

**CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE EDUCACIÓN PARA EL DESARROLLO Y LA
CONSERVACIÓN
ESCUELA DE POSGRADO**

**UTILIZACIÓN DE HONGOS ENDOFÍTICOS PROVENIENTES DE
DE BANANO ORGÁNICO PARA EL CONTROL BIOLÓGICO
DEL NEMÁTODO BARRENADOR *Radopholus similis* Cobb, Thorne.**

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

Magíster Scientiae

Por

Anabella Meneses Hernández

**Turrialba, Costa Rica
2003**

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

MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:

Luis E. Pocasangre, Ph.D.
Consejero Principal

Eduardo Somarriba, Ph.D.
Miembro Comité Consejero

Alba Stella Riveros, Ph.D.
Miembro Comité Consejero

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

Dedicatoria

A Dios,

a mis padres Antonio y Ana María.

A mis hermanos, Tonito, Silvia y Ana Lucía,

a mi abuelita Lolita, y a todos mis sobrinos y primos.

A mis antiguos amigos chapines,

y mis nuevos amigos ticos y del resto del mundo.

Agradecimientos

A la naturaleza por ser tan complicada y hacernos pensar como seres pensantes que somos.

Al Dr. Luis Pocasangre por sus enseñanzas, disposición y gran colaboración.

A la Asociación de Pequeños Productores de Talamanca (APPTA), y al proyecto de Cacao Orgánico por su colaboración.

Al Dr. Franklin Rosales por el gran apoyo que me brindo para finalizar la edición de este documento.

A la Dra. Alba Stella Riveros por compartir sus conocimientos.

Al Dr. Eduardo Somarriba por enseñarme otras perspectivas en esta investigación.

A Manrique González y Carmen Nuñez por compartir sus experiencias.

A Juan Camilo Soto Días por darme las herramientas necesarias para iniciar este trabajo.

A Carlos Cañizares por su colaboración y su compañía.

A Diego Tobar por su valiosísima ayuda.

A Juan Pablo por su apoyo moral durante su estadía aquí en Costa Rica.

A mis amigos ticos, Grettel, Jorge y Michael, por demostrarme lo mejor de este bello país.

Y a todos mis amigos del CATIE, con quienes juntos logramos la misma meta.

Contenido

	Página
Aprobación	ii
Dedicatoria	iii
Agradecimientos	
Contenido	v
Resumen	viii
Summary	ix.
Lista de cuadros	x
Lista de figuras	xi
I. Introducción General	1
II. Objetivos	3
III. Hipótesis	3
IV. Revisión de literatura	
1. El cultivo de banano	4
2. Nemátodos fitopatógenos en banano	4
2.1. Distribución, ciclo de vida y patogenicidad	5
2.2. Métodos de control	6
Control cultural	
Control genético	
Control químico	
Control biológico e inducción de resistencia	
3. Hongos endofíticos	9
3.1. Hongos endofíticos mutualistas para el control biológico de <i>R. similis</i>	10
4. Sistemas agroforestales y sistemas convencionales de producción	11
4.1. Sistemas agroforestales de Talamanca	12
5. Referencias bibliográficas	13
V. Artículo 1. Diversidad de hongos endofíticos y abundancia de nemátodos en plantaciones de banano y plátano de la parte baja de la reserva indígena de Talamanca	
1. Introducción	17
2. Materiales y métodos	
2.1. Localización del estudio	18
2.2. Selección de sitios de muestreo	19
2.3. Metodología de muestreo	19
2.4. Aislamiento y clasificación morfológica de hongos endofíticos	20
2.5. Extracción de nemátodos	20
	vi.

2.6. Diseño experimental y análisis estadístico	
2.6.1. Diseño del muestreo	22
2.6.2. Riqueza de morfoespecies esperadas	22
2.6.3. Riqueza, abundancia y similitud	22
2.6.4. Población de nemátodos	23
3. Resultados	
3.1. Diversidad de hongos endofíticos	24
3.2. Población de nemátodos	27
4. Discusión	
4.1. Hongos endofíticos	27
4.2. Población de nemátodos	28
5. Conclusiones	30
6. Referencias bibliográficas	31
VI. Artículo 2. Utilización de hongos endofíticos provenientes de plantaciones de banano orgánico para el control biológico del nemátodo barrenador <i>Radopholus similis</i> Cobb. Thorne.	
1. Introducción	34
2. Materiales y métodos	
2.1. Screening <i>in vitro</i> para determinar el potencial antagonista de los hongos endofíticos contra <i>Radopholus similis</i>	
2.1.1. Aislados endofíticos utilizados para las pruebas de parasitismo y antibiosis	36
2.1.2. Determinación de UFC y porcentaje de germinación	36
2.1.3. Cultivo aséptico de <i>Radopholus similis</i>	36
2.1.4. Preparación de discos de zanahoria estériles para la reproducción de <i>Radopholus similis</i>	37
2.1.5. Inoculación de los discos de zanahoria con <i>Radopholus similis</i>	38
2.1.6. Prueba de parasitismo	38
2.1.7. Obtención de extractos crudos para la prueba de antibiosis	38
2.1.8. Prueba de antibiosis	39
2.1.9. Plan experimental para la evaluación de parasitismo y antibiosis	
2.1.9.1. Prueba de parasitismo	40
2.1.9.2. Prueba de antibiosis	40
2.2. Screening <i>in vivo</i> de los hongos endofíticos élite para evaluar la actividad antagonística hacia <i>Radopholus similis</i> en plántulas de banano, Gran enano	
2.2.1. Material experimental	41
2.2.2. Protección de vitroplantas con hongos endofíticos	42
2.2.3. Preparación de la suspensión de esporas	42
2.2.4. Inoculación de vitroplantas con hongos endofíticos	42
2.2.5. Inoculación del material vegetativo con <i>Radopholus similis</i>	42
2.2.6. Recolección y manejo de las plantas para la medición de variables de población de nemátodos, promoción de crecimiento y morfología de raíces	44
2.2.7. Plan experimental para la evaluación <i>in vivo</i>	45
2.3. Análisis estadístico	45

3. Resultados	
3.1. Screening <i>in vitro</i> para determinar el potencial antagonista de los hongos endofíticos contra <i>Radopholus similis</i>	
3.1.1. Prueba de parasitismo	46
3.1.2. Prueba de antibiosis	46
3.2. Evaluación de la actividad de biocontrol y promoción de crecimiento de los aislados endofíticos a nivel <i>in vivo</i>	
3.2.1. Efecto de los aislados endofíticos en la actividad biocontroladora contra <i>Radopholus similis</i> en vitroplantas Gran enano	53
3.2.2. Promoción de crecimiento y cambios en la morfología de las raíces de las plantas	53
4. Discusión	
4.1. Evaluación de parasitismo y antibiosis	57
4.2. Efecto de los aislados endofíticos en la actividad biocontroladora contra <i>Radopholus similis</i>	58
4.3. Promoción de crecimiento y morfología de las raíces	60
5. Conclusiones	61
6. Referencias bibliográficas	
VII. Conclusiones y recomendaciones	65
VIII. Recomendaciones	66
IX. Anexos	67

MENESES HERNÁNDEZ, A. 2003. UTILIZACIÓN DE HONGOS ENDOFÍTICOS PROVENIENTES DE PLANTACIONES DE BANANO ORGÁNICO PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DEL NEMÁTODO BARRENADOR *Radopholus similis* Cobb. Thorne.

Palabras clave: riqueza; abundancia; sistemas agroforestales; sistemas convencionales; sistemas orgánicos; control biológico, parasitismo, antibiosis, *Radopholus similis*, *Trichoderma*, *Fusarium*, población de nemátodos, índice de reproducción (IR), promoción de crecimiento.

RESUMEN

La diversidad de hongos endofíticos y la abundancia de nemátodos (*Radopholus similis* (R), *Helicotylenchus* spp. (H), *Meloidogyne* spp. (M), *Pratylenchus* spp. y nemátodos de vida libre) en banano (BanCon) y plátano (PICon) convencionales fue comparado con banano orgánico (banano en monocultivo (B), banano con cacao (B+C), banano con cacao y especies forestales (B+C+F) y banano con especies forestales (B+F)). Un total de 123 morfotipos de hongos endofíticos fueron aislados de los sistemas orgánicos, presentándose la mayor riqueza en B+F y la menor en el sistema B (68 y 33 morfotipos, respectivamente). En BanCon y PICon convencionales se registró un total de 39 y 31 morfotipos, respectivamente. BanCon presentó la más alta abundancia de morfotipos (208 aislados), con dominancia de *Trichoderma*. B+F fue el más diverso (Índice de Shannon $H=3,78$); mientras que BanCon presentó la menor diversidad ($H=3,04$). Los sistemas agroforestales presentaron mayor diversidad que los sistemas de monocultivo. Entre los sistemas orgánicos, se presentó baja similitud de morfotipos; la más alta similitud se encontró entre los sistemas B y B+C (Índice de Dice, $D=0,48$). La población total de fitonemátodos en plantaciones convencionales fue significativamente mayor ($p\leq 0,001$) que en plantaciones orgánicas.

Los aislados pertenecientes a los géneros *Fusarium* y *Trichoderma* provenientes de las parcelas con más diversidad de hongos endofíticos y menor población de nemátodos fueron sometidos a una evaluación *in vitro* para evaluar el potencial nematicida y, los que presentaron valores entre el 90 y 100% de mortalidad de *R. similis*, fueron evaluados posteriormente a nivel *in vivo* para determinar el biocontrol de *R. similis* dentro del sistema radicular, y el efecto en la promoción de crecimiento. Las plantas protegidas con hongos endofíticos presentaron menor población de *R. similis* ($p\leq 0,001$), comparado a las plantas que no fueron protegidas, así como valores más altos en las variables de promoción de crecimiento ($p\leq 0,001$). Los tratamientos del género *Fusarium* reflejaron una reducción en la densidad de población de *R. similis* dentro de un rango de 53 a 84%, mientras que *Trichoderma* reflejó un rango de 47 a 64%. El peso de las raíces y el tallo en plantas que fueron protegidas, tuvo un incremento promedio de 39 y 29% respecto al testigo. El tratamiento P3 del género *Fusarium*, además de presentar mayor efecto de biocontrol contra *R. similis*, tuvo mayor efecto en promoción de crecimiento comparado al resto de tratamientos, donde los valores encontrados para altura y peso del pseudotallo, y el número y peso de raíces, fueron 12,18; 9,39; 26,02 y 11,22 % mayores que los valores promedio del resto de tratamientos.

MENESES HERNÁNDEZ, A. 2003. UTILIZATION OF ENDOPHYTIC FUNGI ORIGINATED FROM ORGANIC BANANA PLANTATIONS FOR THE BIOLOGICAL CONTROL OF THE BURROWING NEMATODE *Radopholus similis* Cobb. Thorne.

Key words: richness; abundance; agroforestry systems; conventional systems; organic systems; biological control, parasitism, antibiosis, *Radopholus similis*, *Trichoderma*, *Fusarium*, nematode population, reproduction index (IR), growth promotion.

SUMMARY

Diversity of endophytic fungi and nematode abundance (*Radopholus similis* (R), *Helicotylenchus* spp. (H), *Meloidogyne* spp. (M), *Pratylenchus* spp. and free living nematodes) in conventional banana (Bancon) and plantain (PICon) was compared with organic banana (monoculture banana -B-), banana with cacao (B+C), banana with cacao and timber species (B+C+F), banana with timber species (B+F)). A total of 123 morphotypes of endophytic fungi were isolated from the organic systems; B+F presented the highest value, while B had the lowest number (68 and 33, respectively). In Bancon and PIcon, 39 and 31 morphotypes were registered, respectively. BanCon had the highest abundance of morphotypes (208 isolates), with dominance of *Trichoderma*. B+F was the most diverse (Shannon index $H=3.78$), whereas BanCon was least diverse ($H=3.04$). Agroforestry systems were more diverse than monocultures. The organic systems had low similarity of morphotypes; the highest similarity was found between B and B+C (Dice Index, $D=0.48$). The total population of phytonematodes in conventional banana plantations was significantly higher ($p<0.001$) than in organic production systems.

The antagonistic activity of isolates belonging to *Fusarium* and *Trichoderma* that were coming from the plots with more diversity of endophytic fungi and less population of nematodes, was evaluated. The isolates were submitted to an *in vitro* evaluation to determine the nematicide potential and, the ones that presented values among the 90 and 100% mortality rate of *R. similis*, were evaluated *in vivo* to determine the antagonistic effect against *Radopholus similis* and the effect in the promotion of growth.

The plants protected with endophytic fungi, presented more reduction in the final nematode population ($p<0,001$), and higher values in promotion growth ($p<0,001$), as well as more length, superficial area and volume of the roots. The treatments *Fusarium* reflected higher values in the reduction of *R. similis* (53 a 84%), and *Trichoderma* reflected lower reductions (47 a 64%).

The weight of roots and pseudostem in plants that were protected, had an increased average of 39 and 29% respect to the control. The P3 treatment of the genus *Fusarium*, presented the highest values biocontrol and in promotion growth, where the values found for height and weight of the stem, the number and weight of roots, were 12,18; 9,3; 26,02 and 11.22 % greater than the average values of the rest of treatments.

Lista de cuadros

Cuadro 1. Sistemas de producción de banano orgánico de Talamanca	18
Cuadro 2. Diversidad, riqueza y abundancia de morfotipos aislados en sistemas de banano y plátano en la reserva indígena de Talamanca, Costa Rica	24
Cuadro 3. Índice de similitud de Dice entre diferentes sistemas de producción orgánica de banano de la reserva indígena de Talamanca, Costa Rica	25
Cuadro 4. Comparación de la población de nemátodos en diferentes sistemas de producción de banano y plátano orgánicos y convencionales	26
Cuadro 5. Porcentaje de germinación y Unidades Formadoras de Colonias (UFC) de <i>Fusarium</i> y <i>Trichoderma</i> evaluadas mediante las pruebas de parasitismo y antibiosis	35
Cuadro 6. Hongos endofíticos evaluados a nivel <i>in vivo</i>	39
Cuadro 7. Variables de respuesta que corresponden a las evaluaciones efectuadas, a nivel <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> , para determinar el biocontrol de los hongos endofíticos contra <i>Radopholus similis</i>	43
Cuadro 8. Mecanismo de acción y efecto de la acción parasítica de los hongos endofíticos sobre la inmovilidad y mortalidad de <i>Radopholus similis</i> 24 horas después del cocultivo	47
Cuadro 9. Efecto de la acción parasítica de los hongos endofíticos sobre la mortalidad de <i>Radopholus similis</i> 24 horas después del cocultivo	47
Cuadro 10. Efecto de la concentración de los extractos crudos de los hongos endofíticos sobre la mortalidad de <i>Radopholus similis</i> 24 horas después del cocultivo	47
Cuadro 11. Efecto de los extractos crudos al 100% sobre la mortalidad de <i>Radopholus similis</i> , 24 horas después del cocultivo	48
Cuadro 12. Tabla de composición de la población y estados de crecimiento de <i>Radopholus similis</i>	53
Cuadro 13. Índice de reproducción de <i>Radopholus similis</i>	53
Cuadro 14. Efecto de los hongos endofíticos sobre la promoción de crecimiento en plantas del cultivar Gran enano, ocho semanas después de la protección endofítica	54
Cuadro 15. Efecto de los hongos endofíticos sobre la morfología de las raíces analizadas mediante el software WinRhizo	54

Lista de figuras

Figura 1.	Protocolo utilizado para aislar los hongos endofíticos de raíces sanas de banano y plátano	20
Figura 2.	Curvas de riqueza esperada de morfoespecies de hongos endofíticos aislados en sistemas de producción de banano orgánico en 10 comunidades de la reserva indígena de Talamanca, Costa Rica	23
Figura 3.	Porcentaje de morespecies pertenecientes a los géneros <i>Fusarium</i> y <i>Trichoderma</i> respecto a las morfoespecies totales	24
Figura 4.	Curva de acumulación de morfoespecies encontradas en diferentes sistemas de producción de banano y plátano orgánicos y convencionales	25
Figura 5.	Protocolo utilizado para la obtención de extractos crudos de los hongos endofíticos	39
Figura 6.	Protocolo utilizado en el bioensayo para determinar el biocontrol que los hongos endofíticos ejercen sobre <i>Radopholus similis</i>	42
Figura 7.	Efecto de la actividad parasítica y de antibiosis de los hongos endofíticos sobre <i>Radopholus similis</i>	46
Figura 8.	Efecto del tiempo de exposición de extractos crudos sobre la mortalidad de <i>Radopholus similis</i>	48
Figura 9.	Tendencia de la media de la actividad nematocida de los extractos crudos bajo distintas concentraciones en función del tiempo	49
Figura 10.	Efecto de la exposición del extracto crudo sobre la mortalidad de <i>Radopholus similis</i> al momento del cocultivo (T0) y 24 horas (T24) después de la exposición	49
Figura 11.	Diagrama representativo del mecanismo de biocontrol de los hongos endofíticos contra <i>Radopholus similis</i> a nivel <i>in vitro</i>	50

UTILIZACIÓN DE HONGOS ENDOFÍTICOS PROVENIENTES DE PLANTACIONES DE BANANO ORGÁNICO PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DEL NEMÁTODO BARRENADOR (*Radopholus similis* Cobb. Thorne)

I. Introducción general

El banano (*Musa* spp) constituye uno de los principales cultivos a nivel mundial, debido a que es cultivado en mas de 125 países Tropicales y Subtropicales (Jones 2000). En plantaciones comerciales de banano, los nemátodos fitoparásitos son las plagas más importantes que afectan el sistema radical, de los cuales el nemátodo barrenador (*Radopholus similis*) representa el 95% de las poblaciones. Es por esto, que el daño ocasionado por *R. similis* es uno de los principales problemas en plantaciones comerciales de banano en América Tropical, Este del África y Australia (Sarah 2000; Gowen y Quénehervé 1990; Sarah 1989; Pinochet 1986). Este patógeno puede llegar a reducir la producción en sistemas intensivos hasta un 30-50% del rendimiento (Davide 1996), razón por la cual, el uso de nematicidas, como dibromocloropropano (DBCP) y bromuro de etileno (EDB), ha sido necesario a pesar de los problemas adversos que éstos conllevan, tales como problemas en la salud humana y animal (Chabrier y Quenehervé 2003). Es por esto que los nematicidas han sido prohibidos en muchos países y serán cancelados del mercado en un futuro cercano (Oka *et al.* 2000).

Actualmente, muchos científicos han dedicado sus esfuerzos en la búsqueda de nuevas estrategias para el manejo de los nemátodos, y poder así disminuir el impacto que los nematicidas ejercen sobre el ambiente. Los microorganismos que colonizan la rizósfera son ideales para usarse como agentes de control, aunque muchas veces el manejo y uso de comunidades microbianas con potencial antagonista ha resultado poco efectivo al ser introducidas a sistemas foráneos, donde muchos factores abióticos y bióticos limitan su desarrollo y actividad.

El uso de hongos endofíticos para el control de *R. similis*, se plantea hoy en día como una buena alternativa, ya que la interacción entre el patógeno y el antagonista ocurre directamente dentro de un mismo nicho: el tejido interno de las plantas. Los hongos endofíticos colonizan los tejidos u órganos internos de una planta sin causar ningún tipo de síntoma, y confieren una protección a la planta hospedera contra el ataque de agentes bióticos y abióticos (Latch 1993; Carroll 1990). Consecuentemente, la utilización de hongos endofíticos como organismos que tienen potencial para controlar nemátodos mediante la protección de vitroplantas ha sido enfatizada en varias ocasiones (Soto 2003; Zum Felde 2002; Pocasangre *et al.* 2000; Schuster *et al.* 1995; Amin 1994), como por ejemplo, en diferentes sistemas de producción de banano comercial de Centroamérica y el Caribe, donde no se reportan niveles altos de nemátodos, se ha identificado que las raíces son colonizadas por hongos endofíticos, denotándose una dominancia de géneros específicos como *Fusarium* y

Trichoderma. Con este hecho, se deduce que éstos géneros podrían tener un mutualismo específico con las plantas de banano, que podría resultar en efectos de supresividad al ataque de nemátodos (Pocasangre *et al.* 2000, Zum Felde 2002).

Por otro lado, los sistemas naturales tienen una alta diversidad de microorganismos en el suelo, que a través de relaciones complejas como el parasitismo, hiperparasitismo y competencia facilitan la descomposición de los residuos vegetales y animales y el reciclaje de nutrientes (Sikora 1992; Altieri 1995; Gliessmann 1997). Los sistemas agroforestales se caracterizan por tener complejas interacciones entre cultivos, árboles y animales, con lo que se favorece la introducción de materia orgánica en el suelo; por ende, las probabilidades de identificar microorganismos benéficos que colonicen las raíces del cultivo, y que tengan potencial de biocontrol hacia diversas plagas y nemátodos es mayor que en sistemas de producción convencionales. Por ende, se plantea que la búsqueda de hongos endofíticos específicos en plantas de banano que estén asociados con especies forestales, y que tengan potencial para el control biológico de *R. similis*, puede ser exitosa.

Este estudio determinó y comparó la diversidad de hongos endofíticos y la población de nemátodos en seis sistemas de producción de banano y plátano orgánicos y convencionales en Talamanca, Costa Rica. Aislados endofíticos del género *Fusarium* y *Trichoderma* provenientes de sistemas orgánicos fueron evaluados a nivel *in vivo*, para evaluar el biocontrol contra *R. similis*, y su efecto en promoción de crecimiento.

II. Objetivos

Objetivo General

Comparar la diversidad de hongos endofíticos presentes en cuatro sistemas de producción orgánica de banano de reserva indígena de Talamanca y en dos sistemas convencionales de producción de banano y plátano. Efectuar una evaluación de los hongos endofíticos para determinar el potencial antagonista que éstos tienen contra el nemátodo barrenador (*Radopholus similis*).

Objetivos Específicos

- a) Se comparará la diversidad de hongos endofíticos presentes en cuatro sistemas de producción orgánica de banano en la reserva indígena de Talamanca y en dos sistemas convencionales de producción de banano y plátano.
- b) Comparar la población de nemátodos entre sistemas de producción orgánica y sistemas de producción convencional.
- c) Estudiar el potencial antagonista de los aislados endofíticos contra *R. similis* en condiciones *in vitro*, así como en condiciones de invernadero.

III. Hipótesis

- a) La diversidad de hongos endofíticos difiere entre los cuatro tipos de sistemas orgánicos de la Reserva Indígena Bribri de Talamanca, y es mayor que en los sistemas convencionales de producción.
- b) La población de nemátodos fitopatógenos es mayor en sistemas de producción convencional que en los sistemas de producción orgánica.
- c) Los hongos endofíticos tienen un efecto antagonista contra *Radopholus similis* a nivel *in vitro* e *in vivo* y, promueven el crecimiento de vitroplantas.

IV. Revisión de literatura

1. El cultivo del banano

El cultivo del banano constituye una de las principales fuentes de ingreso en las economías de muchos países. Este cultivo, en términos de producción, es el cuarto cultivo más importante del mundo, después de arroz, trigo y maíz. Los bananos son cultivados en más de 125 países del mundo, siendo parte importante de la economía y alimentación básica de muchos países. La producción de banano en 2001, se estimó en cerca de 30 millones de toneladas de acuerdo con informes de la FAO (FAO 2001). Las mayores regiones productoras de banano, a nivel mundial, son Asia (42%) y Latino América (44%). Además, de toda la producción mundial el 86% exportado corresponden al área de Latino América y el Caribe, ya que en ellos se encuentran cuatro de los cinco países de mayor exportación en el mundo.

El combate de las plagas y enfermedades en el banano representa uno de los costos de producción más altos en el cultivo. El cultivo del banano es atacado por diversos patógenos, que incluyen hongos, bacterias y virus. Entre las principales plagas y enfermedades que han tenido impactos negativos en la historia del banano están: Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis* var. *diiformis*), Sigatoka Amarilla (*M. musicola*), Moko (*Ralstonia solanacearum*) y Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* var. *cubense*), Nemátodos (*Radopholus similis*, *Pratylenchus* spp, *Meloidogyne incógnita* y *Helicotylenchus* spp) y Picudo (*Cosmopolites sordidus*) (Stover y Simmonds 1987).

2. Nemátodos fitopatógenos en banano

Jones (1996) se refiere a los fitonemátodos como uno de los factores más limitantes en la producción del banano. Reducciones de 30 al 50% en el rendimiento se han atribuido a nemátodos en Costa Rica y Panamá, mientras que en Guatemala y Honduras, las pérdidas van de 10 a 20%. Las especies de nemátodos que se encuentran normalmente en los Trópicos son: *Radopholus similis*, *Pratylenchus coffeae*, *Helicotylenchus multicinctus* y *Meloidogyne incógnita*.

La propagación vegetativa usando rizomas o hijuelos infectados ha diseminado al nemátodo barrenador alrededor del mundo. A pesar que varias especies de nemátodos atacan a los bananos y plátanos, se considera que *R. similis* es el problema principal en plantaciones comerciales, especialmente en las constituidas por variedades del subgrupo Cavendish (Marin 2003; Gowen y Quénéhervé 1990), representando según estudios llevados a cabo por Araya (2003), de un 82 a 97 % de la población total en raíces en plantaciones comerciales de Costa Rica.

Este nemátodo es también común en plátanos y en bananos de cocción cultivados en las zonas bajas de África Central y Oriental, y en el Caribe (Puerto Rico). Sin embargo, se encuentra generalmente ausente en raíces de plátano en África Occidental y América Central. El nemátodo barrenador también se encuentra ausente en las zonas altas de África Central y Occidental y en las zonas de producción sub-tropicales caracterizadas por un clima más templado (área mediterránea, Islas Canarias, Madera, Provincia del Cabo y Taiwan (Sarah 2000, Sarah *et al.* 1996, Pinochet 1986). Se ha reportado que *R. similis* puede llegar a reducir la producción de sistemas intensivos hasta un 30-50% del rendimiento (Jones 1996).

El nemátodo barrenador causa lesiones negro-rojizas en la región externa de la raíz, penetrando a través del cortex, hasta conducir a una atrofia del tejido radical, y en niveles altos de incidencia pueden causar lesiones múltiples del rizoma (cormo) y necrosis hasta causar la caída de la planta (Gowen y Quénehervé 1990).

2.1. Distribución, ciclo de vida y patogenicidad de *Radopholus similis*

La distribución de esta especie esta en función de sus preferencias de temperatura, las que fluctúan entre 24 y 32°C. Su reproducción es óptima alrededor de 30°C. No se reproduce si la temperatura es menor de 16-17°C o sobrepasa los 33°C. *R. similis* es un nemátodo endoparásito migratorio que completa su ciclo de vida en 20-25 días dentro de los tejidos de la raíz y del rizoma. Las hembras juveniles y adultas tienen formas móviles que pueden dejar la raíz en casos de condiciones adversas. Los estadios migratorios en el suelo pueden fácilmente invadir raíces sanas. Esta especie tiene un dimorfismo sexual pronunciado, los machos tienen un estilete atrofiado y se consideran no-parasíticos. La penetración de los nemátodos ocurre de preferencia cerca al ápice radical, pero *R. similis* puede invadir cualquier porción de la raíz. Al migrar ínter e intracelularmente, se alimenta del citoplasma y células del parénquima cortical, destruyendo paredes celulares y causando cavidades y túneles que se necrosan y pueden extenderse a toda la región parenquimática. No daña el cilindro vascular aunque ocasionalmente puede penetrar en éstos tejidos.

La patogenicidad de las poblaciones de *R. similis* varía según distintos tipos de variables, tales como el cultivar, factores edáficos y la agresividad relativa de las poblaciones de nemátodos. En cuanto a la agresividad o capacidad patogénica del nemátodo, éstos difieren según la región geográfica de donde provienen. Algunas poblaciones africanas son más patogénicas que poblaciones de las Antillas, Sri Lanka o Queensland en Australia. Según Marín *et al.* (1999), las poblaciones de *R. similis* de Costa Rica y de Panamá, tienen grados de agresividad superiores que las poblaciones de Honduras y Ecuador. En el Caribe y en Centroamérica, han sido caracterizados tres patotipos en relación a su patogenicidad de acuerdo a: tasa de reproducción, huésped preferencial (banano tipo ABB, plátanos u otros) y cariotipo

(número de cromosomas). Por ejemplo, un patotipo de Puerto Rico es más patogénico en plátanos que en bananos y tiene 5 pares de cromosomas, en contraste con los patotipos centroamericanos que prefieren bananos de tipo Cavendish y tienen solamente 4 pares de cromosomas (Sarah *et al.* 1996).

2.2. Métodos de control

Los nemátodos fitoparásitos, principalmente *R. similis*, representan las más importantes limitaciones bióticas para la producción sostenible de banano (Dochez 2000). Comúnmente, el uso de nematicidas es la forma más efectiva para controlar éstos, a pesar de los efectos ambientales adversos y el costo elevado para los agricultores de subsistencia (Chabrier y Quenehervé 2003; Dochez 2000; Sarah 1989). El control químico, a las dosis necesarias para disminuir la población de nemátodos a niveles aceptables para el cultivo, afecta también a las poblaciones de microorganismos y la estructura física y química del suelo (Cebolla 1991). Debido a los efectos negativos que los nematicidas tienen, el bromuro de etileno ya ha sido prohibido en muchos países, y existe una presión por parte de los movimientos conservacionistas para que sea cancelado y retirado del mercado de plaguicidas (Oka *et al.* 2000). Con el aumento de las regulaciones y las restricciones en el uso de nematicidas y la demanda de productos de agricultura orgánica, el interés por la búsqueda de nuevas estrategias para controlar los nemátodos ha aumentado considerablemente. A continuación se describen de forma generalizada los métodos de control que actualmente se conocen:

Control cultural

La práctica cultural más utilizada es el “mondado” de la superficie de los cormos y el saneamiento o desinfección con agua caliente (52-55 °C durante 15-20 min) para evitar el transporte de nemátodos a nuevas plantaciones, así como la limpieza del suelo antes de siembra. La mejor manera de evitar contaminación es el uso de plantas libres de nemátodos, propagadas con técnicas *in vitro*. Este material de siembra es ahora uno de los más comunes en plantaciones comerciales, y debería ser el único material de siembra permitido a sembrar en suelos próximos a nueva siembra (Sarah 1998). Adicionalmente, se han estudiado y desarrollado una serie de opciones que involucran el uso de cultivares resistentes, (Ramos *et al.* 1995), la rotación de cultivos, policultivos, manejo de fechas de siembra y cosecha, uso de enmiendas orgánicas y mulches, cultivos trampa y antagonistas, barbechos e inundaciones (Luc *et al.* 1990), solarización (Cebolla 1992), y el empleo de microorganismos benéficos del suelo que parasitan o antagonizan a los nemátodos (Sikora 1992).

Control genético

Los diploides (AA) del grupo Pisang Javi Buaya (PJB) (Pinochet y Rowe 1979), han sido reconocidos desde hace tiempo como resistentes a *R. similis*. Esta resistencia ha sido incorporada en las líneas parentales utilizadas para la selección de híbridos mejorados que generaron la variedad Goldfinger (FHIA-01) que tiene resistencia a Sigatoka y mal de Panamá (Sarah *et al.* 1996). Posteriormente, la resistencia también se descubrió en el cultivar 'Yagambi km. 5', Musa AAA, pero la posibilidad de explotarla comercialmente no es prometedora.

Tomando en consideración la limitación en fuentes naturales de resistencia, se han evaluado otros cultivares resistentes, a saber el 'Pisang Tongat', 'Pisang Mas', 'Paka', 'Kunnan', 'Pisang Sipulu', los cuales se han comparado en el cultivar resistente Yagambi km. 5', y el cultivar susceptible Cavendish 'Gran Enano', en experimentos conducidos por Collingborn y Gowen (1997), donde encontraron que los cultivares 'Paka' y 'Kunnan' son altamente resistentes.

Los objetivos propuestos por la FHIA se han ampliado actualmente, incluyendo la búsqueda de bananos de cocción, y desde luego, la consecución de un banano comercial que sea resistente a *Fusarium* y Sigatoka Negra, y con buenas características comerciales. Algunos de los diploides superiores son el SH-3437, que combina resistencia a Sigatoka Negra y un racimo de peso considerable, y el SH-3142, que combina buenas características agronómicas y resistencia a nemátodos. Estos híbridos selectos están siendo utilizados para la obtención de nuevas variedades resistentes a nemátodos, *Fusarium* y Sigatoka Negra, como por ejemplo el SH-3723.

Control químico

Actualmente, el control químico es la manera más común de controlar las poblaciones de nemátodos. Los nematicidas, utilizados hasta ahora, han sido generalmente organofosforados o carbamatos, los cuales son aplicados como gránulos sobre la superficie del suelo alrededor de la planta, de forma profiláctica y generalizada, es decir que la aplicación de éstos se hace de acuerdo a una calendarización que indica el número de veces que deben ser utilizados en el cultivo sin importar si el banano se encuentra o no afectado por la plaga en el momento (Sarah 1996).

Las aplicaciones indiscriminadas de nematicidas ha causado un gran número de intoxicaciones o enfermedades crónicas entre los trabajadores bananeros. Aún así, los nematicidas son utilizados en gran escala, y además de causar problemas en la salud humana y animal, éstos conllevan a problemas ambientales como contaminación de afluentes y un efecto biocida en los suelos que son tratados con éstos.

Control biológico e inducción de resistencia

En muchas ocasiones se ha demostrado que los suelos con alto contenido de materia orgánica se caracterizan por ser supresivos al desarrollo y la actividad de diversos patógenos y nemátodos (Baker y Dunn 1990). Esta supresividad se fundamenta en la existencia de un amplio espectro de microorganismos que forman parte de un sistema complejo de interacciones que conforman la rizósfera dónde la competencia por las fuentes alimenticias, nichos y dinámicas entre predador-presa ayudan a limitar la población de microorganismos con potencial de plaga (Altieri 1999; Baker y Paulitz 1996).

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

Un caso exitoso para el control biológico de fitonemátodos es descrito por Fernandez, *et al.* (2003), quienes reportan que al inocular, en forma temprana, plantas de banano con cepas del género *Glomus*, permitieron atenuar el daño causado por *R. similis* y *M. incognita* hasta en un 85%. Los mismos autores reportan que en Cuba, la utilización de hongos como *Paecylomyces lilacinus* y bacterias como *Bacillus thuringensis* var. *kurstaki* y *Corynebacterium paurometabolum*, han tenido gran éxito en el control de *R. similis*, tanto en ensayos llevados a cabo en condiciones controladas como en campo.

Por otro lado, se ha demostrado que en las raíces de las plantas se establecen relaciones simbióticas con comunidades de microorganismos específicos, los cuales son atraídos mediante exudados que son producidos por la planta y que son emitidos mediante la endoriza (Sikora 2003). Es por esto que microorganismos específicos logran colonizar las raíces, y desencadenan reacciones de defensa en las plantas hospedantes. Este tipo de mecanismos de defensa activada son conocidos como Resistencia Sistémica Inducida (ISR) o Resistencia Sistémica Adquirida (SAR), donde la señal estimuladora es capaz de inducir la síntesis y acumulación de ácido salicílico (SA) y/o de etileno, que actuarían como mensajeros secundarios para la producción de fenilpropanoides (Pieterse *et al.* 2001). La ruta biosintética de los fenilpropanoides es muy importante para los mecanismos de defensa de la planta, ya que los productos intermediarios generan como compuesto final la lignina, necesaria para el reforzamiento de las paredes celulares. Asimismo, productos del metabolismo secundario llevan a la obtención de fitoalexinas, que se encuentran involucradas con el bloqueo de los patógenos. Se considera que estas respuestas inducibles en la planta son mecanismos de defensa contra los fitonemátodos (Wuyts *et al.* 2003).

Investigaciones acerca de la inducción de resistencia en plantas de banano (Gran enano), mediante la inoculación con cepas de micorrizas ha sido demostrada en varias ocasiones. Jaizme-Vega (1992) documentó que una inoculación micorrícica temprana en el cultivar Gran enano incrementó la tolerancia

a *Radopholus similis*. Esta protección se explica muy probablemente por el trabajo extra de bacterias promotoras de crecimiento, liberadas durante la interacción micorriza-planta, que estimulan de forma directa el crecimiento vegetativo y activan los mecanismos de defensa hacia el ataque de fitinematodos.

En la actualidad, el control biológico de nemátodos se abre camino con el uso de hongos endofíticos, hongos micorrícicos (MVA y ECM), rizobacterias promotoras de crecimiento (PGPR's) y bacterias endofíticas, demostrándose en varias ocasiones que la colonización de las plantas con estos microorganismos inducen a una resistencia efectiva contra hongos, bacterias, virus o nemátodos patógenos (Sikora 2003, Jaizme-Vega 2003, Tzun y Kloepper 1995).

3. Hongos endofíticos

De Bary (1886) definió el término como hongos que invaden tejidos o células de las plantas de organismos autótrofos. O. Petrini *et al.* (1982) denotan que son una categoría que incluye todo tipo de patógeno foliar virulento hasta micorrizas de las raíces que forman simbiosis.

Los hongos que causan síntomas visibles en una planta enferma es referido actualmente como patógeno, a pesar que éstos hongos penetran el tejido del hospedero y existe endofíticamente. Por lo tanto, cabe diferenciar que los hongos endofíticos son hongos que causan infecciones aparentemente asintomáticas.

Los hongos endofíticos colonizan los tejidos u órganos internos de una planta sin causar ningún tipo de síntomas. Cuando la colonización de los tejidos le confiere una protección a la planta hospedera contra el ataque de agentes bióticos y abióticos se denominan hongos endofíticos mutualistas (Latch 1993; Carroll 1990). Los hongos endofíticos son mutualistas si: (i) No causan síntomas de enfermedad en la planta hospedera; (ii) Son transmitidos a través de la semilla. Cuando no ocurre, éstos deberán transmitirse lateralmente, de planta adulta a otra; (iii). Esta disperso a través de los tejidos del hospedero. Si las unidades de infección son pequeñas, estas deberán ser numerosas; (iv) Colonizan y están extendidos en un hospedero definido; (v) Producen metabolitos secundarios como antibiosis o de naturaleza tóxica.

Existen dos estrategias fundamentalmente distintas para que los hongos endofíticos presenten una simbiosis con las plantas: (a) Desarrollando una infección que induce algún tipo de resistencia sistémica mediante una biomasa sustancial interna; (b) Produciendo potentes toxinas que presentan un efecto detrimento hacia patógenos de las plantas (Clay *et al.* 1985). (c) Mediante un mutualismo inducido, que envuelve una simbiosis menos precisa o más difusa entre el hospedero y el endofítico. Pocasangre *et al.* 2001, sugieren que la mayoría de los hongos endofíticos son ascomicetos y están presentes la mayoría de su ciclo de vida dentro del tejido de las plantas. Estos pueden brindar dos tipos de beneficios a las plantas: por un lado pueden alterar la fisiología de las plantas llevándolas a aumentar su crecimiento y por otro, pueden incrementar la resistencia al estrés causado por factores abióticos. La infección por estos hongos estimula la producción de exudados de la raíz. Estos exudados pueden

producir efectos alelopáticos en competición bajo condiciones de estrés biótico y la quelatación de iones metales afectando así el secuestro y disponibilidad de estos (estrés abiótico). Esta faceta de respuesta simbiótica requiere de mayor investigación en todo tipo de asociaciones posibles respecto a la sustitución y la transformación en la producción de ergo-alcaloides (Malinowski *et al.* 2000).

Algunos estudios han demostrado que los hongos endofíticos inciden en condiciones específicas, es decir que estos se encuentran en microclimas y condiciones fisiológicas distintos. Los siguientes géneros se han identificado en helecho tropical como controladores de patógenos del suelo: *Acremonium*, *Anthostomella*, *Chrysosporium*, *Cladosporium*, *Clypeopycni*, *Colletotrichum*, *Coniothyrium*, *Cryptocline*, *Lasiodiplodia*, *Libertella*, *Nodilosporium*, *Phaeosphaeria*, *Phialophora*, *Poma*, *Phomatospora*, *Phomopsis filiciana*, *Scopulariopsis*, *Verticillium* y *Xylaria* (Petrini *et al.* 1992).

3.1. Hongos Endofíticos mutualistas para el control biológico de *R. similis*

La capacidad amortiguadora de un suelo en la naturaleza resulta efectivo para suprimir la mayoría de patógenos del suelo y problemas de nemátodos debido a la existencia de diversos microorganismos como rizobacterias, hongos depredadores de nemátodos, endomicorrizas y hongos endofíticos (Sikora 1992). Por ejemplo, Zum Felde (2002), reporta la supresión de nemátodos en plantaciones comerciales de banano en Guatemala. Asimismo, señala que la supresión de nemátodos registrada en una plantación, fue transferida de una plantación a otra por medio del trasplante de cormos, lo que parece indicar que la acción antagonista es desarrollada mediante una interacción directa “nemátodo-hongo endofítico” dentro del tejido de las plantas. Hongos endofíticos “aislados” de las mismas plantaciones comerciales de Guatemala, fueron evaluados en un bioensayo, donde se encontró que plántulas de banano que habían sido inoculadas con hongos endofíticos, tuvieron una reducción directa en población de nemátodos.

De la misma manera, otros estudios han revelado que aislados endofíticos juegan un papel importante para reducir población de nemátodos en plantas de banano evaluadas en invernadero (Soto 2003, Niere 2001, Pocasangre *et al.* 2000, Schuster *et al.* 1995).

Pocasangre *et al.* (2001), reporta que el potencial de hongos endofíticos como agentes biológicos de control de *R. similis* fue estudiado bajo condiciones de invernadero en plantas provenientes de cultivo de tejidos en 6 diferentes cultivares comerciales de banano: Gran Enano (AAA) Williams (AAA), Gros Michel (AAA), Bluggoe (ABB), FHIA 01 (AAAB) y FHIA 23 (AAAA). Estos aislados endofíticos causaron reducciones mayores de 80% en la población final de nemátodos en el sistema radical de los 6 cultivares. Además, reporta que, las plantas inoculadas con hongos endofíticos mostraron mayor crecimiento radical y foliar en comparación con plantas no inoculadas. El potencial antagonista de estos hongos puede ser manejado con la inoculación en cultivares susceptibles al antagonista. Es necesario que los hongos sean efectivos para colonizar las raíces y no

sean patogénicos. Bajo estas condiciones, el control biológico de nemátodos endoparásitos parece ser exitoso.

Actualmente en plantaciones comerciales utilizan vitroplantas como una alternativa de protección al cultivo. Sin embargo, las vitroplantas al ser producidas *in vitro*, resultan estar libres de antagonistas por lo que han resultado ser más susceptibles a nemátodos y mal de panamá, en comparación con material de siembra convencional que están colonizados con antagonistas naturales. Por lo tanto es de extrema importancia el mejoramiento biológico de vitroplantas, mediante la protección con hongos endofíticos que tengan actividad antagonista contra nemátodos. (Pocasangre *et al.* 2000, Schuster *et al.* 1995).

La presente investigación tiene la finalidad de aislar y seleccionar hongos endofíticos provenientes de sistemas de producción orgánica, que puedan ser usados para control biológico de nemátodos vía mejoramiento de la sanidad del material de siembra.

4. Sistemas agroforestales y sistemas convencionales de producción

Los sistemas convencionales tienen una existencia relativamente corta, que va desde unos pocos meses a años, según el cultivo. Por el contrario, los sistemas agroforestales se asemejan más a un sistema en estado natural, donde la multitud de especies involucradas se reproducen en forma controlada por el mismo sistema, siempre y cuando no aparezca un factor exógeno que destruya el equilibrio.

En cuanto a diversidad de especies, los sistemas convencionales se caracterizan por tener un número limitado y reducido de especies, y una cercanía física mayor entre ellas. En contraposición, en un sistema más diverso, se propicia una amplia variedad de especies asociadas de formas muy diversas y la separación entre miembros de una misma especie es generalmente mayor, lo que permite la existencia de barreras naturales entre ellos (Altieri 1992).

En los sistemas convencionales se prefiere sembrar plantas genéticamente similares o idénticas, para obtener productos homogéneos acorde con las exigencias de los mercados y, a la vez, compatibles con determinadas formas de cultivo, cosecha y empaque (Soto 1992). En los sistemas agroforestales, por el contrario, posee en lo máximo posible, genotipos de una misma especie con pequeñas diferencias genéticas, que les proporciona ciertas ventajas de sobrevivencia ante eventuales cambios que provoquen presión de selección. Por lo tanto, los sistemas de producción convencional se distinguen por presentar constantemente problemas fitosanitarios, dado que en él convergen numerosas características propicias para su desarrollo. Entre ellas están la disponibilidad de grandes cantidades de tejido vegetal susceptible, cercanía entre plantas con genotipos similares, condiciones ambientales propicias para la proliferación de organismos capaces de nutrirse o competir con el cultivo (Agrios 1988).

4.1. Sistemas Agroforestales de Talamanca

En la región Atlántico Sur de Costa Rica, específicamente Talamanca, se ha desarrollado a través de los años, un sistema agroforestal orgánico sostenible, donde se cultiva cacao y banano orgánico, los que se diversifican con otros cultivos como raíces, tubérculos, frutales y plátano, y árboles maderables. Esta diversificación contribuye a preservar la riqueza de la flora y fauna características del lugar, así como la protección del suelo (Umaña 2002).

El sistema de producción de banano en conjunto con otras especies como cacao, frutales y árboles maderables entre otros, ofrece muchas ventajas al ambiente como: (1) mayor diversidad de especies que colaboran con el equilibrio natural; (2) protección contra la erosión del suelo, pues al desarrollarse tres o cuatro especies de plantas con diferentes alturas (estratos verticales), y la cobertura que las hojas forman, se protege en contra del golpeo del agua y el lavado del suelo; (3) formación de barreras rompeviento que evitan el volcamiento de las plantas; así como, barrera a ciertas enfermedades como Sigatoka negra; (4) se favorece la asociación con organismos benéficos presentes en la zona radical, que permiten fijar nitrógeno, aprovechar mejor el fósforo, hasta la producción de ciertas sustancias que permiten el desarrollo de las mismas plantas.

La ecología del banano orgánico reúne una serie de consideraciones que son claves para el buen desarrollo de la variedad a escoger dentro del sistema orgánico agroforestal. El banano orgánico asociado en el sistema agroforestal, desarrolla hábitat donde se mantiene una simbiosis con varias especies anuales y perennes. Las variedades de banano utilizadas comúnmente en la zona de Talamanca son Congo, Lacatán y Gros Michel y la combinación de especies leñosas como Pegibaye (*Bactris gasipaes*), Aguacate (*Persea americana*), Cacao (*Theobroma cacao*), Laurel (*Cordia alliodora*), Jobo (*Spondias mombin*), Zapotillo (*Pouteria glomerata*), Indio desnudo (*Bursea simaruba*), Guarumo (*Cecropia obtusifolia*), Mango (*Mangifera indica*), Jabillo (*Hura crepitans*), Mamón chino (*Nephelium lappaceum*), Manzana de agua (*Syzygium malaccense*), entre otros, y especies forestales fijadoras de nitrógeno, como *Ingas* y *Erytrina* sp. que permiten a la planta de banano obtener una buena porción de nitrógeno. Además, debido a un alto porcentaje de materia orgánica, se fomenta la actividad de agentes biológicos de control, por lo cual el control de plagas es mínimo (Umaña 2002).

5. Referencias bibliográficas

- Agrios, G.N. 1997. Plant Pathology. 7 ed. New York. Academic Press. 703 p.
- Altieri, MA. 1992. Biodiversidad, agroecología y manejo de plagas. Valparaíso. Chile. Centro de Estudios en Tecnologías Apropriadas para América. 162 p
- Baker, RR.; Paulitz, TC. 1996. Teorical basis for microbial interactions leading to biological control of soilborne plant pathogens. In: Ed. Robert may. Managing soilborne plant pathogens (1996). Minnesota, USA. The American Phytopathological Society. p. 50-79.
- Baker, RR.; Dunn, PE. eds. 1990. New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases; proceedings of a UCLA Colloquium, Frisco, Colorado, 1989. New York, Alan R. Liss. 837 p.
- Baker, KF.; Cook R J. 1982. Biological control of plant pathogens. Saint Paul, MN, APS Press. 433 p.
- Carroll, G.C.1990. Fungal endophytes in vascular plants: Mycological research opportunities in Japan. Transactions of the Mycological Society Japan 31:103-116.
- Castaño, J. *s.f.* Principios básicos de la fitopatología. Honduras. Escuela Agrícola Panamericana. Zamorano. 320 p.
- Cebolla, V. 1991. La horticultura Española en la C.E (en línea). Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias. España. Consultado mar. 2001. Disponible en www.ivia.es/~vcebolla/solariza
- Collingborn F.M.B.; S.R. Gowen. 1997. Evaluación de cultivares de banano para la resistencia a *Radopholus similis* y *Pratylenchus coffeae*. *InfoMusa* 6:2.
- Chabrier, C.; Quénehérve, P. 2003. Control of the burrowing nematode (*Radopholus similis* Cobb.) on banana: Impact of the banana field destruction method on the efficiency of the following fallow. *Crop Protection* 22:121-127.
- Clay, K.; Hardy, T.N; Hammond, A.M. 1985. Fungal endophytes of *Cyperus* and their effect on an insect hervibore. *American Journal of Botany* 72:1284-1289.
- Davide, R.G. 1996.Overwiev of nematodes as a limiting factor in Musa production. In: E.A. Frison, J.P. Horry, D. De Waele. Eds. New Frontiers in resistance Breeding for nematode, *Fusarium* and Sigatoka. Montpellier, France, INIBAP. p 27-31.
- Dochez, C.; Speijer, P.R.; Hartman, J.; Vuylsteke, D.; De Waele, D. 2000. Cribado de híbridos de Musa para la resistencia a *Radopholus similis*. *InfoMusa* 9(2):3-4.
- FAO 2001. Disponible en <http://apps.fao.org>

- García, JE. 1997. Introducción a los plaguicidas. San José. EUNED. 450 p.
- Gliessman, S. 1997. Agroecology: Ecological processes in sustainable agriculture. United States. Sleeping Bear Press. 285 p.
- Gowen, S.; Quénéhervé, P. 1990. Nematode parasites of bananas, plantains and abaca. In M.Luc, A. Sikora, J. Bridge. Eds. Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture. Luc, M.; Sikora, A.; Bridge, L. eds. Wallingford, United Kingdom. CAB International. 629 p.
- Jaizme-Vega, M.C. 1998. Aplicaciones de las micorrizas arbusculares (MA) sobre plataneras micropropagadas. In F.E. Rosales, S.C. Tripon, J. Cerna. Eds. Producción de banano orgánico y/o, ambientalmente amigable (1998), Guacimo, C.R. Memorias. CIID, EARTH, INIBAP. p. 106-123.
- Jones, D. R. 2000. The genera *Musa* and *Ensete*. In Ed: D.R. Jones. Diseases of banana, abaca and enset. Wallingford, Oxon, U.K. CAB International. p. 1-36.
- Latch, G.C.M. 1993. Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts. Biotic stress tolerance imparted to grasses by endophytes. *Agriculture, Ecosystems and environments* 44:143-156.
- Malinowski DP.; Belesky DP. 2000. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science* 40(4):923-940.
- Marin, D.H. 2003. Investigaciones en progreso y perspectivas a futuro en el manejo del sistema radical de banano. In: Sposium Internacional: Sistema Radical del Banano: hacia un mejor conocimiento para su manejo productivo. San José Costa Rica. INIBAP/CORBANA. p. 23-24.
- Marin, D.H.; Barker, K.R.; Kaplan, D.T.; Sutton, T.B.; Opperman, C.H. 1999. Aggressiveness and damage potential of Central American and Caribbean Populations of *Radopholus* spp. in banana. *Journal of Nematology* 31(4):377-385.
- Niere, B.I. 2001. Significance of non-pathogenic isolates 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. Germany. Bonn Universität. 118 p.
- Oka, Y.; Nacar, S.; Putievsky, E.; Ravid, U.; Yaniv, Z.; Spiegel Y. 2000. Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology* 90(7):710-715.
- Petrini, O.; Sieber, T.N.; Toti, L.; Viret, O. 1992. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. *Natural Toxins* 1:185-196.
- Petrini, O.; Stone, J. y Carroll, F.E. 1982. Endophytic fungi in evergreen shrubs of Western Oregon: a preliminary study. *Canadian Journal of Botany* 60:789-796.
- Pinochet, J. 1986. A note on nematode control practice on bananas in Central America. *Nematropica* 16(2):197-203.

- Pinochet, J.; Rowe, P.R. 1979. Progress in breeding for resistance to *Radopholus similis* banana. *Nematropica* 9:76-78.
- Pieterse, *et. al.* 2001. Rhizobacteria-mediated induced systemic resistance: triggering, signaling and expression. Netherlands. *European Journal of Plant Pathology* 107:51-61.
- Pocasangre, L.; Sikora, R.A.; Araya, M. 2001. Estado actual de la situación nematológica en los bananos y platanos en América Latina. *InfoMusa* 10(2):I-XII.
- Pocasangre, L.; Sikora, R.A.; Vilich, V.; Schuster, P. 2000. Survey of banana endophytic fungi from Central America and screening for biological control of *Radopholus similis*. In M. Blanke; J. Pohlen. 2000. Eds. ISHS Conference on Fruit Production in the Tropics and Subtropics (2, 2000). Bonn. p. 283-289.
- Ramos, B.S.; Curtis, R.H.C.; Evans, K.; Burrows, P.; Haydock, P.P.J. 1995. The potential for resistance to cyst nematodes in transgenic plants which express antibodies. In R.G. McKinlay, D. Atkinson. Eds. *Integrated crop protection: Towards sustainability?* (1994, Edingburg, Scotland). Proceedings No. 63. Edingburg, Scotland, British Crop Protection Council. p. 99-106. (Proceedings No. 63).
- Reinjtjes, C.; Haverkort, B.; Waters-Bayer, B. 1998. Mantenimiento de la diversidad y la flexibilidad. In: Consorcio Latinoamericano de Agroecología y Desarrollo: Curso de educación a distancia: Agro-ecología y Desarrollo Rural. 4 ed. Perú. CLADES. p. 121-147.
- Sarah, J.L. 2000. Nematode pathogens: Burrowing nematode. In D.R Jones. Ed. *Disease of banana, Abaca and Enset*. CAB International, Wallingford, Oxon, UK, p. 295-303.
- Sarah J.L.; Pinochet, J.; Stanton, J. 1996. The burrowing nematode of bananas, *Radopholus similis* Cobb, 1913. *Musa Pest Fact Sheet No. 1*. Montpellier, France. INIBAP. 2p. Disponible en: www.ipgri.cgiar.org/publications/pdf/129_FR.pdf.
- Sarah, J.L. 1989. Banana nematodes and their control in Africa. *Nematropica* 19:199-216.
- Schuster R.P.; Sikora, R.; Amin, N. 1995. Potential of endophytic fungi for the biological control of plant parasitic nematodes. *Journal of the Agricultural University of Gent, Belgium* 60 (3b):1047-1052.
- Sikora, R.A. 2003. Uso potencial de antagonistas para la protección de las raíces de banano. In: *Syposium Internacional: Sistema Radical del Banano: hacia un mejor conocimiento para su manejo productivo*. San José Costa Rica. INIBAP/CORBANA. p. 74.
- Sikora, R.A. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 30:245-270.
- Soto, J.C. 2003. Evaluación de cuatro hongos endofíticos elite provenientes de suelos supresivos para el control biológico del nemátodo barrenador del banano, *Radopholus similis*. Tesis. Lic. Universidad de Tolima, Colombia. 120 p.

- Soto, M. 1992. Bananos: Cultivo y comercialización. San Jose. C.R. Litografía e Imprenta Lil. 649 p.
- Stover, R.; Simmonds, N. 1987. Bananas. 3th. edition. Longman Scientific and Technical. England. 467 p.
- Tzun, S.; Kloepper, J. 1995. Practical application and implementation of induces resistance. *In*: R. Hammerschmidt y J. Kuc, eds. Induced resistance to disease plants. The Netherlands, Kluwer academic publishers. p. 152-168.
- Umaña, G. 2002. Manual para el manejo en campo, cosecha y postcosecha de banano orgánico de exportación para pequeños agricultores. 1 ed. Costa Rica. ACCS. 67 p.
- Wuyts, N. *et. al.* 2003. Metabolitos secundarios en raíces y exudados de raíces y sus implicaciones en la resistencia a nemátodos en banano. *In*: Sipsosium Internacional: Sistema Radical del Banano: hacia un mejor conocimiento para su manejo productivo. San José Costa Rica. INIBAP/CORBANA. p. 92-94.
- Zum Felde, A. 2002. Screening of the endophytic fungi from banana (*Musa*) for antagonistic effects towards the burrowing nematode, *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. Thesis MSc. Bonn, Universität. 53 p.

V. Artículo 1.

Diversidad de hongos endofíticos y abundancia de nemátodos en plantaciones de banano de la parte baja de la Reserva Indígena de Talamanca

Palabras claves: Abundancia, monocultivos, nemátodos, riqueza, sistemas agroforestales, sistemas convencionales, sistemas orgánicos.

1. Introducción

Las fincas de la zona de Talamanca, en Costa Rica, son caracterizadas por tener una integración en sistemas de producción holísticos, donde la actividad agrícola es basada en el aprovechamiento de los mismos recursos generados en sistemas agroforestales. Un ejemplo de ello lo constituyen las fincas que alternan los cultivos de banano y cacao, que por sus condiciones particulares, tienen un alto reciclaje de nutrientes, una protección boscosa que sirve como barrera a plagas y enfermedades y, una gran diversidad de microorganismos interactuando en la rizósfera.

Se ha determinado que los sistemas de policultivos, que se caracterizan por ser ricos en materia orgánica, contienen mayor cantidad de microorganismos benéficos que los sistemas de manejo tradicional. La materia orgánica desempeña un papel muy importante en la dinámica de los suelos tropicales. Los sistemas naturales tienen una alta diversidad de microorganismos en el suelo, facilitando relaciones complejas como el parasitismo, hiperparasitismo y competencia; la descomposición de residuos vegetales y animales y el reciclaje de nutrientes (Gliessmann 1997; Altieri 1995; Sikora 1992; Baker y Dunn 1990). Los hongos son un componente importante en las comunidades microbianas (Agrios 1997; Augspurger 1983); ya que actúan como parásitos (biótrosos, necrótrofos o patógenos), saprófitos o mutualistas facultativos u obligados. La gran mayoría de hongos sin describir, consisten según Hawksworth (1993), en hongos asociados con las plantas. Diversos estudios han reportado la existencia de hongos que colonizan los tejidos internos de diversos hospederos, que van desde musgos, helechos hasta plantas herbáceas y maderables de clima templado.

Los hongos endofíticos, son organismos que colonizan los tejidos u órganos internos de una planta sin causar ningún tipo de síntomas. Cuando la colonización de los tejidos le confiere una protección a la planta hospedera contra el ataque de agentes bióticos y abióticos se denominan hongos endofíticos mutualistas (Carroll 1990; Latch 1993). Estos pueden brindar dos tipos de beneficios a las plantas: pueden alterar la fisiología de las plantas llevándolas a aumentar su crecimiento y pueden además incrementar la resistencia al estrés causado por factores bióticos y abióticos.

La diversidad biológica y las interacciones internas en los sistemas convencionales es más limitado, ya que el sistema está altamente simplificado en un área extensa y a altas densidades, por ejemplo, en plantaciones comerciales de banano se utiliza una o pocas variedades producción, lo que permite a las plagas llegar a niveles que afectan económicamente al cultivo.

La capacidad amortiguadora de un suelo en la naturaleza es efectiva para suprimir la mayoría de patógenos del suelos y problemas de nemátodos, pero en sistemas convencionales, el sistema amortiguador inherente de los suelos es distorsionado, si no es que destruido, por prácticas humanas tales como compactación por maquinaria agrícola, fertilización y otras prácticas de manejo, como la aplicación de nematicidas.

En la presente investigación, se determinó y comparó la diversidad de hongos endofíticos y la población de nemátodos entre los siguientes sistemas de producción orgánica de banano: banano en monocultivo (B), banano con cacao (B+C), banano con cacao y especies forestales (B+C+F), banano con especies forestales (B+F). La diversidad de hongos endofíticos y la población de nemátodos se comparó con sistemas de producción convencionales de banano (BanCon) y plátano (PlCon). De esta manera, se determinó el aporte que los sistemas agroforestales tienen sobre las poblaciones de microorganismos como los hongos endofíticos, como posibles agentes biológicos de control de fitonemátodos.

2. Materiales y métodos

2.1. Localización del estudio

Se muestrearon las plantaciones de banano orgánico en diez comunidades de la Reserva Indígena Bribri y Cabécar: Amubri, Sepecue, Shiroles, Watsi, Alto Cohen, Bratsi, Sibuju, San Miguel, San Vicente y Tsuiri. Las reservas indígenas Bribri y Cabécar se localizan en el cantón de Talamanca, Limón, Costa Rica, entre los 9° 21'38" y 9° 39'30" Norte y los 82° 50'40" y 83° 50'40" Oeste. La altitud sobre el nivel del mar varía entre 40 y 150 m en la planicie del valle y de 150 a 400 m en el piedemonte de la cordillera. El clima es tropical húmedo, con una precipitación anual de 2800 mm en el valle y aumenta hasta los 6400 mm en las partes más altas. La temperatura media anual es de 25.6 °C (Tmax=30.5 °C; Tmin=20.4 °C) (Kapp 1989; Borge y Castillo 1997).

Las parcelas de plátano convencional se seleccionaron dentro de las fincas de ASOMARGARITA, en el Valle del Sixaola, Talamanca, Limón, y las plantaciones de banano convencional se situaron en la finca San Pablo, Matina, Limón.

La extracción de nemátodos y el aislamiento y purificación de los hongos endofíticos se llevó a cabo en los laboratorios de Fitopatología y Nematología del CATIE, Turrialba, Costa Rica.

2.2. Selección de sitios de muestreo

El material vegetal muestreado fueron raíces de banano, de la variedad 'Congo', perteneciente al subgrupo Cavendish robusta (Umaña 2001; Rosales *et al.* 1999), comprendidos dentro de fincas de indígenas Bribri y Cabecares afiliados a la Asociación de Pequeños Productores de Talamanca (APPTA); así como raíces de banano y plátano variedad 'Cavendish' y 'Curraré' de plantaciones comerciales. Los sistemas de producción orgánica en de la zona de Reserva Indígena de Talamanca, y que fueron objeto de estudio, se describen en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Sistemas de producción de banano orgánico predominantes Talamanca.

Símbolo	Componentes del sistema
B	Banano (*)
B + C	Banano (*) alternado con cacao
B + C + F	Banano (*) alternado con cacao y especies forestales como maderables, frutales, leguminosas
B + F	Banano (*) alternado con frutales y maderables como <i>Cordia alliodora</i> y <i>Cedrela odorata</i>

(*) Gros Michel, Gran enano, Williams, Congo y/o Gros Michel

Para seleccionar el número de parcelas a muestrear se realizó un muestreo preliminar en 12 plantaciones de producción orgánica. Del premuestreo se obtuvieron 11 morfotipos distintos, con un porcentaje de variabilidad (% var=12.19). En el muestreo definitivo se utilizó un diseño de muestreo completamente al azar con 11 repeticiones, en donde las unidades experimentales correspondieron a parcelas de 1,5 ha en cada plantación evaluada.

Las parcelas muestreadas de los sistemas orgánicos se escogieron de las pertenecientes a productores de la Asociación de Pequeños Productores de Talamanca (APPTA), dentro del marco del proyecto de Producción de Banano Fresco (300 productores). Las plantaciones de Plátano y Banano convencional se escogieron de parcelas de productores de ASOMARGARITA y Finca San Pablo respectivamente.

2.3. Metodología de muestreo

Se colectaron raíces de 10 plantas seleccionadas al azar en cada unidad experimental y se mezclaron para obtener una muestra compuesta. Las raíces se tomaron en el área de sucesión (entre la madre y el hijo) de plantas cercanas a floración. Se muestrearon raíces en agujeros de 25 cm de diámetro x 25 cm de altura, localizadas frontalmente a 10 cm de la mata de banano, entre la planta madre y el hijo de sucesión. El material colectado fue transportado en bolsas plásticas debidamente identificadas antes de ingresarlas al laboratorio, e inmediatamente lavado a fin de remover tierra y arcillas. Posteriormente el material se refrigeró a 4 °C hasta procesarlas.

2.4. Aislamiento y clasificación morfológica de hongos endofíticos

Las raíces principales fueron lavadas y clasificadas en raíces funcionales y no funcionales. Posteriormente fueron desinfectadas con detergente líquido, estéril. Bajo condiciones asépticas se desecharon los dos extremos radiculares y fueron cortadas transversalmente en secciones de 1 - 1,5 cm. Los segmentos de raíces se colocaron dentro de baby food containers previamente autoclavados (25 min a 120 bares de presión y 240°C) y a los cuales se les adicionó una solución de NaOCl al 2.5%. Seguidamente, se seleccionaron al azar segmentos de raíces y fueron sometidos a esterilización en esta solución durante 3 minutos. A continuación, se les dieron tres enjuagues con agua destilada estéril durante 2 minutos cada vez. Cuatro segmentos esterilizados, seleccionados al azar, se sembraron en platos Petri (10 x 15 mm) con PDA 10% + Ácido Láctico (pH = 5). Los platos Petri fueron sellados con papel parafilm y llevados a incubación en condiciones de oscuridad a 23°C, hasta que se observó crecimiento del micelio. Los distintos aislados provenientes de los tejidos internos de las raíces fueron transferidos a platos Petri con PDA 100% + Ácido Láctico. Este proceso se llevó a cabo hasta que se obtuvieron aislados puros. Se clasificaron y cuantificaron los aislados endofíticos provenientes de cada parcela y se determinó la riqueza y abundancia de estos, en cada una de las localidades muestreadas.

Para la conservación de los distintos aislados obtenidos en este estudio, se transfirieron a PDA 10% dentro de tubos flexibles Ependorf de 1.5 ml y se almacenaron bajo condiciones de oscuridad y a 4°C.

La figura 1 representa la metodología utilizada para aislar los hongos endofíticos de los tejidos internos de las raíces.

2.5.Extracción de nemátodos

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

Se seleccionaron raíces funcionales y se cortaron en secciones transversales de 2 – 3 cm de longitud. Se tomó al azar 100 g del material y se vertieron en una licuadora comercial, se aforo a 200 ml con agua corriente y se licuaron a velocidad baja y alta, ambas por 10 seg. El contenido se tamizó en un juego de cribas (No. 18, 100, 325). Se efectuó un lavado para facilitar que los nemátodos fueran separados del tejido vegetal resultante con la ayuda de una pizeta. Los

nemátodos fueron colectados en cribas No. 325 y traspasados a recipientes plásticos con capacidad volumétrica de 250 ml y se almacenaron bajo condiciones de laboratorio.

Para identificar y cuantificar la población de nemátodos se tomaron alícuotas de 2 ml después de homogenizar la suspensión y se transfirieron a micro cámaras de conteo. Se realizaron dos conteos de nemátodos por alícuota un microscopio invertido Welman con un aumento de 4x. A partir de los nemátodos cuantificados por alícuota, se estimó la cantidad total de nemátodos por 100 g de raíz a través de una extrapolación con relación al volumen total. Asimismo, los nemátodos se identificaron hasta nivel género.

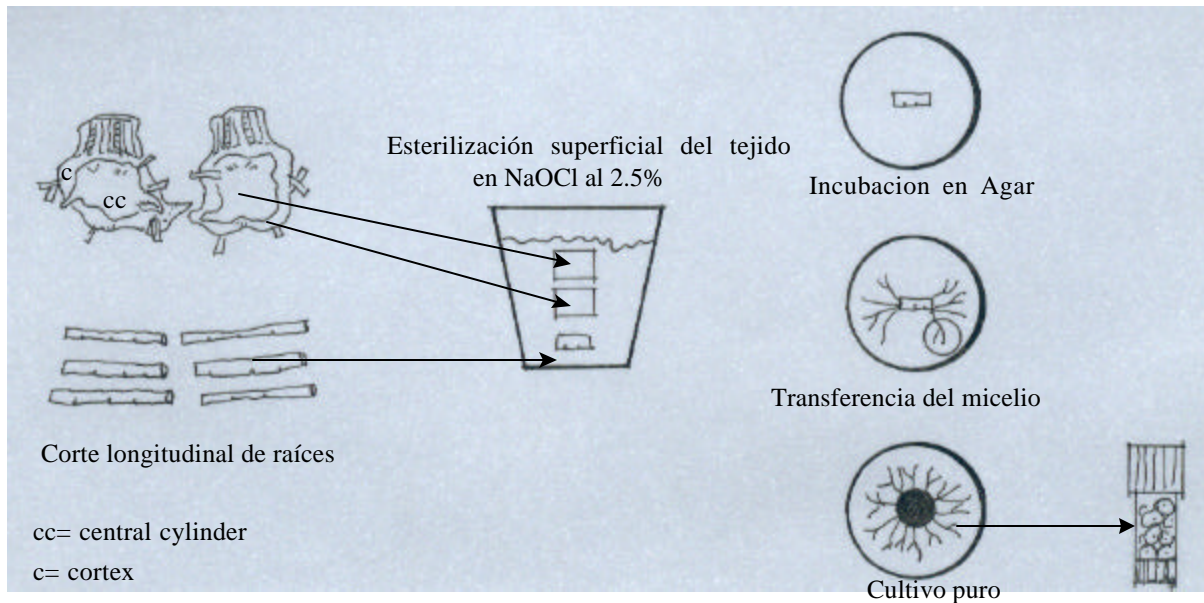


Figura 1. Protocolo utilizado para aislar los hongos endofíticos de raíces sanas de banano y plátano (Pocasangre *et al.* 2000).

2.6. Diseño experimental y análisis estadístico

2.6.1. Diseño del muestreo

Se efectuó un muestreo preliminar como primera etapa, donde se estimó la varianza de la población de hongos endofíticos. Se utilizó un ANDEVA para determinar el diseño de muestreo (irrestrito al azar o estratificado).

El porcentaje de variabilidad se calculó de la siguiente manera:

% variabilidad = $[\text{SC}(\text{tratamiento})/\text{SC}(\text{Total})] * 100$; donde,

- SC(tratamiento) = suma de cuadrados debido a localidad (parcelas muestreadas preliminarmente)

- SC(Total) = suma de cuadrados del total.

Si el porcentaje de variabilidad era menor al 50%, muestreo se efectuaría irrestrictamente al azar, y si el porcentaje de variabilidad es mayor al 50%, el muestreo debía estratificarse.

El número de muestras totales se calculó a partir de la siguiente fórmula:

$$n = (t^2 * s^2)/d^2; \text{ donde,}$$

d^2 = error de estimación aceptado (7.5% de la media)

s^2 = varianza del muestreo preliminar

t^2 = Constante (1.96²)

2.6.2. Riqueza de morfoespecies esperadas

Se estimó la riqueza total de morfoespecies esperada mediante el programa estadístico STIMATES 5 (Cowell 1997). Esta riqueza esperada se comparó con el número de morfotipos totales obtenidos y se determinó si los aislados registrados en el área de estudio eran una muestra representativa de lo esperado para la zona.

2.6.3. Riqueza, Abundancia y Similitud

Para cada estación de muestreo de las fincas orgánicas y convencionales, la riqueza y abundancia se tomaron para definir la diversidad que existe dentro cada parcela y los distintos tipos de sistemas. Asimismo, se estimó la similitud de morfoespecies existentes entre los sistemas orgánicos. Estos parámetros se obtuvieron mediante el programa Biological ToolBox versión 0.10 Add-In For Excel 5.0 – 7.0. Con base a la riqueza y abundancia de morfoespecies para cada estación de muestreo se obtuvo el índice de diversidad mediante la función de los índices de Shannon-Weiner, Simpson y de similitud mediante Dice. Sus fórmulas son las siguientes:

Índice de Simpson:

$$\lambda = \sum p_i^2$$

En donde p_i = abundancia relativa de la i -ésima especie en cada hábitat. Es decir, $(n_i/N)*100$.

Índice de Shannon:

$$H = - \sum [p_i(\ln p_i)].$$

Índice de Dice:

$$C_j = j / (a+b)$$

En donde j = número de especies comunes entre las fincas muestreadas; a = número de especies en la finca A y b = número de especies en la finca B.

2.6.4. Población de nemátodos

Para determinar diferencia en la población de nemátodos en función del tipo de sistema se utilizó un diseño de muestreo completamente al azar con 11 repeticiones por tipo de sistema.

El modelo estadístico para este arreglo se define matemáticamente como sigue:

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + \epsilon_{ij} + \delta_{ijk}; \text{ donde,}$$

Y_{ij} = Población de nemátodos

μ = media general

T_j = efecto del tipo de sistema

ϵ_{ij} = error experimental de la parcela parcela en función del sistema.

δ_{ijk} = error de muestreo, donde k pertenece al efecto de las lecturas efectuadas en el laboratorio.

Los datos de estas variables de respuesta fueron analizados mediante el análisis de la varianza (**PROC ANOVA, SAS** para Windows). Los conteos de los nemátodos se transformaron antes de realizar el análisis estadístico utilizando $\log(x + 0.1)$. Los promedios fueron comparados mediante una prueba de rangos múltiples de **DUNCAN** ($p < 0.05$).

3. Resultados

3.1. Diversidad de Hongos endofíticos

El número total de morfoespecies distintas encontradas en los territorios indígenas de Talamanca fue de 123, de un total de 371 aislados (Figura 2). La riqueza estimada por Chao1 y Bootstrap fue de 144-184 especies. Esto quiere decir que la riqueza observada alcanzó valores del 78-84% de la riqueza esperada indicando que se logró una buena representatividad en el muestreo.

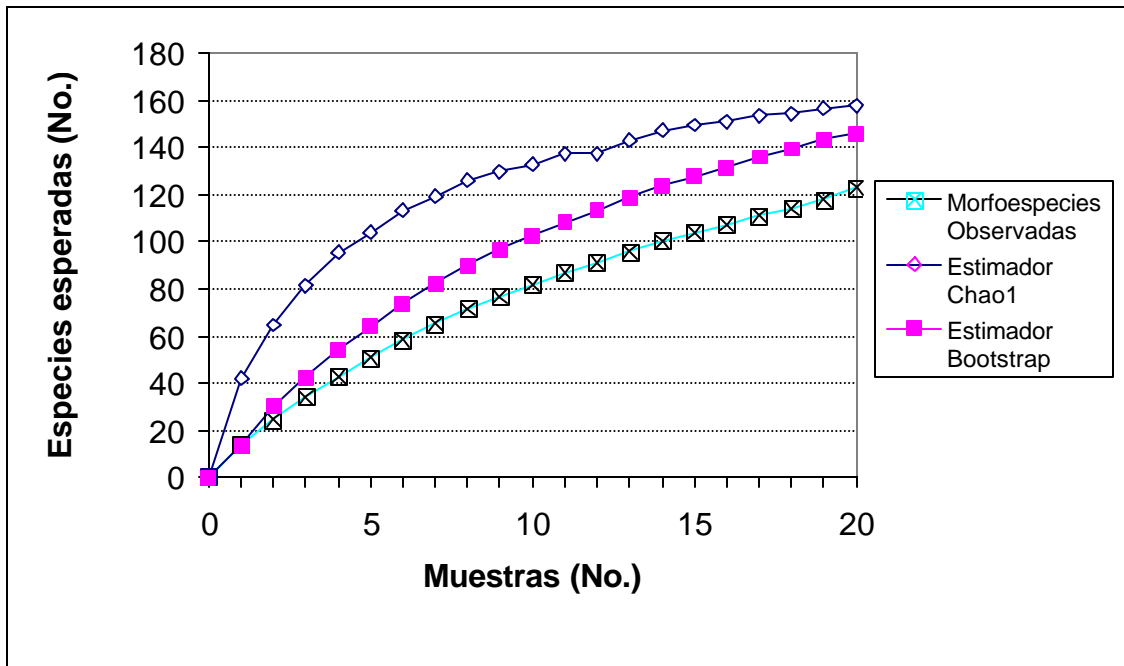


Figura 2. Curvas de riqueza esperada de morfoespecies de hongos endofíticos aislados en sistemas de banano orgánico en 10 comunidades de la Reserva Indígena de Talamanca, Costa Rica. Morfoespecies observadas = 123.

Los sistemas de monocultivo (B, PICon, BanCon) presentaron menor riqueza de hongos endofíticos (31-39) que los policultivos con cacao y especies forestales (46-68; Cuadro 2). En los policultivos, el asocio con forestales (68) tiene más riqueza de hongos endofíticos que el asocio con solo cacao (55). El policultivo banano-cacao-forestales deprimió la riqueza (46). El género *Trichoderma* es dominante en la producción convencional; un hongo aún no identificado fue dominante en el sistema B+F.

Cuadro 2. Diversidad, riqueza y abundancia de morfotipos aislados en sistemas de banano y plátano en la Reserva Indígena de Talamanca, Costa Rica.

Parámetro	B	B+C	B+C+F	B+F	PICon	Bancon
Riqueza	33	55	46	68	39	31
Abundancia	65	78	75	75	137	208
Diversidad						
Índice de Simpson	0,96	0,96	0,96	0,96	0,93	0,94
Índice de Shannon-Weiner	3,31	3,75	3,54	3,78	3,13	3,04

Simbología: B: banano en monocultivo; B+C: banano con cacao; B+C+F: banano con cacao y especies forestales; B+F: banano con especies forestales; BanCon: sistema convencional de banano y PICon: sistema convencional de plátano.

De los hongos aislados en los sistemas B, B+C, B+C+F, B+F, Bancon y PICon, morfotipos de los géneros *Fusarium* y *Trichoderma* sumaron el 45, 29, 30, 37, 65 y 54% de la riqueza total respectivamente (Figura 3). El género *Trichoderma* fue el más dominante en los sistemas de producción convencional, BanCon y PICon.

Asimismo, un hongo aun no identificado presentó la mayor dominancia en el sistema B+F. Los sistemas B, B+C y B+C+F tuvieron una distribución más uniforme en la frecuencia de los morfotipos aislados (Figura 4).

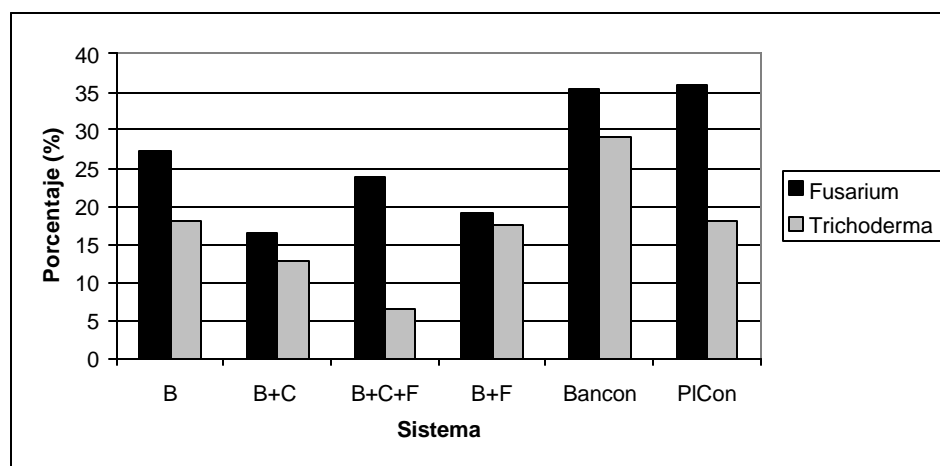


Figura 3. Porcentaje de morfoespecies pertenecientes a los géneros *Fusarium* y *Trichoderma* respecto a las morfoespecies totales.

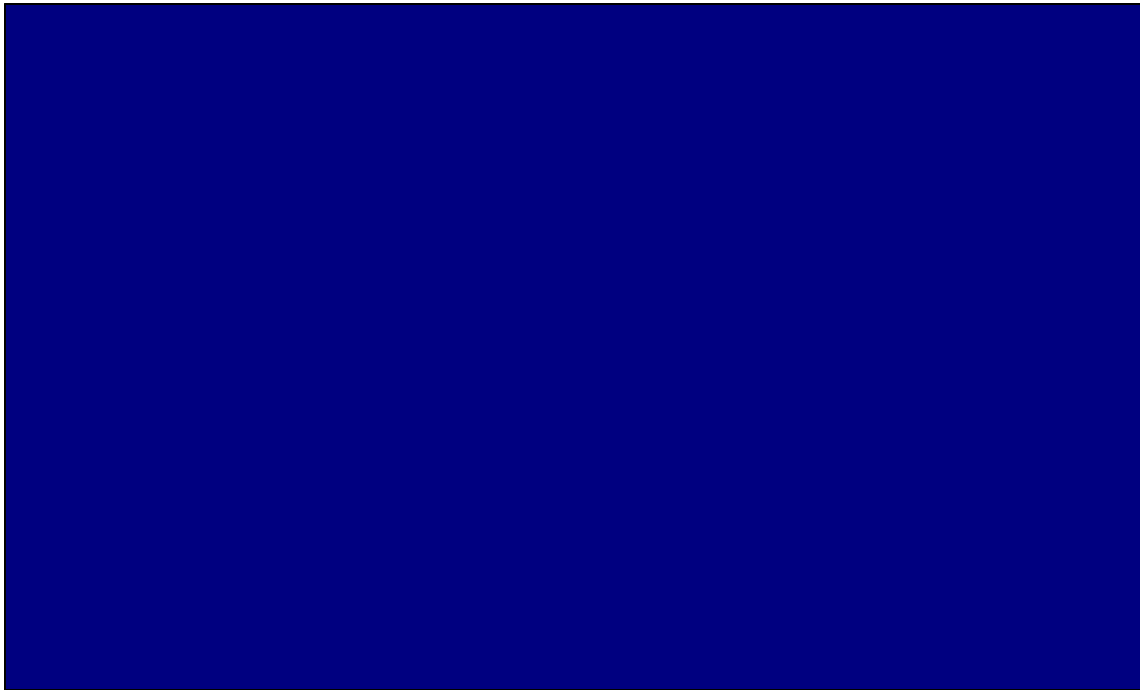


Figura 4. Curva de acumulación de morfoespecies encontradas en diferentes sistemas de producción de banano y plátano orgánicos y convencionales.

Los cuatro sistemas orgánicos (B, B+C, B+C+F y B+F) comparten entre el 34-48% de los morfotipos de hongos endofíticos cuando se comparan en forma pareada. No se observan patrones claros en el índice de Dice debido a los cultivos asociados con el banano (Cuadro 3), aunque hubo mayor semejanza entre los sistemas B y B+C (Índice de Dice, $D=0,48$), lo que indica que las especies encontradas entre ellos tienen una frecuencia similar de ocurrencia, a diferencia del valor encontrado entre los sistemas B+C y B+F, que indica que hay mayor diversidad ($D=0,34$; Cuadro 3).

Cuadro 3. Índice de similitud de Dice entre diferentes sistemas de producción orgánica de banano de la Reserva Indígena de Talamanca, Costa Rica.

Hábitat	B	B+C	B+C+F	B+F
B	1			
B+C	0,48	1		

B+C+F	0,41	0,38	1	
B+F	0,36	0,34	0,39	1

B: banano en monocultivo; B+C: banano con cacao; B+C+F: banano con cacao y especies forestales;
 B+F: banano con especies forestales.

3.2. Población de nemátodos

Se encontró diferencia significativa en la población de nemátodos entre los tipos de sistemas evaluados: *Rahopholus similis* ($p \leq 0.001$), *Helicotylenchus* spp ($p=0.002$), *Pratylenchus* spp ($p \leq 0.001$), *Meloidogyne* spp ($p=0.0276$) y saprofitos ($p \leq 0.001$). El cuadro 4 refleja la discriminación entre la media poblacional de nemátodos en los distintos sistemas de producción.

Cuadro 4. Comparación de la población de nemátodos en diferentes sistemas de producción de banano y plátano orgánicos y convencionales.

Sistema de producción	Nemátodos extraídos (100 g de raíz)					
	Género					FitTot
	R	H	P	M	S	
B	1027 c	155 a	209 b	76 a	185 b	1467 c
B + C	1120 c	67 b	125 b	33 ab	108 b	1346 c
B + C + F	500 c	33 b	63 b	8 b	29 c	604 c
B + F	1227 c	70 b	203 b	24 ab	79 b	1524 c
Bancon	8624 b	49 b	1269 a	3 b	439 a	9945 b
PlCon	15789 a	619 a	3393 a	154 a	967 a	19955 a

R: *Radopholus similis*; H: *Helicotylenchus* spp.; P: *Pratylenchus* spp.; M: *Meloidogyne* spp; S: nemátodos de vida libre; FitTot: Fitonemátodos Totales; B: banano en monocultivo; B+C: banano con cacao; B+C+F: banano con cacao y especies forestales; B+F: banano con especies forestales; BanCon: sistema convencional de banano y PlCon: sistema convencional de plátano. Letras distintas en la misma columna denotan diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

4. Discusión

4.1. Hongos endofíticos

Muchos autores sugieren que la mayoría de las plantas están colonizadas por hongos endofíticos y otro tipo de microorganismos con quienes establecen relaciones simbióticas (Clay 1988, Carroll 1988). Por ejemplo, Hawksworth (1993), sugiere que la gran mayoría de la diversidad de hongos sin describir consiste en hongos asociados con las plantas. Los hongos endofíticos se han reportado en diversos hospederos, tales como musgos, algas, helechos, monocotiledóneas y dicotiledóneas herbáceas o maderables (Arnol 1999; Petrini *et al.* 1991; Carroll 1990; Clay 1988). En plantas del género *Musa* sp, se han reportado en repetidas ocasiones la existencia de esta simbiosis (Zum Felde 2002; Photita 2001; Pocasangre *et al.* 1999).

Se encontró una diversidad de 123 morfotipos distintos en los sistemas de producción de banano orgánico. De los hongos aislados en los sistemas B, B+C, B+C+F, B+F, Bancon y Plcon, morfotipos de los géneros *Fusarium* y *Trichoderma* sumaron el 45, 29, 30, 37, 65 y 54% de la

riqueza total respectivamente. Dichos géneros tuvieron un valor mas alto de ocurrencia en los sistemas de banano como monocultivo y los convencionales. *Fusarium* no se encontró con el mismo valor de abundancia como ocurrió con *Trichoderma* aunque sí con mayor frecuencia.

En diversos estudios, *Fusarium* spp se ha reportado como endofítico natural en cultivares diversos de banano, incluyendo banano de cocción, de postre, de altura y plátano, pertenecientes a genomas diploides, triploides y tetraploides (Pocasangre 2000; Griesbach *et al.* 1999; Schuster *et al.* 1995; Amin 1994). Por ejemplo, Pocasangre (2000) reporta una frecuencia mayor de *Fusarium*, tanto en las raíces, la corteza y el cilindro central del cormo, en diferentes cultivos de banano, en un estudio hecho en Centroamérica y Cuba. El los resultados de la presente investigación, especies de *Fusarium* y *Trichoderma* fueron encontradas con alta frecuencia en todos los sistemas de producción estudiados. Por otra parte, especies del género *Trichoderma* fue aislado con mayor abundancia en el sistema BanCon. Este hecho se atribuye a constantes aplicaciones de materia orgánica enriquecida con *Trichoderma* con el fin de buscar un control biológico hacia nemátodos (Araya *comm. pers.*).

Igualmente en un estudio realizado por Zum Felde (2002) en suelos de plantaciones bananeras ubicadas en el Valle de Motagua, Panchoy y Bobos, Izabal, en Guatemala, se encontró una dominancia de hongos endofíticos pertenecientes a *Fusarium* y *Trichoderma*. Este estudio abarco suelos supresivos y no supresivos hacia el nematodo barrenador. El estudio reporta que la presencia de hongos endofíticos de diversas especies, resultó en una frecuencia mayor en los suelos no supresivos y medianamente supresivos, que en los supresivos, caso contrario a lo que reportó Pocasangre *et al.* (2000) y Pocasangre (2000), en un estudio llevado a cabo en Centroamérica y Cuba. Esto sugiere que la supresividad no implica necesariamente la existencia de pocos microorganismos, sino a la presencia de un diverso espectro de microorganismos que desarrollan interacciones complejas que en cierto punto alcanzan un equilibrio natural en el sistema.

4.2. Población de nemátodos

En este estudio, la población de nemátodos en los sistemas orgánicos resulto en valores menores que en sistemas convencionales de banano y plátano. En los sistemas de cultivo intensivo los problemas de nemátodos son muy marcados, ya que los sistemas están altamente simplificados (una sola variedad) en un área extensa y en altas densidades de plantas (Sarah 1998). Además, los sistemas convencionales utilizan pesticidas e insumos externos que afectan la diversidad biológica y sus interacciones internas (Altieri 1992), y reducen el potencial antagonista de la microflora presente en la rizósfera (Carroll 1990).

Los sistemas orgánicos tuvieron menor población de nemátodos fitopatógenos, particularmente de *Radopholus similis* que los sistemas convencionales. Este hecho podría atribuirse a que la riqueza de hongos endofíticos encontrada fue mayor que en los sistemas convencionales. Esto puede estar correlacionado a la diversidad de microorganismos que existe en los suelos con alto contenido de materia orgánica, ya que el manejo de los sistemas orgánicos contribuye a que los suelos sean supresivos, en contraste a los de manejo convencional (Sikora 1992; Baker y Cook 1982).

A pesar que en plantaciones comerciales se efectúan programas de control hacia nemátodos, los sistemas BanCon y PICon presentaron poblaciones de fitonemátodos significativamente más altas que los sistemas orgánicos. Esto puede atribuirse a que los nematocidas tienen un efecto nematostático, el cual no es propiamente mortal, sino que de inmovilización (Hartwig y Sikora 1991), y a que éstos tienen un efecto biocida sobre los microorganismos propios de la rizósfera, que bajo condiciones naturales ejercen un efecto supresivo a nemátodos.

El género *Meloidogyne* presentó poblaciones bajas en B+F, B+C+F y BanCon, contrario a lo encontrado en PICon y B. Los noduladores son los nemátodos parasíticos más extendidos en el mundo por ser altamente polífagos, y son dominantes en situaciones donde los nemátodos migratorios no están presentes o se encuentran en bajas densidades (Sarah 1998). Asimismo, el alto nivel poblacional de *Meloidogyne* encontrado en este estudio, en las plantaciones de plátano, concuerda con los resultados de diversos estudios que han demostrado que sistemas de producción de plátano presentan poblaciones altas de éste género (Coronado 1991).

El género *Helicotylenchus* presentó la mayor población en PICon. Se ha reportado que *Helicotylenchus* a menudo se encuentra mezclado con otras especies dominantes como *R. similis*, y puede ser la especie problema parasítica del suelo donde *R. similis* no puede sobrevivir, o bien, en lugares minifundistas; también se le ha encontrado como abundante en plantaciones de plátano (Sarah 1998; Sarah 1990).

La población de *Pratylenchus* fue mucho más alta en los sistemas PICon y BanCon. Este género es el más difundido en el área Tropical. Se encuentra muy acentuado en plantaciones comerciales de Honduras y África del sur (Pinochet y Rowe 1978) pero no puede ser la especie dominante. Se le ha reportado como extensamente difundido en plátano o en los bananos de cocción de Asia, África y Latinoamérica (Sarah 1998).

La diferencia ($p \leq 0,001$) en la población de fitonemátodos entre los sistemas convencionales y los orgánicos, sugiere que los sistemas convencionales de producción comercial son más susceptibles a ser afectados por altas poblaciones de nemátodos y, la existencia de una baja diversidad de hongos endofíticos. La diferencia encontrada entre el valor mínimo y máximo de diversidad de hongos endofíticos y la abundancia de fitonemátodos encontrada entre los sistemas convencionales y los

orgánicos reflejó ser amplia [Diversidad de hongos endofíticos: H= (BanCon=31 contra B+F=68) ; Población de fitonemátodos: Nemátodos / 100 g = (PlCon=19956 contra B+C+F=604 y B+F=1524)]. Esto resultó en que en un suelo orgánico la población de fitonemátodos fue 15 veces menor que en los sistemas de producción convencional.

Los resultados encontrados en la presente investigación evidencian que una de las razones que explican las bajas densidades de nemátodos en comparación a los sistemas convencionales, se debe a la presencia de agentes biológicos de control, que están ejerciendo su actividad antagonista en forma de biocontrol natural en los sistemas orgánicos. Consecuentemente, la selección de estos biocontroladores es importante para conocer su mecanismo de acción, e incorporar éstos en programas de manejo integrado de nemátodos. Con base a éste estudio, se postulan las siguientes conclusiones.

5. Conclusiones

1. Los sistemas de producción orgánicos de banano presentaron una mayor diversidad de hongos endofíticos que los sistemas de producción convencional de banano y plátano.
2. Los sistemas agroforestales (banano con cacao y especies forestales) presentaron mayor diversidad de hongos endofíticos que los sistemas de monocultivo (banano en monocultivo, y banano y plátano convencionales).
3. Los sistemas agroforestales y orgánicos presentaron menor población de nemátodos que los sistemas de producción convencional, hecho que se atribuye a la existencia de complejas interacciones entre microorganismos, y a la estructura simplificada de los sistemas convencionales.

6. Referencias bibliográficas

- Agrios, GN. 1997. Fitopatología. 7 ed. USA. Academic Press. 838 p.
- Altieri, MA. 1992. Biodiversidad, agroecología y manejo de plagas. Centro de Estudios en Tecnologías Apropriadas para América. Valparaíso. Chile. 162 p.
- Altieri, MA. 1995. Agroecology: the science of sustainable agriculture. Londres. Westview. 433 p.
- Amin, N. 1994. Untersuchunhen über die Bedeutung endophytischer Pilze für die biologische Bekämpfung des wandernden Endoparasiten *Radopholus similis* (Cobb) Thorne an Bananen. Ph.D. Thesis. Germany. Bonn Universität. 122p.
- Arnol, A.E. 1999. Fungal endophyte of tropical trees: methods and potential for biological control of fungal pathogens of cocoa. In U. Krauss; P. Hebban. eds. Workshop on research methodology in biocontrol of plant diseases with special reference to fungal diseases of cocoa. Turrialba, Costa Rica. Workshop manual. CATIE. 44-54p.
- Augspurger, DK. 1983. Seed dispersal of the tropical tree, *Platypodium elegans* and the escape of its seedlings from fungal pathogens. Journal of ecology (71):759-771.
- Baker, RR.; Dunn, PE. eds. 1990. New directions in biological control: alternatives for suppressing agricultural pests and diseases; proceedings of a UCLA Colloquium, Frisco, Colorado, 1989. New York, Alan R. Liss. 837 p.
- Baker, KF.; Cook R J. 1982. Biological control of plant pathogens. Saint Paul, MN, APS Press. 433 p.
- Booth, C. 1971. The genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. England. Kew. 237p.
- Borge, D.H.; Castillo, R. 1997. Cultura y conservación en la Talamanca indígena. San José, Costa Rica. Editorial Universidad Estatal a Distancia. 259 p.
- Carroll, GC. 1988. Fungal endophytes in stems and leaves: from latent pathogen to mutualistic symbiotyc. Ecology 6:2-9.
- Carroll, GC. 1990. Fungal endophytes in vascular plants: Mycological research opportunities in Japan Transactions of the Mycological Society Japan 31:103-116.
- Clay, K. 1988. Fungal endophytes of grasses: a defensive mutualism between plants and fungi Ecology. V. 69:10-16.
- Coronado, SB. 1991. Contribución al conocimiento de los nemátodos parásitos que afectan los cultivos de plátano (*Musa* AAB) de la zona cafetera central. Bogotá. Tesis Ing. Agr. Universidad Nacional de Colombia. 160 p.
- Cowell, RK. 1997. ESTIMATES: Statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 5.0. User's guide and application published at: <http://viceroy.eeb.econn.edu/ESTIMATES>.

Gliessman, S. 1997. Agroecology: Ecological processes in the sustainable agriculture. USA. Sleeping Bear Press. 285p.

Griesbach, M; Gold, C.S; Speijer, P.R; Schuster, R.P.; Sikora, R.A. 1999. A new strategy for biological control of the banana weevil (*Cosmopolites sordidus* Germar) in East Africa. In Fruit Production in the Tropics and Subtropics. Bonn. Germany. p. 27.

Hair, J. 1987. Medida de la diversidad ecológica. In: R. Rodriguez. Ed. Manual de técnicas de gestión de vida silvestre. The Wildlife Society. Maryland. p. 283-289.

Hartwig, J; Sikora, RA. 1991. Mode of action of the carbamate nematicides Cloethocarb, Aldicarb and Carbofuran toward *Heterodera schachtii*. Contact activity. Review of Nematology 14:525-530.

Kapp, G.B. 1989. Perfil ambiental de la zona baja de Talamanca, Costa Rica. Turrialba, CR. CATIE- GTZ-DGF. 97 p. (Informe Técnico 155).

Latch, GCM.1993. Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts; biotic stress tolerance imparted to grasses by endophytes. Agriculture, Ecosystems and Environments 44:143-156.

Petrini, O; Sieber, TN; Toti, L; Viret, O. 1992. Ecology, metabolite production, and substrate utilization in endophytic fungi. Natural Toxins 1:185-196.

Photita, W. 2001. Endophytic fungi of wild banana (*Musa acuminata*) at Doi Suthep Pui National Park, Thailand. Mycological Research 105 (12):1508-1513.

Pinochet, J.; Rowe, P.R. 1978. Reaction of two banana cultivars to three different nematodes. Plant Disease Reporter 62:727-729.

Pocasangre, L.; Sikora, R.A.; Vilich, V.; Schuster, P. 2000. Survey of banana endophytic fungi from Central America and screening for biological control of *Radopholus similis*. In M. Blanke; J. Pohlman. 2000. Eds. ISHS Conference on Fruit Production in the Tropics and Subtropics (2, 2000). Bonn. p. 283-289..

Pocasangre Enamorado, 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*). Tesis Ph.D. Bonn, Germany. Universität Bonn. 117 p.

Pocasangre, L; Sikora, RA; Vilich, V; Schuster, RP. 1999. Survey of banana endophytic fungi from Central America and screening for biological control of *Radopholus similis*. Acta Horticulturae 531: 283-289.

Rosales, F.; Arnaud, E.; Coto, J. Eds. 1999. A catalogue of wild and cultivated bananas: A tribute to the work of Paul H. Allen. Montpellier, France. INIBAP/FHIA. 364 p.

Sarah, J. L. 1998. Las prácticas culturales como medio de control de nemátodos en el banano. In F.E. Rosales; S.C. Tripon; J. Cerna. Eds. Producción de Banano Orgánico y/o ambientalmente amigable. Memorias del taller internacional realizado en la EARTH, Guácimo, Costa Rica. Montpellier, Francia. INIBAP/CIID/EARTH. INIBAP. p. 138-151.

- Sarah, J. L. 1990. Las plagas del plátano. *In* Las plagas del plátano. Bogotá. CENICAFE. 1 p.
- Schuster, R. P.; Sikora, R.A.; Amin, N. 1995. Potential of endophytic fungi for the biological control of plant parasitic nematodes. *Mededelingen van de Faciteit Landbouwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent* 60:1047-1052.
- Sikora, RA. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for the biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 30: 245-270.
- Umaña, G. 2002. Manual para el manejo en campo, cosecha y postcosecha de banano orgánico de exportación para pequeños agricultores. 1ed. Costa Rica. ACCS. 67 p.
- Zum Felde, A. 2002. Screening of the endophytic fungi from banana (*Musa*) for antagonistic effects towards the burrowing nematode, *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. Thesis MSc. Bonn, Germany. Bonn Universität. 53 p.

VI. Artículo 2

Utilización de hongos endofíticos provenientes de plantaciones de banano orgánico para el control biológico del nemátodo barrenador (*Radopholus similis* Cobb) Thorne.

Palabras clave: Control biológico, hongos endofíticos, prueba de parasitismo, prueba de antibiosis, Unidades Formadoras de Colonia (UFC), *Radopholus similis*, *Trichoderma*, *Fusarium*, biocontrol, promoción de crecimiento.

1. Introducción

El daño ocasionado por fitonemátodos es una de las mayores limitaciones en el cultivo de banano y plátano, reportándose reducciones del 30 al 50% de la producción total (Davide 1996). En Latinoamérica se reporta que los géneros más importantes asociados en la producción de bananos y plátanos son *Radopholus similis*, *Pratylenchus coffeae*, *P. goodeyi*, *Helicotylenchus multicinctus* y *Meloidogyne* spp. (Gowen y Quénéhervé 1990). A pesar que varias especies de nemátodos atacan el cultivo del banano, se considera que *R. Similis* es el problema principal en plantaciones comerciales, especialmente de las variedades pertenecientes al subgrupo Cavendish.

El uso de nematicidas para controlar los fitonemátodos, tienen efectos ambientales adversos y son muy costosos para los agricultores de subsistencia (Dochez 2000; Sarah 1989). En general, en plantaciones comerciales de banano, para alcanzar niveles rentables de producción, se hace necesaria la aplicación de dos a cuatro aplicaciones de nematicida por año (Chabrier y Quénéhervé 2003). A pesar de que el control químico es bastante efectivo para controlar los nemátodos, los nematicidas autorizados hoy en día son muy pocos.

La reducción de las poblaciones de nemátodos en el suelo antes de la siembra y el uso de material de siembra sano es de gran importancia para el control del nemátodo barrenador. La mejor manera para evitar la contaminación de suelos sanos, es utilizando plantas propagadas *in vitro*, libres de nemátodos, lo cual, en la actualidad, es la fuente más común de material de siembra, siendo el procedimiento mas recomendable para introducir material a terrenos que van a ser replantados. Sin embargo, cuando las vitroplantas son establecidas en suelos infestados en nemátodos, éstas resultan ser más susceptibles que las plantas provenientes de cormos, y la recontaminación con el nemátodo barrenador es comúnmente observada después del primer ciclo de producción (Chabrier y Quénéherve 2003; Sarah *et al.* 1996).

Una alternativa que ha sido estudiada últimamente para el control biológico del nemátodo barrenador, es la utilización de hongos endofíticos, ya que ellos colonizan los tejidos internos de las plantas (Carroll 1990). El control biológico del nemátodo barrenador dentro de las plantas puede llevarse a cabo mediante la inoculación de hongos endofíticos, ya que ambos organismos colonizan las raíces y de allí que, es de esperar, se genere una interacción entre ellos al compartir el mismo nicho ecológico. Se ha demostrado en diversos estudios que la inoculación de vitroplantas con ciertos aislados endofíticos conllevan a la reducción del ataque de nemátodos, así como un efecto aditivo en el aumento del crecimiento de las plantas (Soto 2003; Zum Felde 2002; Pocasangre 2000; Schuster *et al.* 1995; Amin 1994; Hallman y Sikora 1994; Sikora 1992). Estos tienen potencial de ser usados como agentes de biocontrol para plántulas derivadas de cultivo de tejidos, por la poca cantidad de esporas necesarias para poder inocularlas antes de ir al campo definitivo (Schuster *et al.* 1995).

La presente investigación evaluó la actividad antagonista de los hongos endofíticos provenientes de fincas orgánicas de la zona de la reserva indígena de Talamanca, Costa Rica. Aislados endofíticos del género *Fusarium* y *Trichoderma* fueron evaluados a nivel *in vitro* para identificar la actividad nematocida contra *R. similis*. Asimismo, se efectuó un bioensayo, mediante la protección de vitroplantas con los aislados endofíticos que tuvieron mejor biocontrol a nivel *in vitro*. De esta manera se evaluó la capacidad antagonista de los hongos endofíticos contra *R. similis*, y la promoción de crecimiento que puede resultar de cambios metabólicos inducidos en la planta.

2. Materiales y métodos

2.1. Screening *in vitro* para determinar el potencial antagonista del los hongos endofíticos contra *Radopholus similis*

2.1.1. Aislados endofíticos utilizados para las pruebas de parasitismo y antibiosis.

Se evaluaron hongos del género *Fusarium* spp. y *Trichoderma* spp. por su conocida actividad antagonista contra *R. similis* (Zum Felde 2002; Pocasangre *et al.* 2000). Los hongos endofíticos que provenían de parcelas con más diversidad de hongos endofíticos y menor población de fitonemátodos (Anexo 1 y 2), y que presentaron mayor número de unidades formadoras de colonias (UFC) y mayor porcentaje de germinación (referencia en sec. 2.1.2), fueron sometidos a las pruebas de parasitismo y antibiosis contra *R. similis*.

2.1.2. Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC) y porcentaje de germinación

Cultivos de dos semanas de crecimiento en PDA, fueron usados para la preparación de una suspensión de esporas. Se agregaron 20 ml de agua destilada, y con la ayuda de una espátula metálica estéril, se procedió a remover las esporas y micelio para obtener la suspensión de esporas. Una vez obtenida la solución, se procedió a contar las UFC mediante un hematocímetro de Neubauer. El conteo se realizó en un microscopio Olympus BH2 con aumento 40x. Además, se determinó el porcentaje de germinación de micro y macroesporas (Cuadro 5). Esto se efectuó inoculando hongos en PDA 10% y contabilizando las esporas germinadas por cada 100 esporas observadas al azar mediante una micro cámara a un aumento 40x.

2.1.3. Cultivo aséptico de *Radopholus similis*

Cultivos puros de *R. similis* provenientes del laboratorio de Nematología de CORBANA, Siquirres, Limón, Costa Rica, fueron subcultivados para su reproducción en discos de zanahoria según la metodología descrita por Speijer y De Waele (1997) y O'Bannon (1968).

Estos cultivos se dejaron aproximadamente seis semanas en una cámara oscura, a una temperatura de 27°C. Los nemátodos móviles que se encontraban en la superficie de los Petri (35mm) fueron colectados para su transferencia a nuevos discos de zanahoria.

Cuadro 5. Porcentaje de germinación y unidades formadoras de colonias (UFC) de *Fusarium* y *Trichoderma* evaluadas mediante las pruebas de parasitismo y antibiosis.

Código	Género	Parcela de origen	% Germinación(*)	UFC (1)	Agresividad en crecimiento (2)	P	A
P22	<i>Trichoderma</i>	34 -am	n.d.	n.d.	↑		X
P23	<i>Trichoderma</i>	33-se	n.d.	n.d.	↑	X	X
P17	<i>Fusarium</i>	20-s	1,6	8E+08	↑	X	X
P21	<i>Trichoderma</i>	16	0	8E+08	↑	X	X
P25	<i>Trichoderma</i>	51-fil	0	4E+08	⇒	X	X
P24	<i>Trichoderma</i>	1	0	3E+08	↑	X	X
P5	<i>Fusarium</i>	20-s	3,63	3E+08	↑	X	X
P7	<i>Fusarium</i>	20-s	4,3	3E+08	⇒	X	X
P11	<i>Fusarium</i>	20-s	7,57	2E+08	↑	X	X
P19	<i>Fusarium</i>	34-am	2	2E+08	⇒	X	X
P28	<i>Fusarium</i>	4	6,77	1E+07	↑		
P18	<i>Fusarium</i>	b2	8,48	1E+08	↑	X	
P15	<i>Fusarium</i>	40-shi	8	1E+08	↑	X	X
P8	<i>Fusarium</i>	37-bc	2,64	9E+07	⇒	X	
P3	<i>Fusarium</i>	32-se	46,42	8E+07	⇒	X	X
P14	<i>Trichoderma</i>	33-se	1,52	8E+07	↑	X	X
P12	<i>Fusarium</i>	33-se	8,57	7E+07	⇒	X	X
P16	<i>Fusarium</i>	I	11,65	6E+07	↑	X	X
P6	<i>Fusarium</i>	33-se	1,55	5E+07	⇒	X	
P2	<i>Fusarium</i>	39-shi	24,54	5E+07	⇒	X	X
P10	<i>Fusarium</i>	39-shi	5,47	4E+07	↑	X	
P1	<i>Fusarium</i>	32-se	49	1E+06	⇒	X	X

Simbología:

(*) = 24 hr después de la inoculación

UFC = Unidades Formadoras de Colonias

(1) Contabilizadas a las dos semanas de edad (hongos esporulados)

(2) Agresividad del crecimiento hifal (desarrollo en PDA 100%)/
Determinado cualitativamente y no sometido a análisis de varianza.

⇒ = medio

↑ = alto

P = Prueba de parasitismo

A = Prueba de antibiosis

2.1.4. Preparación de discos de zanahoria estériles para la reproducción de *Radopholus similis*

Bajo condiciones estériles, zanahorias frescas previamente desinfectadas con detergente líquido, fueron asperjadas con alcohol al 70% y flameadas por tres veces consecutivas. En papel servilleta autoclavado, se procedieron a cortar transversalmente en discos de 3 a 5 mm aproximadamente con un bisturí previamente flameado. Cada disco fue transferido con pinzas estériles a platos Petri de 35 mm y sellados con papel parafilme.

2.1.5. Inoculación de los discos de zanahoria con *Radopholus similis*

Los nemátodos visibles en la superficie de los discos de zanahoria se procedieron a lavarlos con agua estéril. La solución fue recolectada en viales estériles por medio de una pipeta. Por cada dos milímetros de suspensión de nemátodos, se utilizó un milímetro de Sulfato de estreptomicina (solución líquida de 2000 ppm) para esterilizarlos. Se dejaron reposar por media hora hasta que se formara un precipitado de nemátodos y fuera posible remover el sobrenadante. Posterior a esto, se lavaron por tres veces, aplicando agua estéril y dejando reposar hasta la formación de precipitado. Se procedió a remover nuevamente el sobrenadante a modo de dejar la mayor concentración de individuos en el menor volumen posible de agua.

Posteriormente a la desinfección de los nemátodos, seis gotas de la solución de nemátodos fueron depositadas en las orillas de los discos de zanahoria estériles. Estos cultivos fueron almacenados en incubadoras, bajo condiciones de oscuridad, a 27°C.

2.1.6. Prueba de parasitismo

Los hongos endofíticos seleccionados fueron transferidos a platos Petri conteniendo PDA al 100%. Dependiendo de la rapidez del crecimiento micelial, se dejaron crecer de 2 a 5 días, hasta que alcanzaron un diámetro de 4 cm aproximadamente. Cuando las colonias adquirieron el tamaño de 4 cm, se inoculó una suspensión de 100 nemátodos estériles contenidos en una alícuota de 0,25 ml de agua estéril por plato Petri. El co-cultivo se incubó en condiciones de oscuridad y a una temperatura de 27°C. Este fue observado a las 24 horas después de la inoculación mediante un microscopio a una resolución 10x. Asimismo, la acción parasítica de los aislados sobre *R. similis* fue captada mediante fotografías hechas mediante una cámara Olympus C35AD-2. Las variables

evaluadas en esta prueba fueron número de nemátodos vivos, muertos e inmóviles. El testigo (T0) consistió en inocular 0,25 ml de la suspensión de nemátodos en platos Petri con PDA 100%.

2.1.7. Obtención de los extractos crudos para la prueba de antibiosis

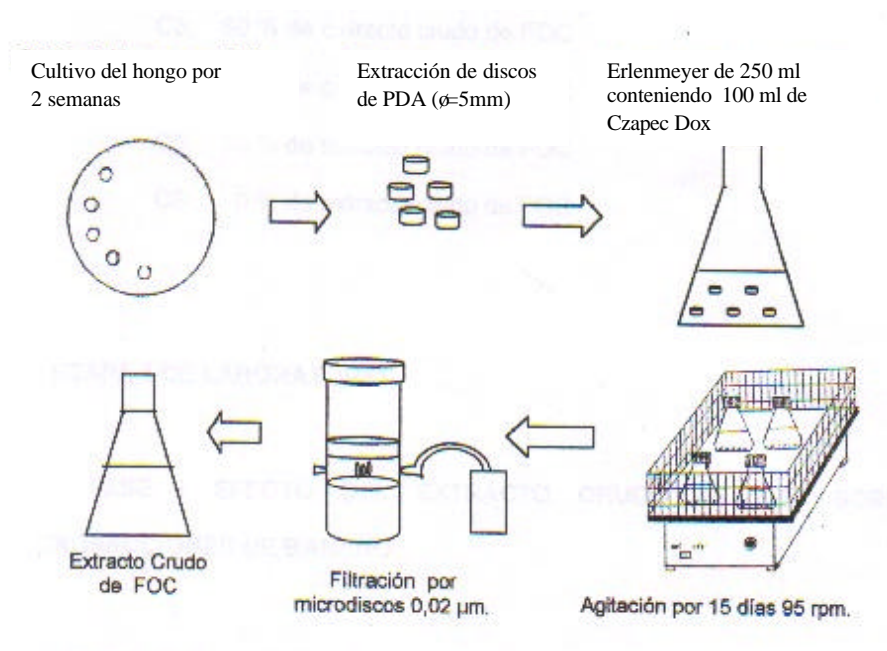
Los criterios utilizados para escoger los aislados que debían ser sometidos a la prueba de antibiosis se basaron en la velocidad de crecimiento de las hifas, así como la capacidad de producción de UFC. Asimismo, se tomaron en cuenta los resultados de la prueba de parasitismo. Los aislados seleccionados se dejaron crecer en PDA 100% por dos semanas de manera que éstos se encontraran esporulados. Cinco discos de PDA conteniendo micelio de los hongos endofíticos fueron extraídos del plato Petri, mediante un barreno de aluminio de 5mm de diámetro. Estos fueron transferidos en una solución líquida de 100 ml de Czapek Dox (CD) contenidos en Erlenmeyers de 250 ml previamente esterilizados, y llevados a un shaker horizontal, a una velocidad de 95 rpm durante 15 días, en oscuridad. Para obtener la solución de los metabolitos secundarios generados por los hongos, el contenido de los Erlenmeyers fue filtrado bajo condiciones estériles. La filtración inicial se realizó a través de papel Wattman # 5, seguido por una segunda filtración a millipore Syringe de 0,22 μ m. El filtrado así obtenido, se empacó en viales de 100 ml previamente estériles. La figura 5 resume el protocolo utilizado para la obtención de los extractos crudos.

2.1.8. Prueba de antibiosis

Del extracto puro (solución madre), se efectuaron diluciones de 25, 50 y 75 por ciento. Estas soluciones fueron almacenadas bajo condiciones de oscuridad a $4 \pm 2,5$ °C hasta su utilización.

La efectividad de los extractos resultantes en cuanto a su capacidad nematicida fue determinada mediante el co-cultivo de 100 nemátodos (contenidos en 0,25ml de agua) con cada una de las distintas concentraciones (25, 50, 75 y 100%).

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



24 horas.

Figura 5. Protocolo utilizado para la obtención de extractos crudos de los hongos endofíticos.

2.1.8. Plan experimental para la evaluación de parasitismo y antibiosis

2.1.8.1. Prueba de parasitismo

El análisis estadístico para esta prueba consistió de un Análisis de Varianza para un Diseño Completamente al Azar con 3 repeticiones. Las variables de respuesta fueron número de nemátodos vivos, muertos e inmóviles.

El modelo matemático corresponde al siguiente:

$$Y_{ij} = \mu + T_j + e_{ij}; \text{ donde,}$$

Y_{ij} = variable a medir (nemátodos vivos, muertos e inmóviles)

μ = media general

T_j = efecto de tratamiento (hongos endofítico evaluado)

e_{ij} = error experimental.

2.1.8.2. Prueba de antibiosis

Para esta prueba se utilizó un Análisis Factorial para un Diseño de Tratamientos Completamente al Azar con 3 repeticiones, donde se analizaron los niveles de concentración 25%, 50%, 75% y 100%, de la solución metabólica de cada tratamiento evaluado, en función del tiempo, 0, 8, 16 y 24 horas después del primer contacto.

Las variables de respuesta fueron nemátodos vivos y muertos encontrados en cada lectura.

El modelo matemático corresponde al siguiente:

$$Y_{ijkl} = \mu + H_i + C_j + H_{cij} + e_{l(ij)} + T_k + Th_{ik} + T_{cij} + TH_{Cijk} + E_{ijkl}; \text{ donde,}$$

Y_{ijkl} = variable a medir (nemátodos vivos, muertos e inmóviles)

μ = media general

H_i = efecto de tratamiento (hongos endofíticos evaluados)

C_j = efecto de la concentración evaluada por tratamiento

T_k = efecto del tiempo sobre las variables medidas

$e_{l(ij)}$ = error experimental en función del tratamiento y la concentración

E_{ijkl} = error debido a el muestreo (lecturas efectuadas para determinar los parámetros evaluados)

2.2. Screening *in vivo* de los hongos endofíticos élite para evaluar la actividad antagonística hacia *Radopholus similis* en plántulas de banano, Gran enano

Esta evaluación se efectuó para determinar la reducción de *R. similis* en plántulas protegidas con hongos endofíticos, y la influencia que éstos tienen en la promoción de crecimiento.

A partir de los resultados de las pruebas *in vitro* efectuadas, se seleccionaron los hongos presentados en el Cuadro 6.

2.2.1. Material experimental

Los hongos utilizados en esta evaluación fueron tomados como tratamientos. En total, se evaluaron 8 aislados seleccionados de las pruebas *in vitro* debido a su actividad nematicida (Cuadro 6). Asimismo, se evaluaron dos aislados, A5 y A12, del género *Trichoderma* y *Fusarium* respectivamente, provenientes de plantaciones bananeras ubicadas en el Valle de Motagua, Panchoy y Bobos, Izabal, Guatemala. Estos aislados fueron evaluados por Zum Felde (2002) y resultaron ser los mas efectivos en evaluaciones a nivel *in vivo* contra el nemátodo barrenador. Los dos aislados fueron tomados como referenciales del biocontrol (RB's).

Cuadro 6. Hongos endofíticos evaluados a nivel *in vivo*.

Aislado	Genero	Parcela origen	Tipo de plantación
P3	Fusarium	32-se (*)	B +F
P7	<i>Fusarium</i>	20-s (*)	B + C + F
P12	<i>Fusarium</i>	33-se (*)	B + F
P14	<i>Trichoderma</i>	33-se (*)	B + F
P16	<i>Fusarium</i>	I (*)	B + C + F
P17	<i>Fusarium</i>	20-s (*)	B + C + F
P21	<i>Trichoderma</i>	16	B + C
P24	<i>Trichoderma</i>	1	B + C

(*) Parcelas con mayor supresividad hacia *R. similis*

El material vegetativo que se utilizó consistió en plantas provenientes de cultivo de tejidos, 'Gran enano' de 12 cm de altura aproximadamente, provenientes de la empresa Cristal Vitro, San José, Costa Rica.

Los nemátodos utilizados para esta prueba fueron extraídos del sistema de reproducción basado en discos de zanahoria, trabajados durante el transcurso de esta investigación. Este proceso es descrito en la sección 2.1.3 de este documento.

2.2.2. Protección de vitroplantas con hongos endofíticos

La protección de las platas con hongos endofíticos fue realizada con aislados de comprobada actividad antagonista contra *R. similis*. El protocolo de protección consistió en la inmersión del sistema radical de las vitroplantas en una suspensión de esporas de los hongos endofíticos, efectuada antes de la siembra.

2.2.3. Preparación de la suspensión de esporas

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

2.2.4. Inoculación de vitroplantas con hongos endofíticos

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

2.2.5. Inoculación de del material vegetativo con *Radopholus similis*

Cuando los nemátodos fueron observados en colonias grandes en la superficie de platos Petri y el perímetro de los discos de zanahoria, éstos se removieron con agua destilada y fueron decantados en Erlenmeyers con la ayuda de una pipeta. La solución obtenida del lavado fue aforada a un volumen conocido y se procedió a determinar la concentración de nemátodos por ml. La solución fue ajustada a una suspensión de 500 nemátodos / 6 ml de agua en un Erlenmeyer de 2000 ml.

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

2.2.6. Recolección y manejo de las plantas para la medición de las variables de población de nemátodos, promoción de crecimiento y morfología de las raíces

Antes de evaluar las plantas, se midieron la altura (cm) y diámetro basal del sistema foliar, y el número de hojas. Las plantas fueron trasladadas al laboratorio de raíces del CATIE, dónde fueron removidas de las macetas. Se procedió a un lavado del sistema radical con un caudal de agua con poca presión para evitar el desprendimiento y pérdida de los pelos radicales. Posteriormente, las plantas se colocaron en papel toalla para remover el exceso de humedad. Las raíces fueron cuantificadas y separadas del sistema foliar mediante un bisturí, y se colocaron en recipientes plásticos debidamente rotulados. Posteriormente, el sistema foliar y las raíces se pesaron en una balanza analítica de 0,01 g de precisión. Las raíces fueron almacenadas en agua, de manera que el tejido se mantuviera turgente para una adecuada extracción de nemátodos.

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

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

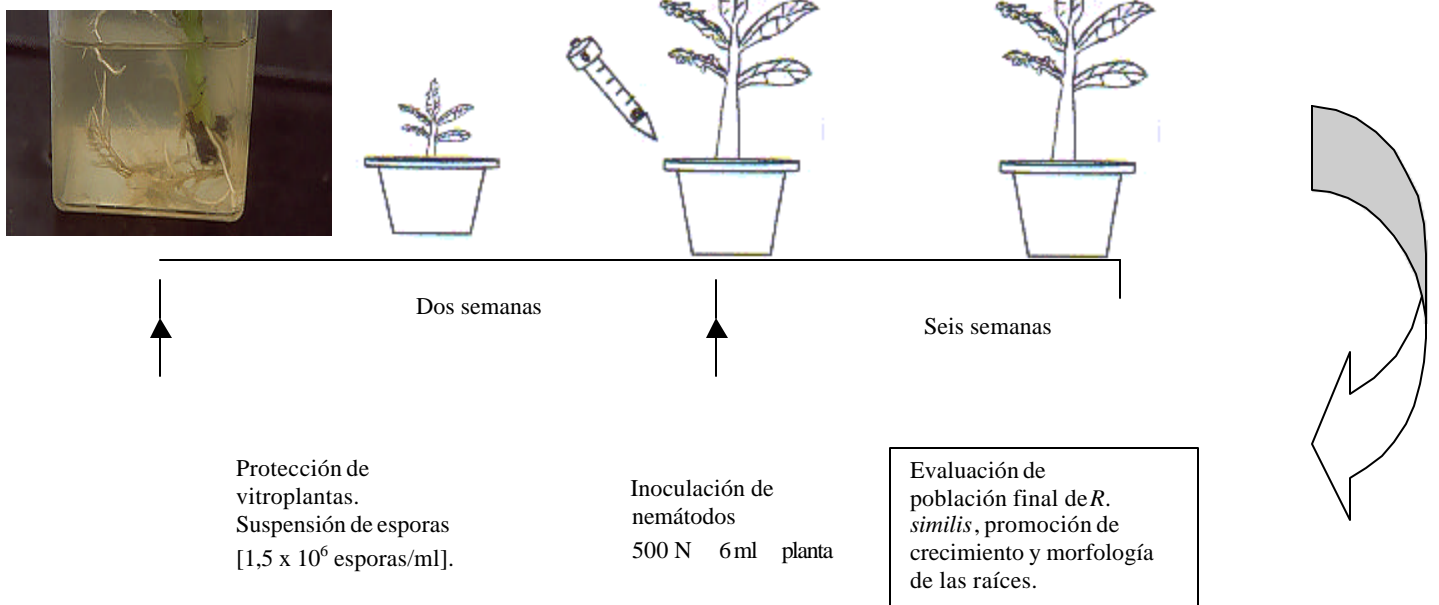


Figura 6. Protocolo utilizado en el bioensayo para determinar el control que los hongos endofíticos ejercen sobre *Radopholus similis*.

2.2.7. Plan experimental para la evaluación *in vivo*

La evaluación *in vivo* consistió en 12 tratamientos que incluyeron cinco aislados pertenecientes al género *Fusarium* (P3, P7, P12, P16 y P17), tres aislados pertenecientes al género *Trichoderma* (P14, P21 y P24), provenientes de fincas orgánicas y cuatro testigos. Los testigos consistieron en un control absoluto (TA), sin inoculación de esporas ni nemátodos; un control (T0), con inoculación de nemátodos; y dos referenciales de biocontrol (RB's), que consistieron en un *Fusarium* (A5) y un *Trichoderma* (A12), estudiados por Zum Felde (2002).

Se utilizó un Análisis de Varianza para un Diseño Completamente al Azar con 9 repeticiones. El modelo estadístico para este arreglo de tratamientos se define matemáticamente como sigue:

$$Y_{ij} = \mu + T_j + e_{ij}; \text{ donde,}$$

Y_{ij} = variable a medir

μ = media general

T_j = efecto de tratamiento (hongos endofíticos evaluados)

e_{ij} = error experimental.

Los parámetros de crecimiento evaluados fueron diámetro basal (cm), altura (cm) y peso del sistema foliar(g); número de hojas, número de raíces, peso de las raíces (g), longitud total de raíces (m), área superficial de raíces (cm²), diámetro promedio de las raíces (mm) y el índice longitud total/volumen (cm/m³).

2.3. Análisis estadístico

La evaluación de las variables de respuesta que fueron sometidas a análisis de varianza se analizaron mediante el programa estadístico PROC ANOVA, SAS para Windows. Los conteos de los nemátodos fueron transformados antes de realizar el análisis estadístico, con el fin de lograr una distribución normal de los datos. En las evaluaciones *in vitro*, los valores correspondientes a población de nemátodos se transformaron con $\sqrt{x+0,5}$, y en la evaluación *in vivo* con $\lg(x+0,1)$. Para los casos en que hubo diferencia significativa, se efectuó discriminación entre tratamientos mediante la prueba de rangos múltiples de **DUNCAN** ($p \leq 0,05$). El cuadro 7 presenta los parámetros medidos en la evaluación de biocontrol a nivel *in vitro* e *in vivo*.

Cuadro 7. Variables de respuesta que corresponden a las evaluaciones efectuadas, a nivel *in vitro* e *in vivo*, para determinar el biocontrol de los hongos endofíticos contra *Radopholus similis*.

Evaluación <i>In vitro</i>		Evaluación <i>In vivo</i>	
Prueba de parasitismo	Prueba de antibiosis	Actividad antagonista de los hongos endofíticos contra <i>R. similis</i>	Promoción de crecimiento y morfología de las raíces
Nemátodos vivos	Nemátodos vivos	*Nemátodos totales	*Peso del sistema foliar (g)
Nemátodos inmóviles	*Nemátodos muertos	*Nemátodos por gramo de raíz	*Número de hojas
*Nemátodos muertos		*% de reducción de nemátodos	*Altura del sistema foliar (cm)
			*Diámetro basal del sistema foliar (cm)
			*Peso fresco de raíces (g)
			*Número de raíces por planta
			*Diámetro de raíces (mm)
			*Volumen radical
			*Área superficial de las raíces (cm ²)
			*Longitud radical /volumen (LT/V) (cm/m ³)

* Variables de respuesta sometidas a análisis de varianza

3. Resultados

Este estudio se llevó a cabo en dos fases: (1) Screening *in vitro* para determinar el potencial antagonístico de los hongos endofíticos contra *R. similis*, y (2) Evaluación de la actividad de biocontroladora de los hongos endofíticos contra *R. similis*.

Para una mejor descripción de la primera fase, los resultados se agruparon en: Prueba de parasitismo y Prueba de antibiosis; mientras que en la segunda fase se consideró el efecto de biocontrol de los hongos endofíticos contra *R. similis*, seguido por el estudio de la promoción de crecimiento y cambios en la morfología de las raíces de las plantas.

3.1. Screening *In vitro* para determinar el potencial antagonista de los hongos endofíticos hacia *Radopholus similis*

3.1.1. Prueba de parasitismo

Los resultados de la prueba de parasitismo reflejan que todos los aislados evaluados desempeñaron una actividad parasítica contra *R. similis*. El porcentaje de nemátodos vivos en todos los tratamientos fue dentro de un rango de 0 a 48%, menor al reflejado en el testigo (72%). A las 8 horas después de el primer contacto, se pudo observar adhesión de esporas en el cuerpo del nemátodo (Figura 7A) que posteriormente germinaron y se presentó un efecto de envolvimiento del nemátodo por una masa de hifas (Figura 7B), y en el caso de algunos hongos del género *Fusarium*, se evidenció una digestión del nemátodo (Foto 7C). En el caso de *Trichoderma*, la acción parasítica que se observó fue únicamente mecánica, ya que los nemátodos se encontraban íntegros aún, mostrándose inmóviles por envolvimiento de las hifas. Caso diferente sucedió con *Fusarium*, donde se pudo observar que muchos aislados tuvieron algún tipo de mecanismo de antibiosis o producción de sustancias metabólicas que digerían el tejido del nemátodo (Cuadro 8). Se encontró diferencia altamente significativa entre los tratamientos ($p \leq 0,001$), para las variables de respuesta: nemátodos vivos, muertos e inmóviles. Los tratamientos P3, P7, P16, P17 y P19 pertenecientes al género *Fusarium*, y P14, P21 y P24, pertenecientes al género *Trichoderma*, presentaron mortalidades mayores al 80%. La tabla 9 presenta la discriminación de medias entre tratamientos.

3.1.2. Prueba de antibiosis

En la prueba de antibiosis se determinó que existe diferencia significativa entre tratamientos para las variables nemátodos vivos ($p \leq 0,001$) y muertos ($p \leq 0,001$). Se determinó interacción entre Tratamiento – Concentración ($p \leq 0,001$) y Tratamiento – Tiempo ($p \leq 0,001$), más no se encontró entre Concentración – Tiempo. Debido a esta múltiple interacción, los tratamientos se agruparon en frecuencias dentro de intervalos clasificados según su efecto nematicida: > 90 , $70-90$, $50-69$ y < 50 , a las 24 horas después del primer contacto (Cuadro 10).

Se efectuó un análisis de varianza para los distintos tratamientos a una concentración del 100% y en el tiempo 24, donde se encontró diferencia altamente significativa. La discriminación entre medias se presenta en el Cuadro 11. Bajo el efecto del extracto metabólico al 100%, los tratamientos P14, P21, P23 y P24, del género *Trichoderma*, y los tratamientos P16 y P17 pertenecientes al género *Fusarium*, reflejaron tener los valores más altos de actividad nematicida o nematostática (Cuadros 10 y 11).

Se presentó un porcentaje leve de mortalidad en los nemátodos inmersos en agua pura (TA) y CD (T0), pero, aún así, los extractos metabólicos demuestran tener efecto nematicida al encontrar que, en promedio, todos los tratamientos presentaron mayor número de nemátodos muertos. En la figura 8 se muestra la mortalidad de los nemátodos en función del tiempo (horas transcurridas después del primer contacto), sin tomar en cuenta el efecto de la concentración. La figura 9 señala que la actividad nematicida o nematostática de los extractos metabólicos está en función de las distintas concentraciones evaluadas, siendo la solución al 100% la que más efecto de inmovilización presentó. La figura 10 representa el efecto nematicida que los tratamientos tuvieron al momento de inmersión de los nemátodos y a las 24 horas siguientes, bajo el efecto de extractos metabólicos al 100%. La figura refleja que el efecto de mortalidad encontrado desde el momento de inmersión fue inmediato, encontrándose mortalidades mayores que el 50%. La diferencia significativa encontrada entre tratamientos, bajo el efecto de los extractos metabólicos al 100% se presenta en el cuadro 11. Aunque los tratamientos P7, P12 y P19, pertenecientes al género *Fusarium*, presentaron una digestión de los nemátodos en la prueba de parasitismo, en ésta prueba presentaron los valores más bajos de nemátodos muertos.

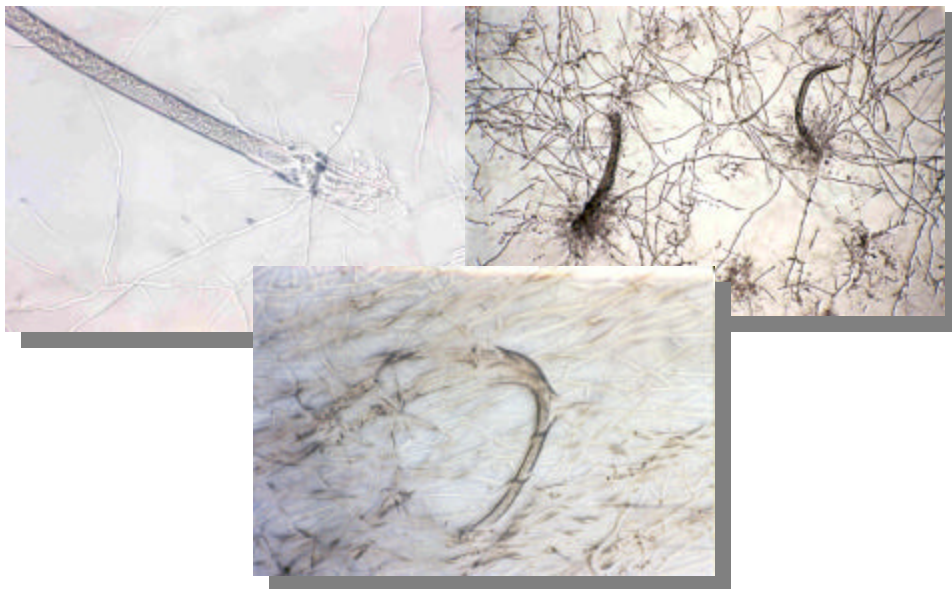


Figura 7. Efecto de la actividad parasítica y de antibiosis de los hongos endofíticos sobre *Radopholus similis*. (A): Adhesión de esporas en el cuerpo del nemátodo (Objetivo 40x); (B): Acción parasítica del hongo endofítico mediante acción de tipo mecánico (Objetivo 10x); (C): Acción de antibiosis. Digestión del cuerpo del nemátodo mediante sustancias metabólicas producidas por el hongo endofítico (Objetivo 20x).

Cuadro 8. Mecanismo de acción observado y efecto de la acción parasítica de los hongos endofíticos sobre la inmovilidad y la mortalidad de *Radopholus similis* 24 horas después del cocultivo.

Código	Genero	Recuperados %	Vivos %	Inmóviles %	Muertos %	Mecanismo de acción observado
T0	-	83	72	6	23	-
P10	Fusarium	46	48	23	29	Mecánico
P8	<i>Fusarium</i>	35	15	21	63	Mecánico
P1	<i>Fusarium</i>	22	16	11	74	Antibiosis
P18	<i>Fusarium</i>	36	14	11	75	Mecánico
P11	<i>Fusarium</i>	26	7	16	77	Mecánico
P23	<i>Trichoderma</i>	74	7	11	82	Mecánico
P15	<i>Fusarium</i>	45	5	15	80	Mecánico
P2	<i>Fusarium</i>	7	5	41	54	Antibiosis
P25	<i>Trichoderma</i>	57	4	23	73	Mecánico
P12	<i>Fusarium</i>	30	3	61	36	Antibiosis
P7	<i>Fusarium</i>	12	1	14	84	Antibiosis
P17	<i>Fusarium</i>	28	1	0	99	Antibiosis
P5	<i>Fusarium</i>	22	0	71	29	Mecánico
P6	<i>Fusarium</i>	44	0	69	31	Antibiosis
P16	<i>Fusarium</i>	83	0	0	100	Antibiosis
P19	<i>Fusarium</i>	20	0	4	96	Antibiosis
P14	<i>Trichoderma</i>	72	0	1	99	Mecánico
P24	<i>Trichoderma</i>	46	0	1	99	Antibiosis
P3	<i>Fusarium</i>	18	0	0	100	Mecánico
P21	<i>Trichoderma</i>	82	0	0	100	Mecánico

Los valores en cada columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente ($p \leq 0,05$) de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Cuadro 9. Efecto de la acción parasítica de los hongos endofíticos sobre la mortalidad de *Radopholus similis* 24 horas después del cocultivo.

Código	Parcela de		% Nemátodos muertos
	origen	Género	
P3	32-se	Fusarium	100 a
P16	I	<i>Fusarium</i>	100 a
P21	16	<i>Trichoderma</i>	99 ab
P24	1	<i>Trichoderma</i>	99 ab
P17	20-s	<i>Trichoderma</i>	98 ab
P14	33-se	<i>Fusarium</i>	98 ab
P19	34-am	<i>Trichoderma</i>	96 ab
P7	20-s	<i>Fusarium</i>	84 abc
P23	33-se	<i>Fusarium</i>	82 abc
P2	39-shi	<i>Trichoderma</i>	82 abc
P15	40-shi	<i>Fusarium</i>	79 abc
P11	20-s	<i>Fusarium</i>	77 abc
P18	b2	<i>Fusarium</i>	75 abc
P1	32-se	<i>Fusarium</i>	74 bc
P25	51-fil	<i>Fusarium</i>	72 bc
P8	37-bc	<i>Trichoderma</i>	63 c
P12	33-se	<i>Fusarium</i>	61 c
P6	33-se	<i>Fusarium</i>	31 d
P5	20-s	<i>Fusarium</i>	29 d
P10	39-shi	<i>Fusarium</i>	28 d
T0	-	-	23 d

Los valores en cada columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente ($p \leq 0,05$) de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Duncan. Valores transformados con $\sqrt{x+0,5}$

Cuadro 10. Efecto de la concentración de los extractos crudos de los hongos endofíticos sobre la mortalidad de *Radopholus similis* 24 horas después del cocultivo.

Aislado	Género	Concentración (%)			
		25	50	75	100
T0	-	4	4	4	3
TA	-	4	4	4	4
P1	Fusarium	4	4	4	4
P2	<i>Fusarium</i>	4	4	4	3
P7	<i>Fusarium</i>	4	3	2	2
P3	<i>Fusarium</i>	2	2	2	2
P5	<i>Fusarium</i>	3	3	3	2
P10	<i>Fusarium</i>	3	4	4	4
P11	<i>Fusarium</i>	4	1	1	1
P12	<i>Fusarium</i>	4	4	4	2
P16	<i>Fusarium</i>	1	1	1	1
P17	<i>Fusarium</i>	2	2	1	1
P19	<i>Fusarium</i>	3	2	3	2
P14	<i>Trichoderma</i>	1	1	1	1
P21	<i>Trichoderma</i>	2	2	2	1
P22	<i>Trichoderma</i>	1	1	1	1
P23	<i>Trichoderma</i>	1	1	1	1
P24	<i>Trichoderma</i>	3	3	3	3
P25	<i>Trichoderma</i>	2	1	1	1

Simbología: (*)=24 horas después de la inmersión de nematicida. Los números presentan los niveles de mortalidad: 1 = >90, 2 = 70-89, 3 = 50-59 y 4 = < 50

Cuadro 11. Efecto de los extractos crudos al 100% sobre la mortalidad de *Radopholus similis*, 24 horas después del cocultivo.

Código	Parcela de origen	Género	Nemátodos Muertos
	33-se	Trichoderma	
P14		ma	100 a
P21	16	<i>Trichoderma</i>	100 a
P23	33-se	<i>Trichoderma</i>	100 a
P24	1	<i>Trichoderma</i>	100 a
P16	I	<i>Fusarium</i>	100 a
P17	20-s	<i>Fusarium</i>	100 a
P11	33-se	<i>Fusarium</i>	96 ab
P5	20-s	<i>Fusarium</i>	89 ab
P3	32-se	<i>Fusarium</i>	88 abc
P12	33-se	<i>Fusarium</i>	85 bc
P19	34-am	<i>Fusarium</i>	82 bc
P7	20-s	<i>Fusarium</i>	79 bc
P25	51-fil	<i>Trichoderma</i>	78 bcd
T0	-	-	67 de
P2	39-shi	<i>Fusarium</i>	65 de

Los valores en cada columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente ($p \leq 0,05$) de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Duncan. Valores transformados con $\sqrt{x+0,5}$.

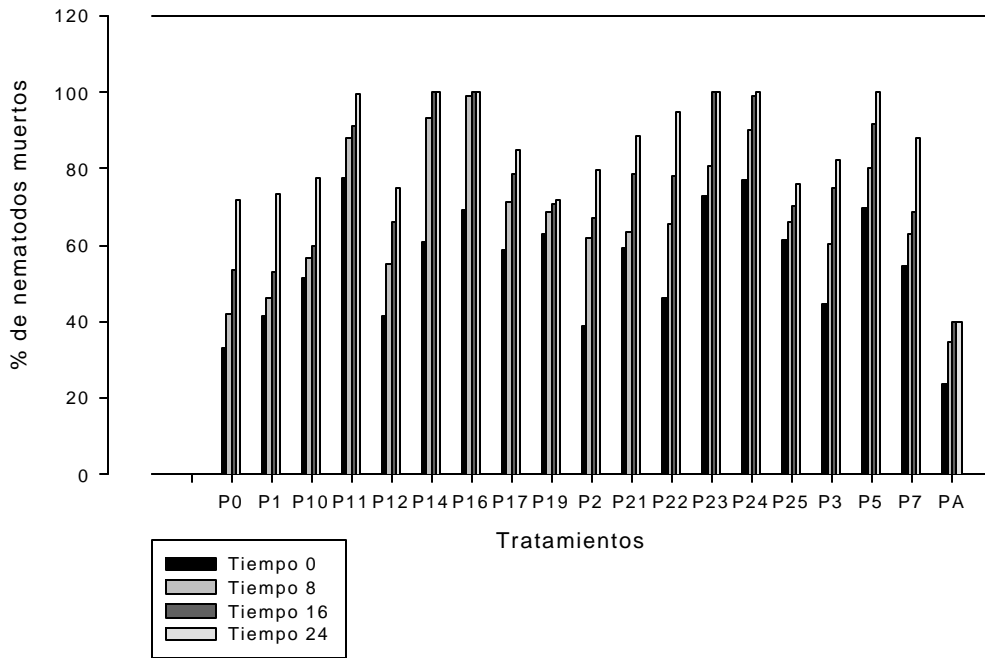


Figura 8. Efecto del tiempo de exposición (horas) de los extractos crudos sobre la mortalidad de *Radopholus similis*.

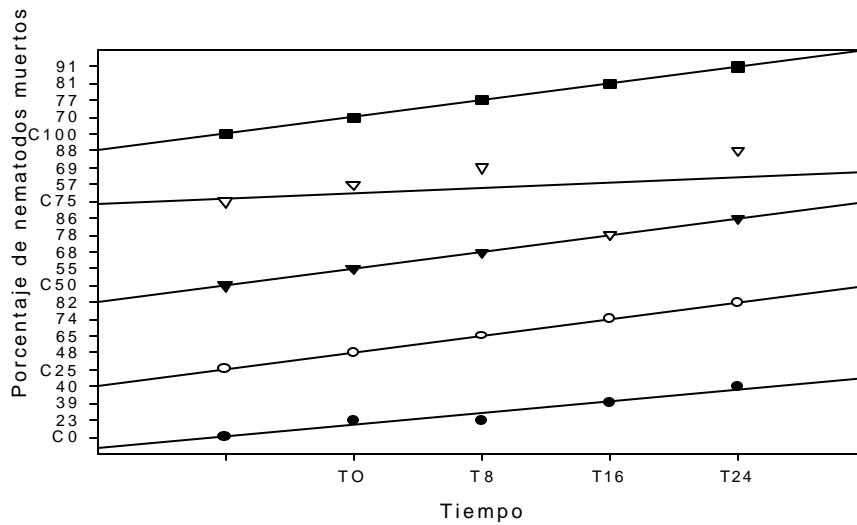


Figura 9. Tendencia de la media en la actividad nematocida de los extractos crudos bajo distintas concentraciones en función del tiempo.

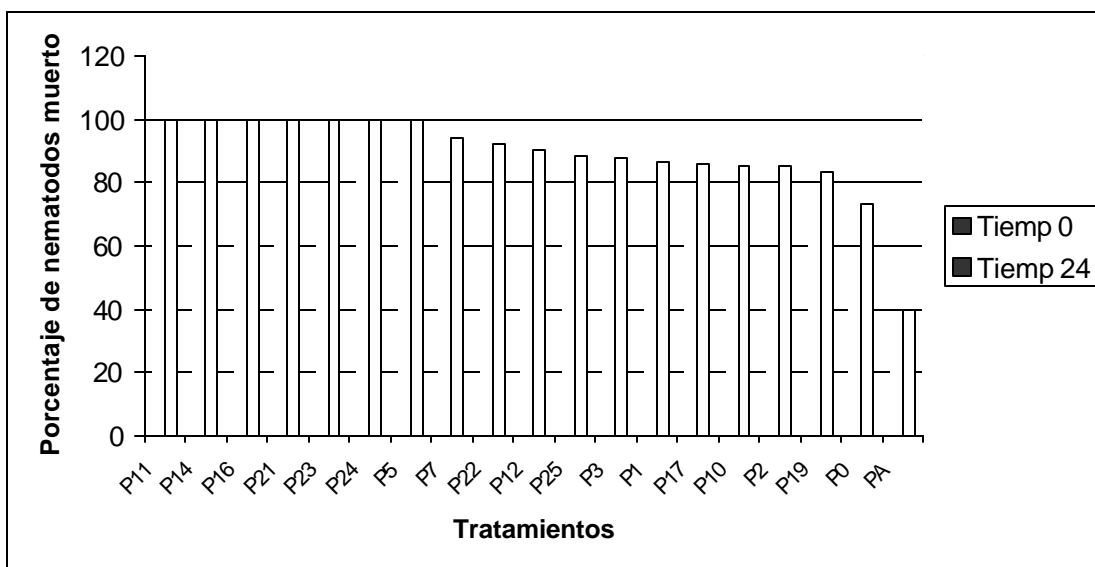


Figura 10. Efecto de la exposición del extracto crudo sobre la mortalidad de *Radopholus similis* al momento del cocultivo (Tiemp 0) y 24 horas (Tiemp 24) después de la exposición.

Simbología: C0 = Testigo absoluto, H2O; C25, 50 y 100 = solución al 25, 50 y 100%; T= tiempo, al momento del primer contacto, y a las 8, 16 y 24 horas.

La figura 11 demuestra el nivel de control que los tratamientos ejercieron en las pruebas *in vitro*. Las flechas señalizan los tratamientos que ejercieron mayor actividad de mortalidad en *R. similis* en cuanto parasitismo y antibiosis, los cuales fueron escogidos para ser evaluados a nivel *in vivo*.

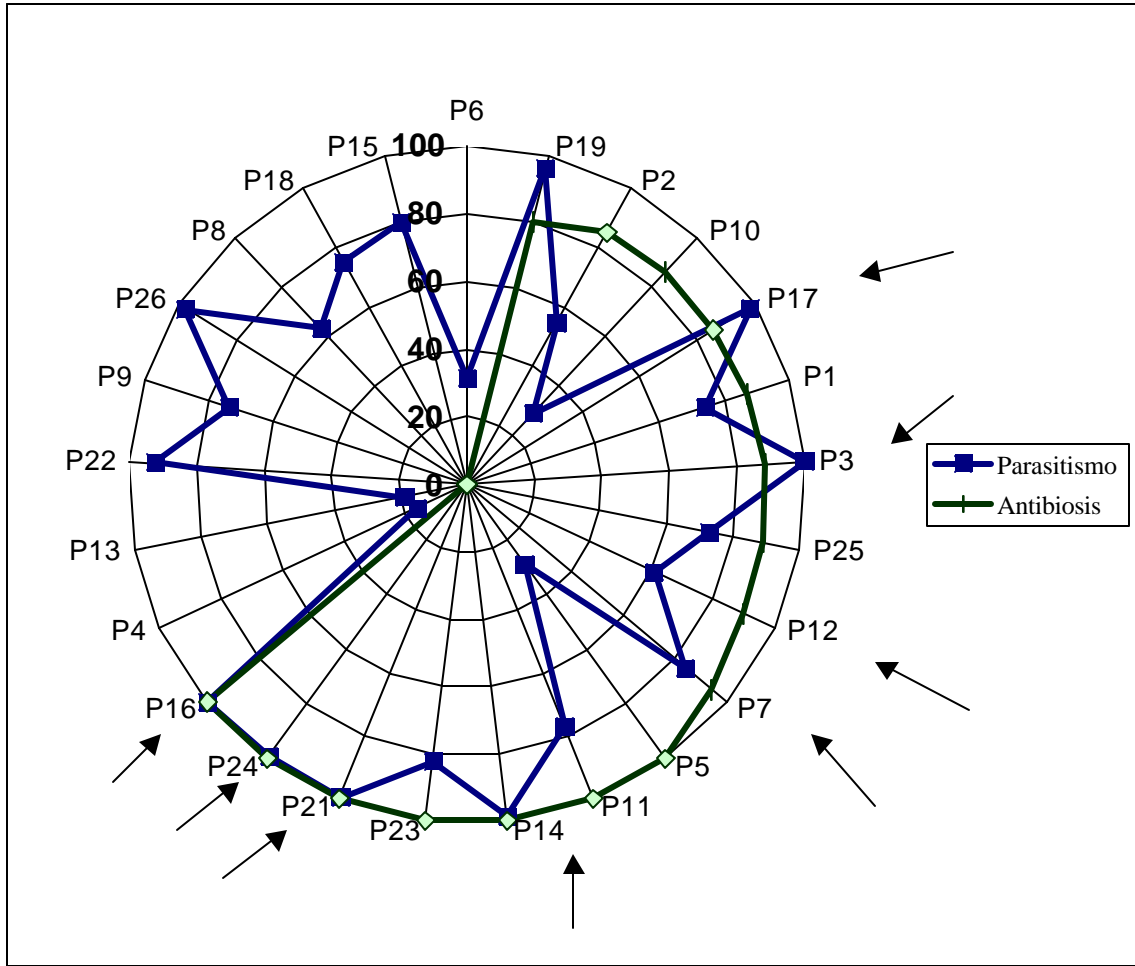


Figura 11. Diagrama representativo del mecanismo de biocontrol de los hongos endofíticos contra *Radopholus similis* a nivel *in vitro*. *La escala representa el porcentaje de nemátodos muertos.

3.2. Evaluación de la actividad de biocontrol contra *Radopholus similis* y promoción de crecimiento de los aislados endofíticos a nivel *in vivo*

3.2.1. Efecto de los aislados endofíticos en la actividad biocontroladora contra *Radopholus similis* en vitroplantas Gran enano

Todas las plantas protegidas con hongos endofíticos presentaron reducción en la población final de *Radopholus similis* dentro del sistema radical de las plantas, presentándose diferencia significativa ($p \leq 0,001$) entre tratamientos. El porcentaje de reducción de la población en plantas protegidas fue de 17% al 72% comparado al testigo. Este efecto se marcó aún más en la densidad poblacional (nemátodos/gramo de raíz), donde la reducción poblacional de nemátodos en plantas protegidas fue de 47% a 84% comparado al testigo (Cuadro 12). Se efectuó un conteo entre los distintos estadios del nemátodo para verificar si el tratamiento evaluado tenía poder nematicida en las larvas. Se encontró diferencia significativa entre los individuos contados en la etapa juvenil 1 y 2 (J1 y J2) ($p \leq 0,001$), juvenil 3 y 4 (J3-J4) ($p \leq 0,001$) y adultos ($p = 0,025$). El cuadro 12 resume los valores de población de nemátodos en sus diferentes estadios, así como el porcentaje de reducción de la población total de nemátodos. Los tratamientos P3, P12, A5, P7 y P16, del género *Fusarium*, mostraron una clara reducción significativa en los estadios larval y juvenil. Esto sugiere que por medio de algún mecanismo, éstos tratamientos tienen un efecto en la reproducción de los nemátodos cuando ya han colonizado los tejidos de la planta. De todos los tratamientos, los aislados P3 y P12 reflejaron tener el mejor control sobre la población en su fase larval (J2-J1). En general, se observa que todos los aislados ejercieron algún tipo de mecanismo para reducir la población de los nemátodos dentro de las raíces.

El cuadro 13 indica la tasa de reproducción (IR) de *R. similis*, es decir, el número de veces que *R. similis* se reprodujo respecto a los nemátodos inoculados inicialmente (500 nemátodos). En las plantas no protegidas con hongos endofíticos, la población de nemátodos se incrementó 6,5 veces, mientras que en plantas protegidas, la población se incrementó en promedio, 3,88 veces respecto a la población inicial. Las plantas inoculadas con el tratamiento P3, presentaron una población final 1,87 veces mayor a la inicial.

3.2.2. Promoción de crecimiento y cambios en la morfología de las raíces de las plantas

A las ocho semanas después de proteger a las plantas con hongos endofíticos, se encontraron diferencias altamente significativas en las variables de promoción de crecimiento. Los parámetros medidos mostraron diferencias en la altura ($p \leq 0,001$), diámetro basal ($p \leq 0,001$) y peso del sistema foliar ($p \leq 0,001$); número de hojas ($p \leq 0,001$); y el número ($p \leq 0,001$) y peso de raíces ($p \leq 0,001$). El

cuadro 14 presenta los valores de las variables medidas, donde los resultados reflejan que las plantas protegidas demostraron mejor crecimiento que el testigo absoluto, a excepción de las plantas protegidas por el tratamiento 12. En dicho tratamiento se encontró correlación directa entre peso de la planta ($p=0,004$, $r=0,0562$), peso de raíces ($p\leq 0,001$, $r=0,960$), versus la población de nemátodos final. En el resto de tratamientos, el número total de nemátodos se correlacionó de forma indirecta y significativamente con el peso del sistema foliar ($p=0,05$, $r= -0,201$) y el número ($p\leq 0,001$, $r=-0,338$) y el peso de las raíces ($p=0,015$, $r= -0,249$) es decir que las plantas protegidas presentaron mayor crecimiento y menor número de nemátodos finales.

El tratamiento P3 fue el que presentó valores más altos en las variables de promoción de crecimiento, así como el valor más alto en porcentaje de reducción en la población final de *R. similis* (71%) y menor densidad de nemátodos (84% respecto al testigo).

Para verificar el efecto que los hongos endofíticos tienen sobre el desarrollo y morfología de las raíces, las variables Longitud Total (m), Área Superficial (cm²), Diámetro Promedio (mm) y el índice LT/V (longitud total/volumen; cm/m³), se midieron mediante el software de Win-Rhizo®, no encontrándose diferencias significativas para estos parámetros debido a la alta variabilidad encontrada entre los valores medidos (Cuadro15). Estadísticamente se encontraron los siguientes valores: Longitud Total ($p=0,66$, CV=104,13), Área Superficial ($p=0,46$, CV= 149,37), Diámetro Promedio ($p=0,654$, CV= 148,08) y LT/V ($p=0,75$, CV= 102,44). A pesar que no se encontró diferencia significativa, los valores presentados en el cuadro 15 indican que los TB's, A5 y A12, tuvieron un valor de longitud radical promedio 266 y 192% mayor que el valor reflejado en el testigo absoluto. El incremento en la longitud radical de las plantas protegidas se presentó en todos los tratamientos, hecho que indica que los hongos endofíticos tienen un efecto en el incremento del desarrollo radical de las plantas. En cuanto al diámetro promedio de las raíces, el valor encontrado para el testigo fue significativamente mayor que el resto de tratamientos ($p=0.00026$).

Cuadro 12. Tabla de composición de la población y estados de crecimiento de *Radopholus similis*.

Tratamiento	Género	Nemátodos totales				Peso de raíces (g)	Nemátodos/g de raíz
		J2-J1	J3-J4	Ad	Totales		
TO	-	750 a	1500 a	1000 a	3250 a	16,05	202 a
P14	Trichoderma	722 a	1372 ab	595 b	2689 ab (-17%)	25,09	107 b (-47%)
P17	<i>Fusarium</i>	744 a	1022 bc	594 b	2361 bc (-27%)	25,24	94 bc (-53%)
A12	<i>Trichoderma</i>	733 a	1044 bc	544 b	2322 bc (-28%)	24,87	93 bc (-54%)

P24	<i>Trichoderma</i>	733 a	1028 bc	556 b	2317 bc (-29%)	29,19	79 bcd (-61%)
P21	<i>Trichoderma</i>	731 a	981 c	400 b	2131 bcd (-35%)	29,45	72 bcd (-64%)
P16	<i>Fusarium</i>	394 bc	933 c	383 b	1711 cde (-47%)	2,9	57 cde (-71%)
P7	<i>Fusarium</i>	461 b	772 cd	322 b	1556 def (-52%)	28,82	54 cde (-73%)
A5	<i>Fusarium</i>	239 bcd	500 de	433 b	1172 ef (-64%)	22,94	51 cde (-75%)
P12	<i>Fusarium</i>	56 d	350 e	513 b	919 f (-72%)	18,76	49 ed (-76%)
P3	<i>Fusarium</i>	206 cd	394 e	339 b	939 f (-71%)	29,38	32 e (-84%)

Los valores en cada columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente ($p \leq 0,05$) de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Duncan.

* Los valores en porcentaje se refieren a la reducción de *R. similis* (totales/g) en relación a los nemátodos cuantificados en el testigo.

(1) Valores transformados con $\log(\text{valor original} + 0,1)$.

Cuadro 13. Tasa de reproducción de *Radopholus similis*.

Tratamiento	Género	Nemátodos totales	IR
T0	-	3250	6,5
P14	<i>Trichoderma</i>	2689	5,37
P24	<i>Trichoderma</i>	2361	4,72
P21	<i>Trichoderma</i>	2322	4,64
P17	<i>Fusarium</i>	2317	4,63
A12	<i>Trichoderma</i>	2131	4,26
P16	Fusarium	1711	3,42
P7	<i>Fusarium</i>	1556	3,11
A5	<i>Fusarium</i>	1172	2,34
P3	<i>Fusarium</i>	939	1,87
P12	<i>Fusarium</i>	919	1,84

IR = Relación Nemátodos inoculados (iniciales) respecto a los nemátodos totales (nemátodos extraídos 45 días después de la inoculación de 500 nemátodos por planta). n=9. 2 lecturas por repetición.

Cuadro 14. Efecto de los hongos endofíticos sobre la promoción de crecimiento en plantas del cultivar Gran enano, ocho semanas después de la protección.

Tratamiento	Genero	Sistema radical		Sistema foliar			
		Número promedio	Peso (g)	Altura (cm)	Diámetro basal (cm)	Número hojas	Peso (g)
TO	-	14,88 fg	16,05 d	8,35 bcd	1,16 d	7,00 bcd	24,34 d
TA	-	14,44 g	19,39 cd	8,98 abc	1,26 abcd	7,55 ab	31,34 c
P14	<i>Trichoderma</i>	16,88 def	25,09 ab	8,69 abcd	1,30 ab	7,00 bcd	31,83 c
P17	<i>Fusarium</i>	16,89 def	25,24 ab	7,03 e	1,26 abcd	7,11 bcd	31,52 c
A12	<i>Trichoderma</i>	20,13 b	24,87 ab	8,20 bcd	1,29 abc	7,37 abc	34,99 bc
P24	<i>Trichoderma</i>	18,44 bcd	29,19 a	9,16 abc	1,33 ab	6,88 cd	33,96 bc
P21	<i>Trichoderma</i>	19,44 bc	29,45 a	8,26 bcd	1,32 ab	7,33 abc	36,68 b
P16	<i>Fusarium</i>	17,66 cde	29,90 a	9,33 ab	1,37 a	7,22 bcd	32,94 bc
P7	<i>Fusarium</i>	18,66 bcd	28,82 a	9,14 abc	1,36 a	7,55 ab	34,15 bc
A5	<i>Fusarium</i>	17,78 cde	22,94 bc	7,74 de	1,24 bcd	7,22 bcd	31,09 c
P12	<i>Fusarium</i>	16,00 efg	18,76 cd	7,71 de	1,18 cd	6,66 d	26,34 d
P3	<i>Fusarium</i>	24,33 a	29,39 a	9,52 a	1,37 a	7,88 a	42,88 a

Los valores en cada columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente ($p \leq 0,05$) de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Duncan.

Cuadro 15. Efecto de los hongos endofíticos en la morfología de raíces analizadas mediante el software WinRhizo®.

Tratamiento	Longitud total (cm)	Área superficial (cm ²)	Diámetro promedio (mm) ²	Longitud total/volumen (cm/m ³)
T0	234,90±140,74	33,04±8,13	5.23 a	226,01±67,85
TA	239,86±110,16	28,85±15,75	3.74 b	264,62±125,20
P3	315,38±179,62	35,84±19,87	3.65 b	344,92±211,71
P7	258,85±143,51	27,39±15,05	3.40 b	298,49±166,99
P12	236,00±69,67	26,72±7,89	3.61 b	257,14±79,08
P14	435,33±542,06	26,63±9,23	3.18 b	285,39±108,18
P16	444,98±288,34	39,12±12,54	3.26 b	370,58±134,80
P17	494,62±581,47	77,18±117,64	4.10 b	519,59±658,81
P21	414,40±246,01	51,03±26,70	3.62 b	381,19±289,99
P24	404,24±528,24	63,97±110,30	4.13 b	428,57±575,68
A5	626,83±631,73	104,13±136,21	4.04 b	598,91±659,72
A12	451,73±422,72	68,93±106,21	4.04 b	421,74±459,59

No. de observaciones = 9. (²) = Los valores en cada columna seguidos por la misma letra no difieren significativamente ($p \leq 0,05$) de acuerdo a la prueba de rangos múltiples de Duncan.

4. Discusión

4.1. Evaluaciones de parasitismo y antibiosis

En la presente investigación, se estudió las poblaciones de aislados endofíticos encontrados en sistemas de banano y plátano orgánicos y convencionales. Además, se determinó el potencial antagonista de los aislados endofíticos sobre *R. similis* en condiciones *in vitro*, así como el efecto de los aislados sobre la reproducción del nemátodo barrenador en el sistema radical de vitroplantas de banano.

La presencia de hongos endofíticos en tejidos internos de la raíz de banano y plátano ha sido ampliamente documentado por varios autores (Amin1994; Schuster *et al.* 1995; Pocasangre *et al.* 2000). Asimismo, la actividad biocontroladora de estos hongos endofíticos sobre *R. similis* ha sido comprobada en repetidas ocasiones en experimentos llevados a cabo bajo condiciones controladas en diferentes cultivares (Pocasangre *et al.* 2000).

La mayoría de los aislados evaluados en la prueba de parasitismo presentaron una actividad biocontroladora contra *R. similis* con mortalidades mayores al 70%. Los tratamientos pertenecientes a *Fusarium*, efectuaron un parasitismo mediante mecanismos de acción de recubrimiento e inmovilización del cuerpo del nemátodo por el crecimiento del micelio, y digestión del cuerpo del nemátodo. Esto sugiere que las hifas de *Fusarium* producen sustancias que ayudan a digerir al nemátodo. Por otra parte, aislados pertenecientes al género *Trichoderma*, presentaron un envolvimiento miceliar agresivo, más no se observó digestión de la parte externa del nemátodo. Datos similares fueron encontrados por Zum Felde (2002), quién trabajando con aislados de *Fusarium* y *Trichoderma*, encontró porcentajes de inmovilización y muerte de *R. similis* mayores al 90%.

En la prueba de antibiosis, el efecto nematicida de los extractos metabólicos de los aislados endofíticos estuvo directamente relacionado con la concentración de los extractos, 25, 50, 75 y 100%. Resultados similares fueron encontrados por Zum Felde (2002), quien encontró que la concentración de los filtrados metabólicos tienen distinto efecto la mortalidad de nemátodos, resultando con mayor poder nematicida las solución con una concentración al 100%.

Los extractos metabólicos puros de los aislados P14, P21, P23 y P24, pertenecientes al género *Trichoderma*, tuvieron un efecto nematicida del 100%. Se ha reportado que *Trichoderma* produce diversos metabolitos tales como Trichodermin, Suzukacilina, Alameticina, Dermadina, Penicilina, Trichotecenosa y Tricorzinianos que se han reportado como sintetizados por *Trichoderma harzianum*; o Gliotoxina producido por *Trichoderma viridae* (Hidalgo 1999). Estos resultados indican que dichos aislados pueden ser objeto de estudios para compuestos químicos de acción nematicida por la reacción observada en los nemátodos como respuesta a los efectos nematicidas de los filtrados metabólicos.

En el caso de *Fusarium*, la mayoría de extractos metabólicos presentaron un efecto nematicida mayor al 70%. Diversos estudios han demostrado que los filtrados metabólicos de *Fusarium* tienen un efecto de inmovilidad hacia los nemátodos. Por ejemplo, Amin (1994) encontró que algunos aislados del género *Fusarium* producen compuestos nematicidas y nematostáticos. Schuster *et al.* (1995) encontró que la mayoría de extractos metabólicos, provenientes de aislados pertenecientes a cepas no patogénicas de *Fusarium oxysporum*, presentaron un efecto de inmovilización en *R. similis*. Otros estudios han demostrado que filtrados metabólicos de *Fusarium oxysporum* han tenido efectos de inmovilización en *R. similis* y *Meloidogyne* spp. bajo condiciones *in vitro* (Hallmann y Sikora 1996; Amin 1994).

También se determinó que el tiempo tiene influencia directa en la mortalidad de *R. similis*, ya que se encontró diferencia significativa entre los tiempos 0, 8, 16 y 24 horas después del primer contacto con los extractos metabólicos. El efecto nematicida de los extractos metabólicos observado en el tiempo cero fue casi inmediato, presentándose mortalidades mayores al 40% al momento de la inmersión. La mortalidad encontrada al inicio del cocultivo y a las 24 horas después aumentó considerablemente, ya que al final de la prueba se reportaron mortalidades mayores al 90%. Esta diferencia de mortalidades en función del tiempo, indica que para estudios de la actividad nematicida de extractos metabólicos, es importante utilizar el tiempo como un factor determinante en la mortalidad de los nemátodos. Soto (2003) encontró que después de las 24 horas de acción de los extractos metabólicos en contacto con *R. similis*, la actividad nematicida se estabiliza, es decir que después de las 24 horas, el valor de los nemátodos muertos ya no aumenta significativamente.

4.2. Efecto de los aislados endofíticos en la actividad biocontroladora contra *Radopholus similis*

Los resultados obtenidos en el bioensayo, donde se determinó la población final de *R. similis* en el sistema radical de vitroplantas de banano, demostraron que las plantas protegidas con hongos endofíticos presentaron una reducción significativa en la población final, respecto a la encontrada en plantas que estaban libres de inoculación. Diversos estudios han demostrado la misma acción antagonista de hongos endofíticos hacia la reproducción de nemátodos (Niere 2001; Pocasangre *et al.* 2000; Speijer y Sikora 1993). En este ensayo, se encontró un rango de 919 a 2689 nemátodos finales en las plantas protegidas con cepas de *Fusarium* y *Trichoderma*, que comparado a la población final de *R. similis* en el testigo (3250 nemátodos), representaron reducciones que van desde un 17% hasta 72%. Resultados similares fueron reportados por Soto (2003) y Zum Felde (2002), quienes evaluando la capacidad de reducción de *Fusarium* y *Trichoderma* contra *R. similis*, encontraron reducciones de hasta 84%.

Los aislados pertenecientes al género *Fusarium* presentaron las reducciones más altas, acentuándose aún más en las plantas protegidas con los aislados P3 y P12, con reducciones de 71 y 72% respectivamente. Similarmente, Pocasangre *et al.* (2000), encontraron que, hongos endofíticos pertenecientes a cepas no patogénicas de *Fusarium* causaron reducciones en la población final de *R. similis* en el sistema radical de plantas Gran enano, Williams y FHIA-23, superiores a 80%. Por otra parte, Niere (2001) encontró que plantas Valery protegidas con cepas de *Fusarium* presentaron reducciones hasta de 77%. Con el nivel de biocontrol que *Fusarium* ejerció sobre *R. similis* en este ensayo, se demuestra que *Fusarium* ejerce una buena colonización en los tejidos internos de las plantas. Observaciones hechas por Detert (1996), señalan que razas no patogénicas de *Fusarium*

oxysporum ejercieron una colonización agresiva en plantas inoculadas y, además, un mejor efecto de biocontrol en cuanto a reducción de poblaciones de *R. similis*, contrario a lo ocurrido en plantas que no habían sido protegidas.

Los tratamientos pertenecientes al género *Trichoderma* presentaron una reducción de 17 al 35%. Este género fue reportado por primera vez como un buen agente en la reducción de *R. similis* en vitroplantas de banano 'Gran enano' por Zum Felde (2002), quien reportó reducciones de hasta 74%; asimismo, Soto (2003) reportó reducciones de 80%. Estudios efectuados para el control de otras especies de nemátodos han reportado a *Trichoderma* como buen biocontrolador, como por ejemplo, Speijel y Chet (1998) reportan a *Trichoderma harzianum* como buen antagonista contra *Meloidogyne javanica*, reduciendo el índice de agallas en raíces y el número de huevos por gramo de raíces.

Los resultados de este estudio demuestran que el biocontrol efectuado por cepas provenientes de *Fusarium* fue mayor que las cepas provenientes de *Trichoderma*, denotándose aún más en los valores encontrados para densidad de nemátodos y tasa de reproducción. La densidad de *R. similis* determinada en los tratamientos pertenecientes a *Fusarium* fue de 53 a 84% menor a la determinada en el testigo, mientras que la densidad de las plantas protegidas con cepas de *Trichoderma* fue 47 a 64 % menor. Los datos reportados en la tasa de reproducción demuestran que las plantas protegidas con cepas de *Fusarium*, presentaron un IR dentro de un rango de 1,88 a 4,63, menor al rango presentado por las plantas protegidas con cepas de *Trichoderma*, IR entre 4,22 y 5,38.

El efecto que los tratamientos tuvieron sobre la composición poblacional de *R. similis* reflejan que todos los tratamientos tuvieron un efecto de reducción de *R. similis* en la fase de Adultos. Asimismo, se determinó que los tratamientos P3 y P12, del género *Fusarium*, presentaron una reducción significativamente mayor en la población del estadio juvenil y larval, en comparación al resto de tratamientos evaluados y el testigo. Esto indica que dichos aislados tuvieron un efecto larvicida, efecto que no se mostró tan pronunciado en el resto de tratamientos, aunque en general las cepas de *Fusarium* presentaron mayor poder larvicida que las cepas de *Trichoderma*.

4.3. Promoción de crecimiento y morfología de raíces

Los resultados encontrados en la presente investigación demuestran que las plantas protegidas con hongos endofíticos presentaron un incremento altamente significativo en diámetro basal (cm), altura (cm) y peso del sistema foliar (g); número de hojas, número de raíces y peso de las raíces (g). El peso de las raíces y el sistema foliar en plantas que fueron protegidas, tuvo un incremento promedio de 39% y 29% respectivamente, comparado al testigo absoluto; siendo los tratamientos P3, P7 y

P16, del género *Fusarium*, y, P21 y P24, del género *Trichoderma* los de mejor comportamiento. Zum Felde (2002), encontró que vitroplantas inoculadas con aislados del género *Fusarium* y *Trichoderma*, habían tenido un incremento en peso de raíces y del sistema foliar, de 35% y 19% comparado a plantas que no fueron inoculadas.

Los resultados encontrados en la morfología de las raíces reflejan que las plantas que estaban protegidas con hongos endofíticos presentaron un diámetro significativamente menor al de las plantas sin proteger. El ataque de nemátodos causa un aumento en el diámetro de raíces, por lo que la protección de plantas resultó en un diámetro menor de raíces, así como a un desarrollo mayor en la longitud de raíces y por lo tanto un área superficial mayor. El mayor desarrollo en la longitud de las raíces de las plantas que fueron protegidas se demostró con valores que casi duplicaron el valor encontrado en el testigo.

Tanto, la promoción de crecimiento, como el cambio en la morfología de raíces en plantas protegidas con hongos endofíticos, fue demostrado por Pocasangre (2000), quién encontró que el peso de las plantas y las raíces, así como el largo total de las raíces fue incrementado significativamente en plantas inoculadas con hongos endofíticos, en distintos cultivares de banano (Gran enano, Gros michel, Bluggoe y FHIA-23). Este hecho demostró que la presencia de los hongos en los tejidos internos de las plantas, pueden mejorar el crecimiento de las plantas, no importando el cultivar.

Asimismo, en otras especies vegetales, se ha demostrado el efecto de promoción de crecimiento que los hongos endofíticos ejercen sobre las plantas. Por ejemplo, Latch *et al.* (1985) señala que infecciones con hongos endofíticos han aumentado significativamente la acumulación de materia seca en raíces de **Ryegrass** (West *et al.* 1990). Malinowski y Belesky (2000) encontraron que los hongos endofíticos estaban relacionados con mecanismos que responden a alterar la morfología de las raíces, tales como la reducción en el diámetro de raíces y el aumento en la longitud de los pelos radicales en **tall fescue**.

El tratamiento P3 presentó valores significativamente más altos y distintos al resto de tratamientos en las variables que corresponden a promoción de crecimiento. Los valores encontrados para altura y diámetro basal y peso del sistema foliar, número de hojas y el número y peso de raíces, fueron respectivamente, 12,18; 5,83; 9,39; 23,95; 26,05 y 11,22 % mayores que los valores promedio del resto los tratamientos (8,36 cm; 1,29 cm; 7,14; 32,61 g; 17,99; 26,09 g).

5. Conclusiones

La mayoría de los hongos endofíticos evaluados en la prueba de parasitismo efectuaron un biocontrol contra *R. similis*. Los aislados pertenecientes al género *Trichoderma* presentaron mortalidades de 72 a 99%, mientras que *Fusarium* presentó mortalidades hasta del 100%.

El efecto de actividad nematicida de los extractos metabólicos contra *R. similis* estuvo directamente relacionado con el nivel de concentración y el tiempo de exposición. La mortalidad presentada en el momento de la inmersión fue casi inmediato, registrándose desde el inicio mortalidades mayores que el 40%.

La mortalidad de *R. similis* bajo el efecto de la mayoría de los extractos metabólicos a una concentración del 100% y a las 24 horas después del primer contacto, fue mayor al 85%, encontrándose los valores más altos de mortalidad, con los aislados pertenecientes al género *Trichoderma*.

Las plantas protegidas con hongos endofíticos presentaron reducciones en la densidad poblacional de *R. similis* dentro de un rango de 47 hasta de 84%, siendo los tratamientos pertenecientes al género *Fusarium* los que reflejaron reducciones más altas.

Las plantas protegidas con hongos endofíticos presentaron un peso del sistema radical y foliar, 39 y 19% mayor que el testigo absoluto, así como mayor altura y diámetro del sistema foliar, y mayor número de hojas y raíces de primer orden.

Las plantas sin protección de hongos endofíticos, e inoculadas con nematodos, presentaron el valor más alto en diámetro promedio de las raíces, así como los valores más bajos en longitud, volumen y área superficial de las mismas, caso contrario a plantas protegidas que casi duplicaron la longitud de las raíces.

6. Referencias bibliográficas

- Amin, N. 1994. Untersuchungen über die Bedeutung endophytischer Pilze für die biologische Bekämpfung des wandernden Endoparasiten *Radopholus similis* (Cobb) Thorne an Bananen. Ph.D. Thesis. Germany. Bonn Universität. 122p.
- Calistru, C.; McLean M.; Berjak P. 1997. In vitro studies on the potential for biological control of *Aspergillus flavus* and *Fusarium moniliforme* by *Trichoderma* species. A study of the production of extracellular metabolites by *Trichoderma* species. *Mycopathology* 137(2):115-124.
- Carroll, C.G. 1990. Fungal endophytes in vascular plants: Mycological research opportunities in Japan. *Trans. Mycol. Soc. Japan* 31:103-116.
- Clay, K. 1992. Fungal endophytes of plants: Biological and chemical diversity. *Natural Toxins* (1):147-149.
- Clay, K. 1988. Fungal endophytes of grasses: A defensive mutualism between plant and fungi. *Ecology* 69:10-16.
- Chabrier, C.; Quénehérve, P. 2003. Control of the burrowing nematode (*Radopholus similis* Cobb.) on banana: Impact of the banana field destruction method on the efficiency of the following fallow. *Crop protection* 22:121-127.
- Davide, R.G. 1996. Overview of nematodes as a limiting factor in Musa production. In: E.A. Frison, J.P. Horry, D. De Waele. Eds. *New Frontiers in resistance Breeding for nematode, Fusarium and Sigatoka*. Montpellier, France, INIBAP. p 27-31.
- Detert, M. E. 1996. Untersuchungen zu Applikationsverfahren für endophytische Pilze zur biologischen Bekämpfung von *Radopholus similis* (Cobb) Thorne an Bananen. Diplomarbeit, University of Bonn. 101 p.
- Dochez, C.; Speijer, P.R.; Hartman, J.; Vuylsteke, D.; De Waele, D. 2000. Cribado de híbridos de Musa para la resistencia a *Radopholus similis*. *InfoMusa* 9(2):3-4.
- García JE. 1997. Introducción a los plaguicidas. San José. EUNED. 450 p.
- Gowen, S.; Quénehérve, P. 1990. Nematode parasites of bananas, plantains and abaca. In M.Luc, A. Sikora, J. Bridge. Eds. *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture*. Luc, M.; Sikora, A.; Bridge, L. eds. Wallingford, United Kingdom. CAB International. 629 p.
- Guaricocha, G. 2000. Conservación de la biodiversidad en los sistemas agroforestales cacaoteros y bananeros de Talamanca, Costa Rica. Tesis MSc. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 128 p.

- Hallmann, J. y Sikora, R.A. 1994. Influence of *F. Oxysporum*, a mutualistic fungal endophyte, on *Meloidogyne incognita* infection of tomato. *Journal of Plant Disease and Protection* 101(5):475-881.
- Hallmann, J. y Sikora, R.A. 1996. Toxicity of fungal endophyte secondary metabolites to plant parasitic nematodes and soil-borne plant parasitic fungi. *European Journal of Plant Pathology* 102:155-162.
- Hartwig, J.; Sikora, R.A. 1991. Mode of action of the carbamate nematicides Cloethocarb, Aldicarb and Carbofuran toward *Heterodera schachtii* I. Contact activity. *Review of Nematology* 14:525-530.
- Hidalgo, N. 1999. Uso de *Trichoderma* spp. en combate biológico. San José. Universidad de Costa Rica.
- Latch, G.C.M.; Hunt, W.F.; and Musgrave, D. R. 1985. Endophytic fungi affect growth of perennial ryegrass. *N. Zeal. Jour. Agricultural Research* 28:165-168.
- Malinowski D.P. ; Belesky D.P. 2000. Adaptations of endophyte-infected cool-season grasses to environmental stresses: mechanisms of drought and mineral stress tolerance. *Crop Science* 40(4):923-940.
- Niere, B.I. 2001. Significance of non-pathogenic isolates 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. Germany. Bonn Universität. 118 p.
- O'Bannon, J. H.; Taylor, A.L. 1968. Migratory endoparasitic nematodes reared on carrot disc. *Phytopathology* 58:385.
- Pocasangre, L.; Sikora, R.A.; Vilich, V.; Schuster, P. 2000. Survey of banana endophytic fungi from Central America and screening for biological control of *Radopholus similis*. In M. Blanke; J. Pohlman. 2000. Eds. ISHS Conference on Fruit Production in the Tropics and Subtropics (2, 2000). Bonn. p. 283-289.
- Pocasangre Enamorado, 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*). Tesis Ph.D. Bonn, Germany. Universität Bonn. 117 p.
- Ramos, B.S.; Curtis, R.H.C.; Evans, K.; Burrows, P.; Haydock, P.P.J. 1995. The potential for resistance to cyst nematodes in transgenic plants which express antibodies. In R.G. McKinlay, D. Atkinson. Eds. *Integrated crop protection: Towards sustainability?* (1994, Edingburg, Scotland). Proceedings No. 63. Edingburg, Scotland, British Crop Protection Council. p. 99-106. (Proceedingsd No. 63).
- Sarah J.L.; Pinochet, J.; Stanton, J. 1996. The burrowing nematode of bananas, *Radopholus similis* Cobb, 1913. *Musa Pest Fact Sheet No. 1*. Montpellier, France. INIBAP. 2p. Disponible en: www.ipgri.cgiar.org/publications/pdf/129_FR.pdf.
- Sarah, J.L. 1989. Banana nematodes and their control in Africa. *Nematropica* 19:199-216.

- Schuster, R. P.; Sikora, R.A.; Amin, N. 1995. Potential of endophytic fungi for the biological control of plant parasitic nematodes. *Mededelingen van de Faciteit Landbouwetenschappen, Rijksuniversiteit Gent* 60:1047-1052.
- Sikora, R.A. 1992. Management of the antagonistic potential in agricultural ecosystems for biological control of plant parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 30:245-270.
- Soto, J.C. 2003. Evaluación de cuatro hongos endofíticos elite provenientes de suelos supresivos para el control biológico del nemátodo barrenador del banano, *Radopholus similis*. Tesis. Lic. Colombia. Universidad de Tolima. 120 p.
- Speijel, Y.; Chet, I. 1998. Evaluation of *Trichoderma* spp. as a biocontrol agent against soilborne fungi and plant parasitic nematodes in Israel. *Integrated Pest Management Reviews* 3:169-175.
- Speijer P; De Waele, R. 1997. Screening of *Musa* Germplasm for resistance and tolerance to nematodes. Technical Guidelines. Rome, Italy. IPGRI, INIBAP. Montpellier, France. CTA, Wageningen.
- Speijer. P. R. y Sikora, R.A. 1993. Influence of a complex involving *Pratylenchus goodeyi* and non pathogenic strain of *Fusarium oxysporum* on banana root health. In C.S. Gold; B. Gemmill. Eds. *Biological and Integrated Control of Highland Banana and Plantain Pests and Diseases*. Cotonou, Benin. p. 231-239.
- Suarez, A. Aprovechamiento sostenible de Madera de *Cordia alliodora* y *Cederela odorata* de regeneración natural en cacaotales y bananales de indígenas de Talamanca, Costa Rica. Tesis MSc. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 72 p.
- West, C.P.; Oosterhuis, D.M.; Wullschleger, S.D. 1990. Osmotic adjustment in tissues of tall fescue in response to water deficit. *Environ. Exp. Bot.* 30: 149-156.
- Zum Felde, A. 2002. Screening of the endophytic fungi from banana (*Musa*) for antagonistic effects towards the burrowing nematode, *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. Thesis MSc. Bonn, Germany. Bonn Universität. 53 p.

VII. Conclusiones generales

Los sistemas de producción orgánica presentaron mayor diversidad de hongos endofíticos que los sistemas de producción convencional, acentuándose mayor diversidad en los sistemas agroforestales que en los sistemas de monocultivo orgánico.

Los sistemas agroforestales y orgánicos presentaron menor población de nemátodos que los sistemas de producción convencional, hecho que se atribuye a la existencia de complejas interacciones entre microorganismos, y a la estructura simplificada de los sistemas convencionales.

La mayoría de los hongos endofíticos evaluados en la prueba de parasitismo efectuaron un biocontrol contra *Radopholus similis*. Los aislados pertenecientes al género *Trichoderma* presentaron mortalidades de 72 a 99%, mientras que *Fusarium* presentó mortalidades hasta del 100%.

En la prueba de antibiosis, la actividad nematicida que los extractos crudos ejercieron sobre *R. similis* fue distinta entre tratamientos. La actividad nematicida estuvo directamente relacionada con el nivel de concentración y el tiempo de exposición, encontrándose mortalidades mayores que 40% al momento de la inmersión y mayores que 85% 24 horas después del cocultivo.

El bioensayo demostró que las plantas protegidas con hongos endofíticos presentaron reducciones en la densidad poblacional de *R. similis* hasta de 84%, siendo los tratamientos pertenecientes al género *Fusarium* los que reflejaron reducciones más altas.

Las plantas protegidas con hongos endofíticos presentaron un peso del sistema radical y foliar, 39 y 19% mayor que el testigo absoluto, así como mayor altura y diámetro basal del sistema foliar y mayor número de hojas y raíces de primer orden.

Las plantas sin protección de hongos endofíticos presentaron el valor más alto en diámetro promedio de las raíces, así como los valores más bajos en longitud, volumen y área superficial de las mismas, caso contrario a plantas protegidas que casi duplicaron dichos valores.

VIII. Recomendaciones generales

Conducir estudios que traten de entender las relaciones que existen entre comunidades microbiales específicas de la rizósfera que determinan la supresividad de los suelos hacia plagas y enfermedades.

Efectuar estudios para entender los mecanismos de acción de antagonismo que los hongos endofíticos ejercen contra *R. similis* en los tejidos internos de las plantas.

La actividad de biocontrol de los hongos endofíticos hacia *R. similis*, debería ser evaluado durante periodos más largos y en condiciones de campo, para verificar el tiempo de protección de las plantas y el efecto en la promoción de crecimiento.

Es importante efectuar bioensayos para proteger cormos con hongos endofíticos, y evaluarlos bajo condiciones de campo para determinar la duración en la protección de las plantas contra el ataque de *R. similis*.

Efectuar aislamientos de hongos endofíticos en hijos que provengan de plantas madre que hayan sido protegidas antes de siembra, y de esta forma determinar si el control que los hongos endofíticos ejercen contra nemátodos es debido a una colonización específica, o bien, si es un control que ocurre de manera sistémica, mediante el estímulo de mecanismos de defensa en las plantas.

Anexo 1. Índices de diversidad por parcela en los sistemas orgánicos de Talamanca

Parcelas	Shannon-Wiener	Evenness	Simpson's Dominance	N2	Simpson's Diversity	Total Numbers	Richness
1	0.693	1.000	0.500	2.000	0.500	2	2
2	0.693	1.000	0.500	2.000	0.500	2	2
3	0.637	0.918	0.556	1.800	0.444	3	2
4	1.386	1.000	0.250	4.000	0.750	4	4
5	1.332	0.961	0.280	3.571	0.720	5	4
6	1.748	0.976	0.184	5.444	0.816	7	6
7	1.099	1.000	0.333	3.000	0.667	3	3
8	1.074	0.774	0.438	2.286	0.563	8	4
9	1.894	0.911	0.190	5.261	0.810	11	8
10	0.000	1.000	1.000	1.000	0.000	1	1
11	0.693	1.000	0.500	2.000	0.500	2	2
12	0.693	1.000	0.500	2.000	0.500	2	2
13	1.906	0.980	0.156	6.400	0.844	8	7
14	1.386	1.000	0.250	4.000	0.750	4	4
16	0.693	1.000	0.500	2.000	0.500	2	2
54	1.099	1.000	0.333	3.000	0.667	3	3
20S	2.565	1.000	0.077	13.000	0.923	13	13
21S	1.792	1.000	0.167	6.000	0.833	6	6
22S	1.979	0.952	0.153	6.545	0.847	12	8
23S	2.554	0.968	0.085	11.765	0.915	20	14
24S	1.583	0.884	0.250	4.000	0.750	12	6
25S	0.950	0.865	0.440	2.273	0.560	5	3
26S	1.677	0.936	0.210	4.765	0.790	9	6
28Se	1.609	0.898	0.240	4.167	0.760	10	6
29Se	1.561	0.970	0.222	4.500	0.778	6	5
31Se	2.653	0.980	0.075	13.370	0.925	19	15
32Se	2.681	0.881	0.102	9.830	0.898	41	21
33Se	3.083	0.958	0.054	18.514	0.946	36	25
34am	2.206	0.958	0.122	8.167	0.878	14	10
35am	1.748	0.976	0.184	5.444	0.816	7	6
37bc	2.311	0.964	0.112	8.895	0.888	13	11
39Shi	2.164	0.985	0.120	8.333	0.880	10	9
40shi	2.079	1.000	0.125	8.000	0.875	8	8
41el	1.792	1.000	0.167	6.000	0.833	6	6
42el	2.342	0.977	0.102	9.800	0.898	14	11
44wa	2.307	0.962	0.109	9.143	0.891	16	11
45wa	1.099	1.000	0.333	3.000	0.667	3	3
46wa	1.099	1.000	0.333	3.000	0.667	3	3
48zu	1.550	0.963	0.224	4.455	0.776	7	5
49val	1.475	0.917	0.265	3.769	0.735	7	5
51fil	1.748	0.976	0.184	5.444	0.816	7	6

**Anexo 2. Nemátodos totales por 100 gramos de raíz en parcelas orgánicas
de la reserva indígena de Talamanca**

Parcela	Sistema	R	H	P	M	Total
20S	b + c + s	50	0	0	0	50
28Se	b + c + s	83	0	0	0	83
32Se	b + s	83	0	0	0	83
22S	b	67	17	17	0	100
26S	b	17	67	17	0	100
39 shi	b + c	67	0	33	0	100
23S	b + s	100	0	0	0	100
33Se	b + s	117	0	33	0	150
21S	b + c	183	0	17	0	200
44 wa	b + c + s	167	0	33	0	200
37 bc	b + c	167	17	33	0	217
24S	b	167	33	33	17	250
12	b + c + s	267	0	17	17	300
51 fil	b + c + s	233	17	67	0	317
6	b + s	283	0	17	17	317
8	b + c + s	283	33	33	0	350
30Se	b + s	250	17	83	0	350
54	b + c + s	350	83	50	0	483
34 am	b + c	367	17	100	50	533
49 val	b + s	450	33	83	17	583
25S	b + s	350	100	100	33	583
11	b + s	483	33	100	0	617
2	b	567	0	50	0	617
4	b + c + s	567	0	50	17	633
16	b + c	633	0	0	17	650
9	b + c	633	50	67	50	800
42 el	b	600	150	50	17	817
1	b + c	600	83	133	0	817
7	b + s	750	67	33	17	867
10	b	533	67	217	117	933
46 wa	b	717	183	83	0	983
43 el	b	767	100	133	67	1067
3	b	917	17	183	50	1167
48 zu	b + s	1050	83	133	50	1317
5	b	950	117	267	117	1450
14	b + c	1833	100	117	17	2067
13	b + s	2767	33	67	33	2900

Anexo 3. Morfotipos aislados en los sistemas de bananos orgánicos de la reserva indígena de Talamanca

Morfotipo	Número de Aislados	Descripción	Morfotipo	Número de Aislados	Descripción
1	3	<i>Trichoderma</i>	63	1	<i>n.d.</i>
2	9	<i>Trichoderma</i>	64	3	<i>Trichoderma</i>
3	8	<i>Trichoderma</i>	65	2	<i>Fusarium</i>
4	1	<i>Trichoderma</i>	66	1	<i>n.d.</i>
5	2	<i>Trichoderma</i>	67	2	<i>n.d.</i>
6	1	<i>Trichoderma</i>	68	1	<i>n.d.</i>
7	1	<i>Trichoderma</i>	69	2	<i>n.d.</i>
8	1	<i>Trichoderma</i>	70	2	<i>n.d.</i>
9	1	<i>Trichoderma</i>	71	1	<i>n.d.</i>
10	7	<i>Trichoderma</i>	72	1	<i>n.d.</i>
11	7	<i>Trichoderma</i>	73	1	<i>n.d.</i>
12	3	<i>Trichoderma</i>	74	3	<i>Fusarium</i>
13	4	<i>Trichoderma</i>	75	1	<i>n.d.</i>
14	6	<i>n.d.</i>	76	2	<i>n.d.</i>
15	24	<i>Verticillium</i>	77	1	<i>n.d.</i>
16	3	<i>n.d.</i>	78	3	<i>n.d.</i>
17	13	<i>Fusarium</i>	79	2	<i>n.d.</i>
18	2	<i>n.d.</i>	80	2	<i>Trichoderma</i>
19	46	<i>n.d.</i>	81	13	<i>Paecylomices</i>
20	5	<i>n.d.</i>	82	1	<i>n.d.</i>
21	3	<i>Fusarium</i>	83	5	<i>n.d.</i>
22	2	<i>n.d.</i>	84	5	<i>n.d.</i>
23	1	<i>Trichoderma</i>	85	1	<i>n.d.</i>
24	3	<i>n.d.</i>	86	2	<i>n.d.</i>
25	2	<i>Fusarium</i>	87	2	<i>n.d.</i>
26	2	<i>Trichoderma</i>	88	1	<i>n.d.</i>
27	1	<i>n.d.</i>	89	2	<i>n.d.</i>
28	1	<i>n.d.</i>	90	3	<i>Fusarium</i>
29	1	<i>Fusarium</i>	91	2	<i>F. oxysporum</i>
30	1	<i>n.d.</i>	92	2	<i>n.d.</i>
31	1	<i>Trichoderma</i>	93	2	<i>n.d.</i>
32	1	<i>n.d.</i>	94	1	<i>Fusarium</i>
33	1	<i>n.d.</i>	95	2	<i>Fusarium</i>
34	2	<i>n.d.</i>	96	1	<i>Sclerotinia</i>
35	1	<i>F. oxysporum</i>	97	2	<i>Sclerotinia</i>
36	2	<i>n.d.</i>	98	4	<i>n.d.</i>
37	2	<i>n.d.</i>	99	5	<i>Fusarium</i>
38	2	<i>n.d.</i>	100	4	<i>n.d.</i>
39	1	<i>Trichoderma</i>	101	1	<i>n.d.</i>
40	5	<i>F. moniliforme</i>	102	2	<i>Fusarium</i>
41	7	<i>Fusarium</i>	103	1	<i>n.d.</i>
42	1	<i>n.d.</i>	104	2	<i>n.d.</i>
43	1	<i>n.d.</i>	105	2	<i>n.d.</i>
44	1	<i>Trichoderma</i>	106	3	<i>m</i>
45	3	<i>Fusarium</i>	107	2	<i>n.d.</i>
46	1	<i>Trichoderma</i>	108	1	<i>n.d.</i>
47	4	<i>n.d.</i>	109	1	<i>n.d.</i>
48	3	<i>n.d.</i>	110	2	<i>n.d.</i>
49	2	<i>Fusarium</i>	111	1	<i>n.d.</i>
50	1	<i>Fusarium</i>	112	3	<i>Trichoderma</i>
51	1	<i>n.d.</i>	113	2	<i>Fusarium</i>
52	1	<i>n.d.</i>	114	1	<i>n.d.</i>
53	1	<i>n.d.</i>	115	2	<i>n.d.</i>
54	1	<i>n.d.</i>	116	1	<i>n.d.</i>
55	8	<i>n.d.</i>	117	3	<i>Trichoderma</i>
56	6	<i>Fusarium</i>	118	5	<i>Trichoderma</i>
57	1	<i>Fusarium</i>	119	10	<i>Trichoderma</i>
58	1	<i>Fusarium</i>	120	1	<i>Trichoderma</i>
59	1	<i>n.d.</i>	121	1	<i>n.d.</i>
60	2	<i>Trichoderma</i>	122	1	<i>Trichoderma</i>
61	2	<i>Fusarium</i>	123	1	<i>n.d.</i>
62	1	<i>n.d.</i>			

Parcela	Comunidad	Morfotipo	No. Aislados	Parcela	Comunidad	Morfotipo	No. Aislados
6	Amubre	2	1	32Se	Sepecue	3	1
		3	1			9	1
		15	1			10	3
		19	2			15	10
		53	1			17	3
107	1	19	5				
7	Amubre	81	1			21	1
		83	1			23	1
		106	1			24	1
13	Amubre	2	1			26	2
		41	1			39	1
		70	2			41	1
		90	1			46	1
		97	1			57	1
		121	1			78	3
		122	1			87	1
23S	Sibuju	7	1			90	1
		11	1			105	1
		14	2			107	1
		16	1			118	1
		19	3	119	1		
		33	2	33Se	Sepecue	2	2
		72	1			8	1
		81	1			10	1
		83	2			12	2
		87	1			14	1
		100	1			15	4
102	1	17	1				
104	2	19	4				
117	1	20	2				
25S	Sibuju	19	1			37	1
		55	3			40	1
		98	1	41	1		
31Se	Sepecue	13	1	45	1		
		15	2	50	1		
		19	2	51	1		
		21	1	52	1		
		25	1	65	11		
		28	1	67	1		
		40	1	88	1		
		41	1	91	2		
		45	1	99	2		
		80	2	101	1		
		84	1	108	1		
		89	2	109	1		
		98	1	118	1		
99	1	48zu	San Vicente	22	1		
111	1			25	1		
49val	Amubre			3	1	67	1
				15	1	100	2
				19	3	119	2
		81	1				
		93	1				

Banano + Especies Forestales

Anexo 5. Cuadrados medios del análisis de varianza efectuado a las variables de población de nemátodos por 100 g de raíz (*Radopholus similis*, *Helicotylenchus* spp., *Pratylenchus* spp., *Meloidogyne* spp., nemátodos de vida libre y fitonemátodos totales), en los sistemas de producción estudiados.

F.V.	G.L.	R	H	P	M	S	TotFito
Repetición	53	42653452	756900	2940627	40224	39851	
Sistema	5	1152439104 (**)	1514130 (*)	50801621 (**)	98674 (**)	3729915 (**)	295 (**)
Error	118						
Total	176						

R=*Radopholus similis*; H=*Helicotylenchus* spp.; P=*Pratylenchus* spp.; M=*Meloidogyne* spp.; S=saprophytes (nemátodos de vida libre); B= banano en monocultivo; B+C= banano con cacao; B+C+F=banano con cacao y especies forestales; B+F= banano con especies forestales; BanCon= sistema convencional de banano; y PlCon= sistema convencional de plátano. (*)= diferencia significativa ($p<0,05$); (**)= diferencia altamente significativa ($p<0,001$).

Anexo 6. Cuadrados medios para los resultados de porcentaje de nemátodos vivos, inmóviles y muertos en la prueba de parasitismo.

F.V.	G.L.	Vivos	Inmóviles	Muertos
Tratamiento	24	818 (**)	2016 (**)	60472 (**)
Error	50	50		

(**)= diferencia altamente significativa ($p<0,001$).

Anexo 7. Cuadrados medios en la prueba de antibiosis para el porcentaje de nemátodos muertos en función del tiempo, concentración de los metabolitos secundarios y el tiempo.

F.V.	G.L.	Nemátodos muertos
Tratamiento	17	8539.2 (**)
Concentración	3	19603.6 (**)
Tratamiento*Concentración	51	229.6 (**)
Rep(Trat*Conc)	144	102.8 (**)
Tiempo	3	14142.1 (**)
Tratamiento*Tiempo	51	1395.6 (**)
Concentración*Tiempo	9	107.44 (n.s.)
Trat*Conc*Tiemp	153	96.9 (**)

(**)= diferencia altamente significativa ($p<0,001$).

(n.s.) = no significativo ($p>0,05$).

Anexo 8. Cuadrados medios para los resultados obtenidos en número de nemátodos por gramo de raíz en el bioensayo, CATIE, Turrialba, Costa Rica.

F.V.	G.L.	Adultos	L3-L4	L1-L2	Totales
Tratamiento	10	53895854 (**)	23165371 (**)	64963020 (**)	4824 (**)
Error	86				

(**)= diferencia altamente significativa ($p < 0,001$).

Anexo 9. Cuadrados medios para los resultados de las variables evaluadas para el efecto de promoción de crecimiento que los hongos endofíticos ejercen sobre vitroplantas Gran enano.

F.V.	G.L.	Altura del pseudotallo (cm)	Diámetro basal del pseudotallo (cm)	Peso del pseudotallo (g)	Número de hojas	Número de raíces	Peso de raíces (g)
Tratamiento	11	5.22 (**)	1.04 (**)	200.5 (**)	1.01 (**)	51.99 (**)	204.39 (**)
Error	95	1.01	0.01	20.47	0.31	4.88	25.85

(**)= diferencia altamente significativa ($p < 0,001$).

Anexo 10. Cuadrados medios para las variables de cambios en la morfología de las raíces

F.V.	G.L.	Longitud total (cm)	Área superficial (cm²)	Diámetro promedio (mm)	Longitud total/volumen (cm/m³)
Tratamiento	11	113089 (n.s.)	4754 (n.s.)	0.00026 (*)	93783 (n.s.)
Error	95	145942	4847	0.00011	137108
C.V.		104.13	149.37	27.79	102.45

(*)= diferencia significativa ($p < 0,05$).

(n.s.) = no significativo ($p > 0,05$).