de las plantas. Esto confirma la importancia de las interacciones positivas entre los agentes de biocontrol. De igual forma, el testigo químico no manifestó ningún efecto en la promoción de crecimiento de las plantas, lo cual sugiere que los nematicidas no estimulan el crecimiento de la planta de banano en ausencia de *R. similis*. Por otra parte, cuando se han registrado efectos de promoción de crecimiento de los nematicidas, probablemente se ha debido a que el nematicida tiene efecto en el control de los nematodos y por lo tanto, la planta logra desarrollarse mejor en comparación con plantas no tratadas.

5. Conclusiones

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

- Todos los tratamientos con agentes de biocontrol presentaron porcentajes de penetración de *Radopholus similis* en un rango de 3 a 26% con diferencias estadísticas en comparación con el testigo referencial (TR) que presentó un 29% de penetración.
- Las inoculaciones combinadas presentaron mejor efecto en la reducción de la penetración de *Radopholus similis* que las inoculaciones individuales.
- Los tratamientos E4P58, E4B31, E4P52, B31, E1B21 y E2P58 presentaron porcentajes de penetración iguales o inferiores al testigo químico (TQ), oscilando entre 3 y 5%. Los dos mejores tratamientos fueron E4P58, E4B31 con 3,12% y 3,75%, respectivamente, en comparación con el TQ que presentó un 5% y el TR que presentó un 29,37%.
- Veintiocho de los treinta tratamientos evaluados con agentes biológicos (93%) presentaron un efecto estadísticamente similar al TQ y diferente al TR, con porcentajes de penetración entre 3 y 18%.

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

- Existe un efecto aditivo y/o sinérgico en el uso combinado de los agentes biológicos contra *Radopholus similis* bajo las condiciones de esta investigación.
- Con excepción de la inoculación individual con *Bacillus* spp. B31, que presentó un 92% de biocontrol, las combinaciones de hongos y bacterias presentaron un mejor efecto de biocontrol de *R. similis* en comparación con el uso de cada agente por separado. Destacándose los tratamientos E1P58, E1P52 y E2P52 con 93, 93, y 88% respectivamente.
- En las combinaciones hongo-bacteria, los aislamientos del género *Trichoderma* presentaron mejor efecto de biocontrol que los aislamientos de *Fusarium*,

independientemente de la bacteria asociada. *Trichoderma* en combinación con *Pseudomonas* presentó un 93% de biocontrol en tanto *Fusarium* presentó un máximo de 75% en combinación con *Pseudomonas*.

- Veintiún tratamientos presentaron entre 62 y 93% de biocontrol, similar al testigo químico que presentó un 88%, de los cuales quince correspondieron a inoculaciones combinadas y seis fueron aplicaciones individuales de los agentes de biocontrol.
- El efecto de biocontrol de los aislamientos de *Pseudomonas* fue superior al de *Bacillus*, tanto por su efecto individual como por su actividad antagonista en combinaciones hongo-bacteria (HB) y bacteria-bacteria (BB).
- Los diez mejores tratamientos presentaron actividad de biocontrol superior a 80% y tasa de reproducción de *R. similis* inferior a 1, en comparación con el testigo referencial que presentó una tasa de reproducción de 3,91.

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

- Las combinaciones HB y BB presentaron mayor peso radical y peso total de planta que las inoculaciones individuales de cada microorganismo, en comparación con el testigo absoluto (TA). Sobresaliendo los tratamientos P52P58, B31P52 y B21P52 con 9,50g 9,34g y 8,56g en peso radical y 38,53g 40,41g y 37,83g en peso total de la planta, respectivamente.
- Veinte de los tratamientos evaluados presentaron un incremento en el peso radical de 26 a 58% con respecto al TA, alcanzando valores que oscilaron entre 7,59 y 9,50g en comparación con 6,03g del TA.
- La caracterización radical mediante el programa WinRhizo detectó que las combinaciones BB y HB presentaron mejor efecto de promoción de crecimiento representado por las variables longitud, diámetro, volumen y área superficial del sistema radical, en comparación con las inoculaciones individuales de cada aislamiento.

- Los diez mejores tratamientos correspondieron a inoculaciones combinadas hongo-bacteria y bacteria-bacteria, presentando incrementos significativos en longitud, diámetro, volumen y área superficial del sistema radical. Alcanzando valores que oscilan entre 7,88 y 9,50g para peso de raíz, entre 1247,55 y 1893,01cm³ para longitud, entre 0,84 y 0,90mm para diámetro, y entre 7,89 y 10,63cm³ para volumen del sistema radical.
- La aplicación de nematicida Terbufos 10GR, en ausencia de nematodos, no presentó ningún efecto en la promoción de crecimiento de las plantas bajo las condiciones de este estudio.
- Existe un efecto aditivo y/o sinérgico en el uso combinado de los agentes biológicos en la promoción de crecimiento de las plantas en ausencia de los nematodos.

6. Recomendaciones generales

- Realizar estudios de caracterización de los metabolitos secundarios que son producidos por los endofíticos y tienen efecto nematicida contra *R. similis* en el interior de las plantas.
- Se recomienda establecer experimentos de campo para determinar la estabilidad y consistencia del uso de microorganismos endofíticos como estrategia de control biológico de *R. similis* en condiciones de campo.
- Evaluar el efecto de las inoculaciones múltiples con endofíticos más la aplicación de enmiendas orgánicas para determinar si un incremento en la materia orgánica puede potenciar la efectividad del biocontrol contra *R. similis*.
- Pruebas preliminares sugieren que aislamientos de bacterias endofíticas tienen potencial antagonista contra la enfermedad de marchitamiento producida por el hongo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense* (Mal de Panamá). Por lo tanto se recomienda realizar pruebas de biocontrol con los aislamientos de *Bacillus* y *Pseudomonas* evaluados en la presente investigación con el fin de determinar su potencial antagonista contra esta importante enfermedad en el cultivo de banano y plátano.

7. Referencias bibliográficas

- Araya, M; Centeno, M; Carrillo, W. 1995. Densidades poblacionales y frecuencia de los nematodos parásitos del banano (*Musa AAA*) en nueve cantones de Costa Rica. CORBANA 20:6-11.
- 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*). CORBANA 28(55):97-110.
- Athman, SY; Dubois, T; Viljoen, A; Labuschagne, N; Coyne, D; Ragama, P; Gold, CS; Niere, B. 2006. *In vitro* antagonism of endophytic *Fusarium oxysporum* isolates against the burrowing nematode *Radopholus similis*. Nematology 8(4):627-636.
- Cañizares, C. 2003. Estudio sobre poblaciones de hongos endofíticos provenientes de suelos supresivos al nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorne en plantaciones comerciales de plátano en la zona de Talamanca, Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 75 p.
- Carrol, GC. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiont. Ecology 69(1):2-9.
- Chen, J; Abawi, GS; Zuckerman, BM. 2000. Efficacy of *Bacillus thuringiensis*, *Paecilomyces marquandii*, and *Streptomyces costaricanus* with and without organic amendments against *Meloidogyne hapla* infecting lettuce. Journal of Nematology 32(1):70-77.
- Dochez, C; Speijer, PR; Hartman, J; Vuylsteke, D; De Waele, D. 2000. Cribado de híbridos de *Musa* para la resistencia a *Radopholus similis*. INFOMUSA 9(2):3-4.
- Dubois, T; Gold, CS; Coyne, D; Papparu, P; Mukwaba, E; Athman, S; Kapinduang, S; Adipala, E. 2004. Merging biotechnology with biological control: banana *Musa* tissue culture plants enhanced by endophytic fungi. Uganda Journal of Agricultural Sciences 9:445-451.
- Gold, CS; Dubois, T. 2005. Novel application methods for microbial control products: IITA's research against banana weevil and burrowing nematode. Biocontrol News and Information 26(3):86-89.
- Gowen, SR; Quénehervé, P. 1990. Nematode parasites of bananas, plantains and abaca. In Luc, M; Sikora, RA; Bridge, J. eds. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Wallingford, UK, CAB International. p 431-460.
- Guetsky, R; Shtienberg, D; Elad, Y; Dinoor, A. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. Phytopathology 91(7):621-627.

- Hallmann, J; Sikora, RA. 1996. Toxicity of fungal endophytic secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant pathogenic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 102:155-162.
- Jonathan, EI; Barker, KR; Abdek-Alim, FF; Vrain, TC; Dickson, DW. 2000. Biological control of *Meloidogyne incognita* on tomato and banana with rhizobacteria, actinomycetes and *Pasteuria penetrans*. *Nematropica* 30(2):231-240.
- Lemanceau, P; Bakker, PAHM; de Kogel, WJ; Alabouvette, C; Schippers, B. 1993. Antagonistic effect of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* Fo47 and pseudobactin 358 upon pathogenic *Fusarium oxysporum* f.sp. dianthi. *Applied and Environmental Microbiology* 59:74-82.
- Marín, DH. 2003. Research in progress and future perspectives on the root system management (abstract). In Turner, DW; Rosales, FE. eds. *Banana root system: towards a better understanding for its productive management*. Proceedings of an international symposium held in San José, Costa Rica, 3-5 November 2003. San José, CR, CORBANA. p. 23.
- Martinuz, A; Pocasangre, LE; Navarro, G. 2007. Economical studies on the use of bionematicides to control the burrowing nematode, *Radopholus similis* in commercial plantation of Costa Rica. In proceeding of ISHS, South Africa (In press).
- Mena, J; Pimentel, E; Veloz, L; Hernández, AT; León, L; Ramírez, Y; Sánchez, I; Mencho, JD; López, A; Pujol, M; Borroto, C; Ramos, E; Alvarez, JM; Marín, M; Jiménez, G; García, G; Pico, VM; Expósito, M; Coca, Y; Gómez, M; Olazabal, A; Hernández, A; Falcón, V; De la Rosa, M; Menéndez, I; Raíces, M. 2003. Aislamiento y determinación de cepas bacterianas con actividad nematicida. Mecanismo de acción de *C. paurometabolum* C-924 sobre nematodos. *Biotecnología Aplicada* 20(4):248-252.
- Mendoza, AR; Sikora, RA; Kiewnick, S. 2006. Effect of the application of antagonistic fungi with different modes of action for the control of *Radopholus similis* in banana. In Asch, F; Becker, M. eds. *Prosperity & poverty in a globalized world: challenges for agricultural research*. Book of abstracts. Bonn, DE, TROPENTAG. p. 188.
- Meneses, 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.
- Meyers, SL; Roberts, DP. 2002. Combinations of biocontrol agents for management of plant-parasitic nematodes and soilborne plant-pathogenic fungi. *Journal of Nematology* 34(1):1-8.
- Niere, BI. 2001. Significance of non-pathogenic isolates of *Fusarium oxysporum* Schlecht.: fries for the biological control of the burrowing nematode *Radopholus similis* (Cobb) Thorne on tissue cultured banana. Ph.D. Thesis. Bonn, DE, University of Bonn. 118 p.

- Nuñez, CT. 2006. Estudio de poblaciones de bacterias endofíticas de la rizosfera del banano para el bicontrol del nematodo barrenador *Radopholus similis*. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 62 p.
- O'Bannon, JH; Taylor, AL. 1968. Migratory endoparasitic nematodes reared on carrot discs. *Phytopathology* 58:385.
- Padgham, JL; Sikora, RA. 2007. Biological control potential and modes of action of *Bacillus megaterium* against *Meloidogyne graminicola* on rice. *Crop Protection* 26:971-977.
- Paparu, P; Dubois, T; Gold, CS; Adipala, E; Niere, B; Coyne, D. 2004. Inoculation, colonization and distribution of fungal endophytes in *Musa* tissue culture plants. *Uganda Journal of Agricultural Sciences* 9:583-589.
- Park, CS; Paulitz, TC; Baker, R. 1988. Biocontrol of *Fusarium* wilt of *Cucumber* resulting from interactions between *Pseudomonas putida* and nonpathogenic isolates of *Fusarium oxysporum*. *Phytopathology* 78(2):190-194.
- Pierson, EA; Weller, DM. 1994. Use of mixtures of fluorescent pseudomonads to suppress Take-all and improve the growth of wheat. *Phytopathology* 84:940-947.
- Pinochet, J. 1986. A note on nematode control practices on bananas in Central America. *Nematropica* 16(2):197-203.
- Pocasangre, LE. 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*). Ph.D. Thesis. Bonn, DE, University of Bonn. 95 p.
- Pocasangre, LE; Sikora, RA; Vilich, V; Schuster, RP. 2000. Encuesta sobre los hongos endofíticos del banano de América Central y el cribado para el control biológico del nematodo barrenador (*Radopholus similis*). *INFOMUSA* 9(1):3-5.
- Pocasangre, LE. 2002. Mejoramiento biológico de vitro plantas de banano mediante la utilización de hongos endofíticos para el control del nematodo barrenador *Radopholus similis*. In Riveros, AS; Pocasangre, LE; Rosales, FE. eds. Taller internacional sobre inducción de resistencia y uso de tecnologías limpias para el manejo de plagas en plantas. Turrialba CR. 27-30 Ago 2002. p. 33-39.
- Pocasangre, LE; zum Felde, A; Cañizares, C; Riveros, AS; Rosales, FE; Sikora, R. 2004. Manejo alternativo de fitonematodos en banano y plátano. In Memorias, XVI reunión internacional de ACORBAT, Oaxaca, MX. p. 106-112.
- 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.

- Raupach, GS; Kloepper, JW. 1998. Mixtures of plant growth-promoting rhizobacteria enhance biological control of multiple cucumber pathogens. *Phytopathology* 88:1158-1164.
- Sharon, E; Bar-Eyal, M; Chet, I; Herrere-Estrella, A; Kleifeld, O; Spiegel, Y. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology* 91:687-693.
- Siddiqui, S; Siddiqui, ZA; Ahmad, I. 2005. Evaluation of fluorescent *Pseudomonad* and *Bacillus* isolates for the biocontrol of a wilt disease complex of pigeon pea. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21:729-732.
- Sikora, RA. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 30:245-270.
- Sikora, RA; Niere, B; Kimenju, J. 2003. Endophytic microbial biodiversity and plant nematode management in African agriculture. *In* Neuenschwander, P; Borgermeister, C; Langewald, J. eds. *Biological control in IPM systems in Africa*. 2 ed. Wallingford, UK, CABI Publishing. p. 179-192.
- Tabora, P; Okumoto, S; Elango, F. 2002. Organic and transition bananas: experience with effective microorganisms (EM). *In* Riveros, AS; Pocasangre, LE; Rosales, FE. eds. *Taller internacional sobre inducción de resistencia y uso de tecnologías limpias para el manejo de plagas en plantas*. Turrialba (Costa Rica). 27-30 Ago 2002. p. 33-39.
- Turner, DW. 2003. Factors affecting the physiology of the banana root system. *In* Turner, DW; Rosales, FE. eds. *Banana root system: towards a better understanding for its productive management*. Proceedings of an international symposium held in San José, Costa Rica, 3-5 November 2003. San José, CR, CORBANA. p. 107-113.
- Vu, TT. 2005. Modes of action of non-pathogenic *Fusarium oxysporum* endophytes for bio-enhancement of banana toward *Radopholus similis*. Ph.D. Thesis, Bonn, DE, University of Bonn. 101 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. Thesis. Bonn, DE, University of Bonn. 53 p.
- zum Felde, A; Pocasangre, LE; Cañizares Monteros, CA; Sikora, RA; Rosales, FE; Riveros, AS. 2006. Efecto de inoculaciones combinadas de hongos endofíticos en el biocontrol de *Radopholus similis*. *Infomusa* 15(1-2):12-18.

VII. ANEXOS

Anexo 1. Análisis de varianza para porcentaje de colonización de bacterias endofíticas en vitroplantas de banano cv. “Gran Enano” con inoculaciones combinadas hongo-bacteria

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% B	48	0,35	0,00	16,03

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	3507,29	17	206,31	0,95	0,5338
Tratamiento	1975,00	15	131,67	0,60	0,8480
Sección	1532,29	2	766,15	3,52	0,0424
Error	6534,38	30	217,81		
Total	10041,67	47			

Anexo 2. Análisis de varianza para porcentaje de colonización de hongos endofíticos en vitroplantas de banano cv. “Gran Enano” con inoculaciones combinadas hongo-bacteria

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% H	48	0,77	0,64	50,08

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	45375,52	17	2669,15	5,92	<0,0001
Tratamiento	11949,48	15	796,63	1,77	0,0900
Sección	33426,04	2	16713,02	37,07	<0,0001
Error	13523,96	30	450,80		
Total	58899,48	47			

Anexo 3. Análisis de varianza para porcentaje de colonización de bacterias endofíticas en vitroplantas de banano cv. “Gran Enano” con inoculaciones combinadas bacteria-bacteria

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% B	42	0,32	0,20	18,86

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	4890,48	6	815,08	2,76	0,0267
Tratamiento	4890,48	6	815,08	2,76	0,0267
Error	10350,00	35	295,71		
Total	15240,48	41			

Anexo 4. Análisis de varianza para penetración de *Radopholus similis* en el sistema radical de las vitroplantas de banano cv. “Gran Enano” con inoculaciones individuales y combinadas de los bacterias y hongos endofíticos

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
%Penetración	256	0,41	0,31	75,32

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	10424,22	38	274,32	4,01	<0,0001
Trata	10080,86	31	325,19	4,76	<0,0001
Réplica	343,36	7	49,05	0,72	0,6571
Error	14831,64	217	68,35		
Total	25255,86	255			

Anexo 5. Análisis de varianza para biocontrol de *Radopholus similis* en el sistema radical de las vitroplantas de banano cv. “Gran Enano” con inoculaciones individuales y combinadas de los agentes biológicos

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
R.similis	253	0,56	0,48	69,74

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	70349532,97	38	1851303,50	7,04	<0,0001
TRAT	67383381,48	31	2173657,47	8,26	<0,0001
REP	2966151,50	7	423735,93	1,61	0,1336
Error	56293960,11	214	263055,89		
Total	126643493,08	252			

Anexo 6. Análisis de varianza para la variable peso radical, promoción de crecimiento

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Peso Raíz	251	0,31	0,21	20,81

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	244,93	31	7,90	3,13	<0,0001
Trata	244,93	31	7,90	3,13	<0,0001
Error	552,53	219	2,52		
Total	797,46	250			

Anexo 7. Análisis de varianza para longitud radical (WinRhizo), promoción de crecimiento

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Longitud	251	0,36	0,27	19,29

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	11064949,17	31	356933,84	3,91	<0,0001
Trata	11064949,17	31	356933,84	3,91	<0,0001
Error	19968912,96	219	91182,25		
Total	31033862,13	250			

Anexo 8. Análisis de varianza para la variable diámetro radical (WinRhizo), promoción de crecimiento

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diametro	251	0,27	0,17	7,32

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0,32	31	0,01	2,67	<0,0001
Trata	0,32	31	0,01	2,67	<0,0001
Error	0,85	219	3,9E-03		
Total	1,17	250			

Anexo 9. Análisis de varianza para la variable volumen radical (WinRhizo), promoción de crecimiento

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Volumen	251	0,32	0,22	21,17

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	364,61	31	11,76	3,31	<0,0001
Trata	364,61	31	11,76	3,31	<0,0001
Error	778,31	219	3,55		
Total	1142,92	250			

Anexo 10. Análisis de varianza para la variable área superficial del sistema radical (WinRhizo), promoción de crecimiento

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Area superficial	251	0,34	0,25	19,20

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	729290,76	31	23525,51	3,66	<0,0001
Trata	729290,76	31	23525,51	3,66	<0,0001
Error	1408286,44	219	6430,53		
Total	2137577,20	250			

Anexo 11. Protocolo de procesamiento de muestras de raíz para estudios histológicos

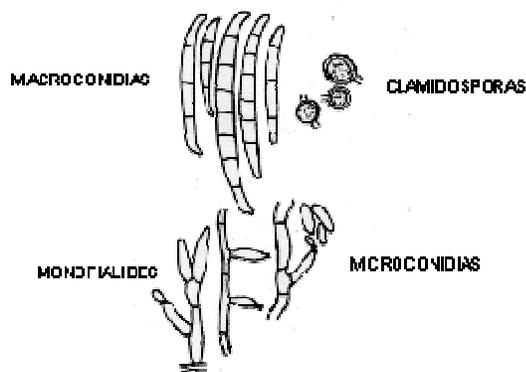
- Clasificar las muestras de raíz en raíces de primero, segundo y tercer orden.
- Tomar secciones de cada muestra de aproximadamente 1cm. de largo.
- Colocar las muestras en viales con FAA, debidamente identificados, durante 48 horas
- Deshidratar en una serie ascendente de etanol (50-70-80-90-95-100) durante una hora en cada uno de ellos
- Colocar en historesina a 4°C durante 12 horas
- Preparar los bloques
- Cortar a 4 micras de grosor en el micrótopo rotatorio
- Teñir las láminas en resina con Toluidina azul al 1% (colorante de uso general)
- Observar al microscopio

Anexo 12. Preparación del fijador FAA (Formaldehído, ácido acético, alcohol)

Se recomienda para tejidos de planta en general. Se utiliza a temperatura ambiente.

Alcohol etílico (95%)..... 50 ml.
Acido acético glacial..... 5 ml.
Formaldehído (37-40%)..... 10 ml.
Agua..... 35 ml.

Anexo 13. Características microscópicas de *Fusarium oxysporum*



Fuente: Control Calidad SEIMC. Disponible en http://www.seimc.org/control/revi_Mico/fusarium.htm