

UNIVERSIDAD NACIONAL
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA TIERRA Y EL MAR
ESCUELA DE CIENCIAS AGRARIAS

**EVALUACIÓN DE HONGOS Y EXTRACTOS NATURALES APLICADOS VÍA
FOLIAR PARA EL COMBATE DEL AMACHAMIENTO DEL FRIJOL,
CAUSADO POR EL NEMATODO *Aphelenchoides besseyi* (CHRISTIE)**

**Trabajo final de graduación de tesis sometida a consideración del Tribunal
Examinador de la Escuela de Ciencias Agrarias para optar al grado de Licenciatura
en Ingeniería Agronómica.**

Por

Carolina Fallas Garita

**Campus Omar Dengo
Heredia, Costa Rica, 2016**

“Trabajo de graduación presentado para optar al grado de licenciado en Ingeniería Agronómica y al título de Ingeniero Agrónomo”

**EVALUACIÓN DE HONGOS Y EXTRACTOS NATURALES APLICADOS VÍA
FOLIAR PARA EL COMBATE DEL AMACHAMIENTO DEL FRIJOL,
CAUSADO POR EL NEMATODO *Aphelenchoides besseyi* (CHRISTIE).**

“Trabajo final de graduación presentado como requisito parcial para optar al grado de
Licenciado en Ingeniería Agronómica”

Nombre y firma de los miembros del Tribunal Examinador

Carlos Manuel Araya Fernández, Ph.D.
Director de Tesis

Alejandro Esquivel Hernández, M.Sc.
Asesor

Gerardo Rodríguez Rodríguez, Ph.D.
Asesor

Steffany Orozco Cayasso, Lic.
Representante de la Escuela de Ciencias Agrarias

Tomás Marino Herrera, M.Sc.
Decano de la Facultad de Ciencias de la Tierra y Mar

Carolina Fallas Garita
Sustentante

RESUMEN

Con el fin de mejorar el combate de *Aphelenchoides besseyi*, agente causal del amachamiento del frijol, en condiciones *in vitro* se evaluó la eficacia antagonista de los hongos *Arthrobotrys* sp., *Lecanicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Paecilomyces lilacinus* y *Pochonia chlamydosporia*, así como la acción nematicida de extractos de *Brugmansia* sp., *Neurolaena lobata* y *Quassia amara*, sobre poblaciones del nematodo. El efecto de los hongos se evaluó a las 120 y 144 h de exposición de los nematodos, mientras que los extractos a las 24 y 48 h de exposición. En condiciones de invernadero se utilizaron los hongos y extractos que mostraron mejor desempeño en condiciones *in vitro*, con el objetivo de evaluar el efecto de las aplicaciones foliares de los productos sobre el desarrollo del amachamiento en las plantas de frijol, y su efecto sobre los componentes de rendimiento del cultivo. La severidad de la enfermedad se evaluó a los 28, 35 y 42 días después de la siembra de las plantas, y los componentes de rendimiento al momento de la cosecha. En ambas condiciones se usó un diseño experimental de bloques completos al azar, con cinco repeticiones *in vitro* y diez repeticiones en invernadero. En condiciones *in vitro* todos los tratamientos mostraron actividad antagónica; sin embargo, *Trichoderma* sp. fue el que causó mayor mortalidad de nematodos (16%), y *Arthrobotrys* sp. mayor parasitismo de juveniles (12%). El extracto con mayor acción nematicida fue *Brugmansia* sp. (38%), seguido por *N. lobata* (25%). Todos los tratamientos evaluados en la fase de invernadero contribuyeron a obtener plantas más sanas que el testigo; las plantas asperjadas con *Trichoderma* sp., *Paecilomyces* sp. y *Brugmansia* sp. fueron las que presentaron mayor porcentaje de plantas sanas antes del periodo de floración. No se determinó diferencia estadística significativa en el efecto de los tratamientos sobre los componentes de rendimiento del cultivo.

Palabras claves: *A. besseyi*, amachamiento, *Arthrobotrys* sp., *Lecanicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Paecilomyces lilacinus*, *Pochonia chlamydosporia*, *Brugmansia* sp., *Neurolaena lobata* y *Quassia amara*

ABSTRACT

In order to improve *Aphelenchoides besseyi* combat, causal agent of the bean disease "amachamiento", through *in vitro* conditions the antagonistic efficacy of fungi *Arthrobotrys* sp., *Lecanicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Paecilomyces lilacinus* y *Pochonia chlamydosporia* was evaluated, as well as nematicide action of extracts of *Brugmansia* sp., *Neurolaena lobata* and *Quassia amara* on nematode populations. The effect of the fungi was evaluated at 120 and 144 h exposure of nematodes, while extracts at 24 and 48 h exposure. Under greenhouse conditions fungi and extracts that showed better performance were used *in vitro* conditions, with the objective of evaluate the effect of foliar applications of products on the development of "amachamiento" in bean plants, and its effect on crop yield components. The severity of disease was evaluated at 28, 35 and 42 days after sowing of the plants, and yield components at harvest time. In both conditions it was used an experimental design of complete random blocks, with five replicates *in vitro* and ten replicates in greenhouse. Under *in vitro* conditions all treatments showed antagonistic activity; however *Trichoderma* sp. was the one, who caused higher mortality of nematodes (16%), and *Arthrobotrys* sp. greater parasitism of juvenile (12%). The extract with more nematicide action was *Brugmansia* sp. (38%), followed by *N. lobata* (25%). All treatments evaluated in greenhouse phase contribute to obtained more healthy plants that the witness; plants sprayed with *Trichoderma* sp., *Paecilomyces* sp. and *Brugmansia* sp. They were those that showed higher percentage of healthy plants before blooming period. No significant statistical difference was found in the effect of treatments on the components of crop yield.

Key words: *A. besseyi*, amachamiento, *Arthrobotrys* sp., *Lecanicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Paecilomyces lilacinus*, *Pochonia chlamydosporia*, *Brugmansia* sp., *Neurolaena lobata* and *Quassia amara*

DEDICATORIA

A mis padres, Juan Fernando Fallas Zúñiga y Daisy Garita Sánchez, por su amor, comprensión y apoyo incondicional, por los sacrificios y luchas incansables para sacar a sus hijos adelante y por ser mis maestros de vida.

A mis hermanos, Andrea, Luis Fernando y María Fernanda, por ser mis cómplices y apoyarme en todo momento.

Que Dios los bendiga hoy y siempre. Los amo.

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento al Ph.D. Carlos Manuel Araya Fernández, por su paciencia, colaboración e interés en la realización y culminación de mi trabajo, pero sobre todo gracias Profe por brindarme su amistad, apoyo y enseñanzas durante todos estos años, sin su ayuda no hubiera sido posible culminar con éxito éste proceso.

Al M.Sc. Alejandro Esquivel Hernández y al Ph.D. Gerardo Rodríguez Rodríguez, muchísimas gracias por sus valiosos aportes para el desarrollo y culminación de esta investigación y por darme la oportunidad de aprender de ustedes.

Al Ph.D. Eduardo Salas Alvarado, por la colaboración en la realización del análisis estadístico y por su orientación en la interpretación de los datos, por su tiempo y paciencia. Muchas gracias Profe.

A la Ing. Steffany Orozco Cayasso y al M.Sc. Walter Peraza Padilla, por la confianza que me tuvieron, por la ayuda invaluable, paciencia y por hacer que las horas en los laboratorios fueran más entretenidas aún, muchas gracias.

Mami, Papi, Andre, Luis, Mari y Larry, gracias por escucharme y motivarme para poder culminar este proceso, pero sobre todo gracias por la paciencia y transmitirme esperanza en los no tan buenos momentos.

A mis amigos Oscar Villalta y Raquel Montoya, gracias chiquillos por el cariño y apoyo.

A todas aquellas personas que contribuyeron en la realización de esta investigación en sus diferentes etapas.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	ii
ABSTRACT	iii
DEDICATORIA	iv
AGRADECIMIENTOS	v
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivo general	3
1.2. Objetivos específicos.....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1. Generalidades del cultivo de frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L).....	4
2.2. Zonas de producción de frijol en Costa Rica.....	5
2.3. Importancia del cultivo de frijol	6
2.4. Principales limitantes que indican en la producción de frijol en Costa Rica	6
2.5. Amachamiento del frijol.....	7
2.5.1. Importancia económica de la enfermedad	7
2.5.2. Síntomas del amachamiento	7
2.5.3. Características morfológicas, ciclo de vida y epidemiología de <i>Aphelenchoides besseyi</i>	8
2.5.4. Principales limitantes en el manejo del amachamiento	9
2.6. Combate de nematodos fitoparásitos por medio de hongos antagonistas y extractos naturales de plantas.....	10
2.6.1. Uso de hongos antagonistas.....	10
2.6.2. Uso de extractos de plantas para el combate de nematodos	13
2.7. Combate de <i>Aphelenchoides besseyi</i> en frijol con hongos antagonistas y extractos de plantas	16
3. MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1. Elaboración de extractos de plantas	18

3.2. Incremento de los hongos antagonistas a evaluar en condiciones <i>in vitro</i> e invernadero y preparación de las suspensiones de esporas utilizadas en las pruebas	19
3.2.1. Fuente de los hongos utilizados.....	19
3.2.2. Suspensión de esporas para la prueba <i>in vitro</i>	19
3.2.3. Suspensión de esporas para la prueba en invernadero.....	20
3.3. Extracción de <i>A. besseyi</i> del tejido foliar y preparación de la suspensión madre	20
3.4. Evaluación <i>in vitro</i> de la eficacia antagonista de hongos y la acción nematocida de los extractos de plantas.....	21
3.4.1. Evaluación de hongos antagonistas	21
3.4.2. Evaluación de extractos etanólicos de plantas.....	22
3.4.3. Diseño experimental de las pruebas	23
3.5. Evaluación del efecto de las aplicaciones foliares de hongos antagonistas y extractos de plantas sobre el desarrollo del amachamiento en el cultivo de frijol, bajo condiciones de invernadero	23
3.5.1. Siembra de plantas de frijol	24
3.5.2. Inoculación artificial de <i>A. besseyi</i>	24
3.5.3. Preparación y aplicación de los tratamientos en plantas inoculadas artificialmente con <i>A. besseyi</i>	25
3.5.4. Variables evaluadas	25
3.5.5. Diseño experimental.....	26
3.6. Análisis estadístico	27
3.6.1. Pruebas realizadas en condiciones <i>in vitro</i>	27
3.6.2. Pruebas realizadas en condiciones de invernadero.....	27
4. RESULTADOS.....	28
4.1. Eficacia antagonista de los hongos y nematocida de los extractos de plantas sobre poblaciones de <i>A. besseyi</i> en condiciones <i>in vitro</i>	28
4.1.1. Pruebas con hongos antagonistas	28
4.1.2. Pruebas con extractos de plantas	31
4.2. Efecto de las aplicaciones foliares de hongos antagonistas y extractos de plantas sobre el desarrollo del amachamiento en plantas de frijol en invernadero	32

4.3. Efecto de las aplicaciones foliares de hongos antagonistas y extractos de plantas sobre los componentes de rendimiento del cultivo en condiciones de invernadero.....	37
5. DISCUSIÓN.....	39
5.1. Evaluación de la eficacia antagonista de los hongos y la acción nematocida de los extractos de plantas sobre poblaciones de <i>A. besseyi</i> mediante pruebas <i>in vitro</i>	39
5.1.1. Prueba con hongos antagonistas	39
5.1.2. Prueba con extractos de plantas.....	41
5.2. Evaluación del efecto de las aplicaciones foliares de hongos antagonistas y extractos de plantas sobre el desarrollo del amachamiento en plantas de frijol en invernadero	42
5.3. Determinación del efecto de las aplicaciones foliares de hongos antagonistas y extractos de plantas sobre los componentes de rendimiento del cultivo en condiciones de invernadero... ..	44
CONCLUSIONES	46
TRABAJOS A FUTURO	47
LITERATURA CITADA.....	48
ANEXOS	63

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Tratamientos utilizados para evaluar la eficacia antagonista de los hongos sobre <i>A. besseyi</i> en condiciones <i>in vitro</i>	21
Cuadro 2. Tratamientos utilizados para evaluar la eficacia nematocida de los extractos de plantas sobre <i>A. besseyi</i> en condiciones <i>in vitro</i>	22
Cuadro 3. Tratamientos utilizados para determinar el efecto de las aplicaciones foliares sobre el desarrollo del amachamiento y los componentes de rendimiento del cultivo de frijol en condiciones de invernadero.....	24
Cuadro 4. Escala de evaluación de severidad de amachamiento.....	26
Cuadro 5. Actividad antagonista <i>in vitro</i> de los hongos <i>Arthrobotrys</i> sp., <i>Trichoderma</i> sp., <i>Pochonia chlamydosporia</i> , <i>Paecilomyces lilacinus</i> y <i>Lecanicillium</i> sp. contra el nematodo <i>A. besseyi</i>	29
Cuadro 6. Actividad nematocida <i>in vitro</i> de extractos de <i>Brugmansia</i> sp., <i>Neurolaena lobata</i> y <i>Quassia amara</i> contra el nematodo <i>A. besseyi</i>	31
Cuadro 7. Comparación de los tratamientos con respecto al testigo según severidad del amachamiento.....	34
Cuadro 8. Medias de los componentes de rendimiento del cultivo (número de vainas cosechadas por planta, número de vainas totales por planta, número de granos por vaina cosechada y peso de 100 semillas), según los tratamientos evaluados en invernadero.....	38

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Regiones agrícolas de mayor producción de frijol en Costa Rica.....	5
Figura 2. Juveniles de <i>A. besseyi</i> parasitados por <i>Arthrobotrys</i> sp.....	30
Figura 3. Juveniles de <i>A. besseyi</i> parasitados por <i>P. chlamydosporia</i>	30
Figura 4. Juveniles de <i>A. besseyi</i> parasitados por <i>Trichoderma</i> sp.....	30
Figura 5. Hoja trifoliada de frijol con grado leve de severidad, según escala arbitraria descrita por Chaves (2011).....	32
Figura 6. Hoja trifoliada de frijol con grado medio de severidad, según escala arbitraria descrita por Chaves (2011).....	33
Figura 7. Porcentaje promedio de plantas con amachamiento, según tratamientos utilizados, 28 días después de la siembra.....	33
Figura 8. Hoja trifoliada de frijol con grado severo, según escala arbitraria descrita por Chaves (2011).....	35
Figura 9. Porcentaje promedio de plantas con amachamiento, según tratamientos utilizados, 35 días después de la siembra.....	36
Figura 10. Porcentaje promedio de plantas con amachamiento, según tratamientos utilizados, 41 días después de la siembra.....	37

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Procedimiento para reactivar hongos preservados en aceite mineral.....	63
Anexo 2. Procedimiento para incrementar hongos en arroz como sustrato.....	63
Anexo 3. Procedimiento empleado para la prueba de viabilidad de esporas.....	63
Anexo 4. Procedimiento empleado para el conteo de conidios.....	64
Anexo 5. Extracción de nematodos por medio de la técnica de Baerman modificado (CIAT 1982).....	65
Anexo 6. Comparación de los tratamientos según severidad del amachamiento.....	66

1. INTRODUCCIÓN

El amachamiento del frijol se observó por primera vez en Costa Rica en algunos campos comerciales localizados en la Región Brunca durante la década de los 90, cuando se encontraron plantas con hojas corrugadas y lesiones necróticas. A partir de ese momento se inició el proceso de diagnóstico para establecer las prácticas de combate adecuadas. En el año 2006, Barrantes estudió la epidemiología de esa enfermedad y observó que tanto el corrugamiento de hojas como la necrosis se encontraban íntimamente asociados, sin que se lograra establecer alguna relación entre ambos síntomas, ya que se consideraba que eran causados por dos patógenos diferentes que coincidían en tiempo y espacio en las plantaciones. A su vez, Araya y Hernández (2006) habían indicado que la enfermedad conocida como amachamiento causaba diversos grados de deformación foliar, así como plantas anormalmente más desarrolladas y de color verde más oscuro, con retraso en la madurez fisiológica y ausencia o pocas vainas.

Recientemente, Chaves (2011) demostró mediante pruebas serológicas, análisis de ARN de doble cadena y aplicación de los postulados de Koch, que los síntomas observados son causados por el nematodo *Aphelenchoides besseyi*, un organismo que se localiza en los meristemos de las plantas de frijol, que también ataca maíz, arroz y caña de azúcar, todos estos cultivos utilizados por los productores para realizar rotaciones con el cultivo del frijol; también ataca algunas arvenses. Además, demostró que los dos síntomas observados originalmente corresponden a los causados por el nematodo; la enfermedad se describió como amachamiento.

El amachamiento del frijol se caracteriza por producir lesiones necróticas angulares en las hojas inferiores (Salas y Vargas 1984, Barrantes 2006), mientras que en las hojas de estratos superiores se presentan diversos grados de deformación foliar (Morales *et al.* 1999, Araya y Hernández 2006). Asimismo, las plantas con amachamiento adquieren una coloración verde oscura y se produce una guía anormalmente más larga (Araya y Hernández 2006). Las plantas infectadas presentan reducción significativa en la producción de vainas que puede llegar a causar reducción de hasta 80% y, consecuentemente, disminución del rendimiento del cultivo de hasta 85% (Chaves 2011).

La enfermedad ha mostrado un rápido avance en Costa Rica desde la región Brunca hacia la región Huetar Norte, principal zona productora de frijol del país. Se estima una alta probabilidad que la enfermedad se encuentre en plantaciones en el sur de Nicaragua y extenderse al resto de América Central, lo que la convierte en una de las grandes limitantes para los sistemas de cultivo que emplean los pequeños y medianos productores de la región (Chaves 2011).

En el país, en la región Brunca se presenta la mayor incidencia y severidad de amachamiento, debido a que las prácticas culturales y agronómicas asociadas al cultivo de frijol, como la rotación continua con arroz y maíz (ambos cultivos hospedantes de *A. besseyi*), la utilización de residuos de cosechas como cobertura de suelo, la labranza mínima y la siembra a espeque, han favorecido la supervivencia del patógeno en el campo, aunado al hecho de que actualmente no existen variedades comerciales de frijol resistentes a la enfermedad, así como a la ausencia de estrategias específicas para el combate del nematodo (Chaves 2011 y Chaves y Araya 2012a).

Debido a las pérdidas que ocasiona la enfermedad y al hecho que se encuentra presente en las principales zonas productoras de frijol del país, se considera necesario la investigación orientada a desarrollar estrategias eficientes para el combate de la enfermedad, que a su vez sean ambientalmente sostenibles.

De las estrategias que se han implementado para el combate de nematodos fitoparásitos y que son menos contaminantes que los plaguicidas sintéticos, destacan el uso de hongos antagonistas, así como la utilización de extractos botánicos o bioplaguicidas basados en productos naturales (López 2010 y Peraza 2012). Dado lo anterior, el objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia antagonista de hongos y la acción nematocida de extractos de plantas, sobre poblaciones de *Aphelenchoides besseyi*, así como determinar su efecto en el desarrollo del amachamiento del frijol y en los componentes de rendimiento.

1.1. Objetivo general

- Evaluar la eficacia antagonista de hongos y la acción nematocida de extractos de plantas mediante inoculaciones *in vitro* y en invernadero para el combate de *Aphelenchoides besseyi*.

1.2. Objetivos específicos

- Evaluar la eficacia antagonista de los hongos *Arthrobotrys* sp., *Lecanicillium* sp., *Trichoderma* sp., *Paecilomyces lilacinus* y *Pochonia chlamydosporia*, y la acción nematocida de extractos de las plantas *Brugmansia* sp., *Neurolaena lobata* y *Quassia amara*, sobre poblaciones de *Aphelenchoides besseyi* mediante pruebas *in vitro*.
- Evaluar en condiciones de invernadero el efecto de las aplicaciones foliares de hongos antagonistas y extractos de plantas sobre el desarrollo del amachamiento en plantas de frijol.
- Determinar el efecto de las aplicaciones foliares de hongos antagonistas y extractos de plantas sobre los componentes de rendimiento del cultivo en condiciones de invernadero.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L)

El frijol común es una de las especies de la familia Fabacea más cultivadas en el mundo (Veltcheva y Svetleva 2005). Es una planta anual y de rápido crecimiento, su sistema radicular está constituido por una raíz principal y abundantes raíces secundarias. El tallo principal es herbáceo y con sección cilíndrica o levemente angular, el cual está formado por una sucesión de nudos y entrenudos. Las primeras hojas son simples, las restantes son compuestas trifoliadas. El color de la flor varía según la variedad; las inflorescencias presentan de cuatro a ocho flores por racimo, cuyos pedúnculos nacen en las axilas de las hojas o en las terminales de algunos tallos. El fruto es una legumbre de color, forma y dimensiones variables, en cuyo interior se disponen las semillas, las cuales son cilíndricas, reniformes o esféricas, y su color depende de la variedad (CIAT 1984).

El ciclo biológico de la planta se divide en dos fases sucesivas: la fase vegetativa y la fase reproductiva. La fase vegetativa, inicia cuando se le brinda a la semilla las condiciones para iniciar la germinación y termina cuando aparecen los primeros botones florales en las variedades con hábito de crecimiento determinado, o los primeros racimos en las variedades de crecimiento indeterminado; durante esta fase se desarrolla la estructura vegetativa necesaria para iniciar la actividad reproductiva de la planta. La fase reproductiva, a su vez, se encuentra comprendida entre el momento de la aparición de los botones florales o los racimos y la madurez fisiológica de cosecha (CIAT 1986).

En cuanto al establecimiento del cultivo, éste se desarrolla en suelos de fertilidad moderada y texturas livianas, el ámbito óptimo de temperatura para su desarrollo es de 20 a 25 C. El requerimiento hídrico es de 300 a 400 mm de lluvia distribuidos según la duración del ciclo de cultivo y las características del clima; en las etapas finales del cultivo requiere de un periodo de poca precipitación para favorecer el proceso de maduración, pérdida de humedad y cosecha del grano (INTA 2008).

2.2. Zonas de producción de frijol en Costa Rica

En Costa Rica el grano se cultiva en diversas zonas, sin embargo en cuanto al área dedicada al cultivo y volumen de producción, destacan en orden de importancia las regiones Huetar Norte y Brunca, como las principales zonas de producción comercial (Figura 1) (INEC 2015).

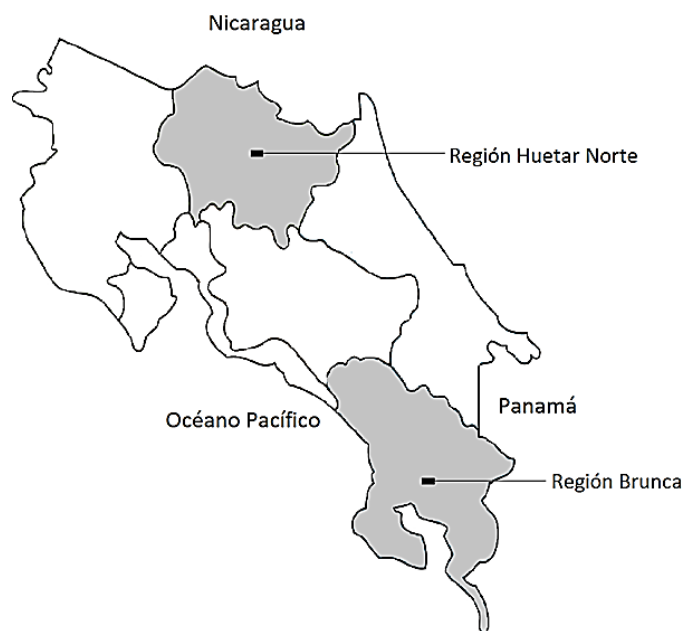


Figura 1. Regiones agrícolas de mayor producción de frijol en Costa Rica.

La región Huetar Norte se caracteriza por presentar una sola época de producción, la siembra se extiende tradicionalmente desde finales de noviembre hasta la primera semana de enero. Los sistemas de siembra que predominan son el semi-mecanizado y mecanizado; además, los terrenos dedicados al cultivo se ubican entre los 300 y 500 msnm (Araya 2000, Araya 2001, INTA 2008). Se estima que los cantones de Upala y Los Chiles producen el 53 % de la producción nacional (MAG-SEPSA 2016).

Por su parte, la región Brunca presenta dos épocas de producción: la primer siembra en el mes de mayo y la segunda entre septiembre y octubre (INTA 2008). Los terrenos dedicados al cultivo de frijol se encuentran ubicados entre los 300 y 900 msnm y se caracterizan por presentar fuertes pendientes, predominando los sistemas de siembra de frijol tapado y a

espeque (Araya 2000). Los cantones en los que más se cultiva el grano son Pérez Zeledón y Buenos Aires (Chaves 2011, Chaves y Araya 2012a).

2.3. Importancia del cultivo de frijol

El frijol común es la leguminosa de grano más importante para consumo humano a nivel mundial. La mayor producción y consumo de este grano se localiza en América Latina, donde se produce cerca del 45% del grano (Araya 2003). En Costa Rica, es consumido por más del 96% de la población (Rodríguez y Dumani 2000, Dumani 2001, Rodríguez 2004), con un consumo *per cápita* de 9,3 kg por año (Proyecto Red SICTA 2014), lo que la convierte en la principal y menos costosa fuente de proteína vegetal con que dispone la población, principalmente en los estratos de menor ingreso (Salazar, 1999).

En el campo social, este cultivo es una fuente de ingresos para alrededor de 4074 pequeños y medianos productores de todo el país, que se localizan en zonas rurales o cantones con índices de desarrollo social muy bajos y, por lo tanto, con una alta incidencia de pobreza y bajo desarrollo social y económico (MAG-SEPSA 2007, CNP 2012).

2.4. Principales limitantes que indican en la producción de frijol en Costa Rica

El cultivo de frijol en el país se encuentra influenciado por factores que inciden en su producción, entre los que destacan la apertura de mercados, políticas de gobiernos que favorecen la importación del grano, condiciones climáticas desfavorables, carencias tecnológicas, altos costos de los insumos y problemas fitosanitarios (Jiménez 2008, Araya y Hernández 2003). Dentro de éstos últimos, Araya (2000) y Chaves (2011), señalan que las enfermedades son consideradas la principal causa de la reducción en el rendimiento del cultivo. En Costa Rica se tiene conocimiento de la presencia de enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus tales como mustia hilachosa (*Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk), antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Mang) Scrib), roya (*Uromyces appendiculatus* (Pers) Ungers), mancha angular (*Phaeoisariopsis griseola* (Sacc) Ferraris), pudrición radicular (*Fusarium oxysporum* f.sp. *phaseoli* Kendrick & Snyder), pudrición gris (*Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid), tizón común (*Xanthomonas campestris* pv. *Phaseoli*) y virus del mosaico dorado amarillo (BGYMV) (Araya 2000, INTA 2008,

Proyecto Red SICTA 2008); así como el amachamiento, causado por el nematodo *Aphelenchoides besseyi* (Chaves 2011).

2.5. Amachamiento del frijol

2.5.1. Importancia económica de la enfermedad

El amachamiento es considerado una de las principales enfermedades que afecta el cultivo de frijol en el país; se estima que puede ocasionar disminución en el rendimiento de las variedades comerciales de hasta 85% y, por ende, los ingresos de las familias que dependen del cultivo (Chaves 2011). El principal efecto del amachamiento es la reducción significativa en la producción de vainas o la ausencia total de ellas. Al respecto, Chaves (2011) y Chaves y Araya (2012b), señalan que la reducción en la formación de vainas y en el rendimiento del cultivo puede ser del 71-80% y 69-85%, respectivamente.

Otro aspecto a considerar es el rápido avance que la enfermedad ha tenido desde la región Brunca a la región Huetar Norte del país, desde donde podría extenderse a plantaciones cercanas ubicadas en Nicaragua y de ahí avanzar al resto de América Central, lo que la convierte en una amenaza para la producción frijolera (Chaves 2011).

2.5.2. Síntomas del amachamiento

Las plantas con amachamiento se caracterizan por presentar lesiones necróticas en las hojas bajas, deformaciones foliares, ausencia o disminución en el número de vainas, así como una coloración verde oscura y guías anormalmente más largas (Morales *et al.* 1999, Barrantes 2006, Araya y Hernández 2006 y Chaves 2011).

Las lesiones necróticas corresponden al primer síntoma de infección del nematodo, que aparecen en las primeras tres o cuatro semanas del cultivo, se caracterizan por ser angulares y estar delimitadas por las nervaduras de las hojas, ya que el nematodo es incapaz de atravesar las venas. Asimismo, las lesiones generalmente coalescen cerca del peciolo, pues es ahí donde se forma una película de agua después de un evento lluvioso, lo cual es aprovechado por el nematodo para infectar, reproducirse y ascender a las partes superiores de la planta (Barrantes 2006, Araya y Hernández 2006, Chizhov *et al.* 2006, Chaves 2011).

Conforme el nematodo se desplaza hacia las partes superiores de la planta, se aloja en las yemas y daña los primordios foliares, induciendo corrugamiento de las hojas, deformación de la vena central que muestra forma de zigzag y alargamiento de la lámina foliar; por su parte, el nematodo también daña los primordios florales, lo que provoca altos porcentajes de aborto floral y por ende ausencia o disminución en el número de vainas. Al producirse menos vainas, la senescencia de la planta se retarda y se presentan plantas más oscuras y con guías anormalmente más largas (Chaves 2011).

2.5.3. Características morfológicas, ciclo de vida y epidemiología de *Aphelenchoides besseyi*

El nematodo *A. besseyi* pertenece a la Clase Secernentea, Orden Tylenchida, Suborden Aphelenchina, Familia Aphelenchoididae y Género *Aphelenchoides* (Agrios 2005). La morfología de *A. besseyi* es propia de la familia Aphelenchoididae; el nematodo es vermiforme durante todos los estadios, su cuerpo es delgado con una longitud que varía entre 0,5 y 0,8 mm; no obstante, las hembras son de mayor tamaño (Christie 1942, Tzeng y Lin 2005). La región cefálica es redondeada y ligeramente saliente del contorno del cuerpo, el estilete es delgado con nódulos poco desarrollados, las glándulas del esófago se extienden dorsal y subdorsalmente, el metacorpus cubre la mayor parte del ancho del cuerpo, el poro excretor se ubica cerca o anteriormente al margen del anillo nervioso; además, la cola es cónica con una terminación caudal con un mucrón de forma diversa con tres a cuatro espinas agudas (Escuer y Bello 2000).

Este nematodo es considerado un parásito obligado y requiere del hospedante para desarrollar y completar su ciclo de vida que dura de siete a 15 días, en función de la temperatura y la humedad atmosférica (APS 1992, Moens y Perry 2009, Escuer y Bello 2000). La temperatura óptima para su desarrollo va de 21 a 25 C, a temperaturas menores de 13 C el nematodo no se desarrolla y cuando la humedad atmosférica es menor del 70% el nematodo se inactiva; no obstante, bajo esas condiciones puede sobrevivir en residuos de cosecha por largos periodos en condición de anhidrobiosis, que es un mecanismo de supervivencia en donde los nematodos se aglomeran para resistir condiciones de escasa humedad (Saeed y Roessner 1984, APS 1992, Escuer y Bello 2000, Jones *et al.* 2013).

En las plantas hospedantes el nematodo se encuentra activo en las partes aéreas, donde puede comportarse como endoparásito al penetrar en la hoja a través de los estomas e invadir los espacios intracelulares, o a través de la epidermis de la superficie inferior (Escuer y Bello 2000, Gandarilla 2005). Asimismo, *A. besseyi* puede comportarse como ectoparásito de hojas y tejidos jóvenes, en donde se alimenta de la epidermis de la hoja (Chaves 2011).

La infestación, reinfestación y dispersión del nematodo se facilita por el salpique de lluvia y por el contacto entre hojas (Escuer y Bello 2000, Katsumi y Shigeru 2001 y Gandarilla 2005). Chaves (2011) menciona que en la planta de frijol *A. besseyi* inicia su infección en las hojas inferiores, donde llega por medio del salpique de lluvia; posteriormente migra hacia las partes superiores de la planta a través de la película de agua que se forma sobre los tejidos en condiciones de alta humedad. En cuanto a plantas hospedantes, además de frijol, parasita otros cultivos como arroz, fresa, cebolla, ajo, rábano, papa, soya, maíz, caña de azúcar, orquídeas, pastos, camote, repollo, entre otros (Arauz 1998, Escuer y Bello 2000, EPPO 2004). En fresa y arroz, es el causante del enanismo y rizado de la fresa y de punta blanca del arroz (Agrios 2005 y Chaves *et al.* 2013).

2.5.4. Principales limitantes en el manejo del amachamiento

El manejo del amachamiento se torna un problema complejo principalmente en los sistemas de siembra que emplean los pequeños productores, debido a que las prácticas que históricamente se han utilizado para el combate de nematodos fitoparásitos, como lo son la siembra de plantas resistentes, rotación de cultivos, preparación del suelo y aplicación de plaguicidas (Arauz 1998), muchas veces no están al alcance o no son viables de implementar en campo. Además de que la mayor parte de los nematicidas sintéticos son de uso contra nematodos del suelo y no contra los que afectan las partes aéreas de las plantas.

Dentro de las limitantes que existen para el manejo del amachamiento se encuentra la falta de variedades de frijol resistentes a la enfermedad; al respecto, Chaves y Araya (2012b), señalan que las variedades comerciales de frijol utilizadas por los productores en el país no presentan resistencia a la enfermedad.

Por otro lado, en la región Brunca los terrenos dedicados al cultivo de frijol se caracterizan por presentar topografía quebrada con fuertes pendientes, lo que dificulta la mecanización

del suelo. Además, tradicionalmente los productores alternan sus campos de cultivo con la rotación maíz-frijol o arroz-frijol, cultivos también hospedantes de *A. besseyi*, lo que favorece la supervivencia del nematodo y por ende mayor incidencia del amachamiento en el cultivo de frijol (Chaves y Araya 2012a).

En cuanto al uso de plaguicidas para el combate del amachamiento del frijol, no existe en el país investigación que respalde su utilización (Chaves y Araya 2012a); sin embargo, de los nematicidas que se han empleado para el combate de *A. besseyi* en cultivos como ornamentales y arroz, así como en investigaciones *in vitro*, destacan el oxamil y disulfoton (Escuer y Bello 2000, Jagdale y Grewal 2002, Yen *et al.* 2007), pero su utilización ha sido muy cuestionada por los efectos adversos que generan en los seres vivos y agroecosistemas, además de su alto costo (Jagdale y Grewal 2002, Márquez *et al.* 2003 y Baoyu *et al.* 2007).

2.6. Combate de nematodos fitoparásitos por medio de hongos antagonistas y extractos naturales de plantas

Debido a que la utilización del combate químico de nematodos se ha visto limitada en los últimos años, la tendencia para dar solución al problema de los nematodos fitoparásitos ha sido la implementación de nuevas opciones ecológicas e inocuas para la salud de los productores y de menor costo (Gommers 1981). Consecuentemente, el uso de microorganismos antagonistas con capacidad de parasitar o competir con los nematodos y de sustancias orgánicas extraídas de plantas que actúan ya sea como repelentes, atrayentes, inhibidores de la incubación o nematotoxicos, han sido herramientas utilizadas para el combate de esta plaga.

2.6.1. Uso de hongos antagonistas

La utilización de hongos con habilidad de suprimir y consumir nematodos fitoparásitos y gastrointestinales de animales, ha sido ampliamente estudiado como una opción para el combate biológico (Hans-Börje 1985, Peraza 2012). Es así como los hongos antagonistas constituyen el grupo de microorganismos más importante en la regulación de poblaciones de nematodos (Chen y Dickson 2004).

Según Vilchis (2011), se conocen alrededor de 170 especies de hongos antagonistas de nematodos en grupos taxonómicos muy diversos. Estos microorganismos habitan de forma natural en el suelo y su distribución es extensa en diversos sustratos, climas y regiones geográficas del mundo; además, poseen la capacidad de sobrevivir en condiciones climáticas y nutricionales extremas (Gray 1987).

Los hongos con capacidad de consumir nematodos se les denomina nematófagos y estos se clasifican de acuerdo con la estrategia de captura en depredadores y endoparásitos (Barrón 1977, Cole y Kendrick 1981). Los hongos depredadores se caracterizan por producir una red hifal extensa y atrapar a sus presas por medio de estructuras predatoras, las cuales pueden ser hifas adhesivas, ramificaciones adhesivas del micelio, anillos constrictores y no constrictores. Los hongos endoparásitos por su parte, infectan por medio de esporas, las cuales pueden ser conidios adhesivos, conidios ingeribles y zoosporas móviles (Peraza 2012).

El proceso de infección de los hongos depredadores inicia a las pocas horas de contacto con el nematodo, en donde el micelio o las estructuras especializadas comienzan a diferenciarse de forma espontánea produciendo trampas de captura que penetran, matan y digieren el contenido de la presa (Barrón 1977). Durante la fase inicial de penetración del hongo en el hospedante, participa la enzima lectina que es responsable del reconocimiento del nematodo; dicha enzima se encuentra presente en las hifas de los hongos y se une a los carbohidratos constituyentes de la cutícula del nematodo, que favorece la colonización del hongo y conduce finalmente a la captura (Nordbring-Hertz y Mattiasson 1979, Nordbring-Hertz y Chet 1983, Yang *et al.* 2007). Algunos ejemplos de hongos depredadores investigados mundialmente son varias especies del género *Arthrobotrys* y *Duddingtonia fiagrans* (Orozco *et al.* 2009).

En los hongos endoparásitos el proceso de infección ocurre a través de la adherencia de la espora a la cutícula del nematodo o mediante su ingestión. Cuando la espora logra penetrar germina dentro del nematodo, crece, se multiplica y da origen a las hifas, que absorben el contenido corporal del nematodo (Volcy y Pardo 1994, Liou y Tzean 1997, Sagüés *et al.* 2011). La germinación y penetración de las esporas en el hospedante depende principalmente de la humedad y temperatura ambiental, así como del tiempo y modo de germinación, agresividad del hongo, tipo de espora y susceptibilidad del hospedante (Samson *et al.* 1988, Tanada y Kaya 1993). Dentro de los hongos con capacidad de colonizar nematodos de forma

endoparásita destacan *Harposporium* sp, *Hirsutella rhossiliensis* y *H. minnesotensis* (Liu *et al.* 2009).

Según Peraza *et al.* (2011), existen tres grupos más de hongos con alta capacidad supresora de nematodos: uno se encuentra relacionado con la especificidad del hongo de atacar nematodos de acuerdo a su estado de madurez, es decir, huevos, juveniles y hembras; un segundo grupo se encuentra relacionado con la capacidad de matar nematodos y dañar su cutícula por medio de estructuras especiales; por último, los hongos que poseen la capacidad de producir toxinas capaces de matar nematodos.

Stirling (1991), menciona que han sido numerosos los estudios realizados por más de 15 años que aportan evidencia de que especies de hongos pertenecientes a los géneros de *Pochonia*, *Fusarium*, *Cylindrocarpon*, *Exophiala*, *Gliocladium*, *Paecilomyces* y *Phoma*, regularmente colonizan quistes y huevos de nematodos.

En Puerto Rico, Dávila *et al.* (1999) establecieron que *Paecilomyces lilacinus* y *P. marquandii* tienen la capacidad de producir sustancias quitinolíticas capaces de inhibir a *Meloidogyne incognita*. A su vez, Chitwood (2002), determinó que la acción reguladora de nematodos por *P. lilacinus*, puede deberse a la liberación de ácido acético, mientras que en el caso de *Arthrobotrys oligospora* se debe a la liberación de ácido linoleico.

Estudios realizados en plantaciones de café y ornamentales en Cuba, por Pérez *et al.* (2006), demostraron el efecto biocontrolador de *Trichoderma harzianum* y *T. viridae* en la eclosión y combate de adultos de *Meloidogyne incognita* en suelo inoculado a concentraciones de 10^8 conidios por gramo de suelo.

Khan *et al.* (2006), evaluó en condiciones de laboratorio la efectividad individual y combinada de *Paecilomyces lilacinus* y *Monacrosporium lysipagum* para el combate de *Heterodera avenae*, *Radopholus similis* y *Meloidogyne javanica* en cebada, banano y tomate, respectivamente. La inoculación combinada de ambos antagonistas logró reducir en 94% los juveniles de *M. javanica* en plantas de tomate y en 65% los quistes de *H. avenae*. En el caso del combate de *R. similis*, los resultados mostraron una reducción del 86% cuando se inoculó individualmente a *M. lysipagum* y de 96% cuando se combinó con *P. lilacinus*.

Por otro lado, Goettel *et al.* (2008), señalan que algunas especies del género *Lecanicillium* son utilizadas para el desarrollo de biopesticidas, debido a su potencial para suprimir poblaciones de nematodos fitoparásitos. Asimismo, otros autores mencionan el potencial de *L. pasalliota*, *L. antillanum* y *Lecanicillium* spp., para infectar huevos de *Meloidogyne incognita*, así como hembras y huevos del nematodo *Heterodea glycines* (Meyer *et al.* 1997, Gan *et al.* 2007, Nguyen *et al.* 2007).

2.6.2. Uso de extractos de plantas para el combate de nematodos

Los extractos naturales de plantas, también conocidos como fitoquímicos o pesticidas botánicos, son productos empleados en la agricultura para el combate de hongos, insectos, ácaros, bacterias y nematodos fitoparásitos (INTA 2010). En los últimos años, la utilización de este tipo de productos ha cobrado relevancia, ya que además de brindar protección a los cultivos, el impacto en la salud de los productores y en el medio ambiente es menor que los plaguicidas sintéticos (Chitwood 2002, Renčo *et al.* 2014).

Chitwood (2002), señala que se ha informado de numerosas especies de plantas, representantes de varias familias botánicas, que poseen la capacidad de sintetizar y producir moléculas orgánicas llamadas metabolitos secundarios. Dichas moléculas son una fuente importante de bioplaguicidas que pueden alterar el comportamiento o desarrollo de nematodos, que actúan como atrayentes o repelentes, inductores de parálisis, o incluso causar la muerte (Halbrendt 1996, Aballay 2005, Sarker *et al.* 2005, Ocampo y Díaz 2006, Renčo *et al.* 2014).

Entre los compuestos activos de amplio espectro que se han extraído de las plantas superiores y que han mostrado efecto positivo para el combate de nematodos, destacan los alcaloides, flavonoides, terpenos, polifenoles, isotiacinatos, glucosinolatos, glucósidos cianogénicos, poliacetilenos, lípidos, esteroides, fenólicos simples y complejos (Chitwood 2002, Renčo *et al.* 2014).

Existen diferentes métodos para aislar compuestos de plantas que dependen de la naturaleza del material de origen, compuestos de interés y equipo disponible para realizar la extracción. Los métodos más comunes son la cocción en agua y la maceración del tejido con solventes (Sarker *et al.* 2005, Ocampo y Díaz 2006). Según Rodríguez y Lagunes (1992), los extractos

naturales de plantas se pueden preparar de diferentes formas y con diferentes solventes como agua, alcohol, éter etílico, aceites, cetonas y benceno.

Ramírez *et al.* (2001), señalan que los extractos botánicos obtenidos a partir de solventes orgánicos son mucho más efectivos que los extraídos a base de agua. Asimismo, Sarker *et al.* (2005) mencionan que al realizar extracciones con solventes orgánicos polares como el etanol, metanol o mezclas alcohólicas acuosas, se logra extraer la mayor cantidad de compuestos presentes en la planta.

Entre las plantas estudiadas para la preparación de extractos con propiedades nematocidas, destacan *Mucuna pruriensis*, *Tagetes* spp., *Crotalaria* spp., *Azadirachta indica*, *Ricinus communis*, el género *Brassica*, *Brugmansia* sp, *Quassia amara* y *Neurolaena lobata*¹, entre otras (Ferraz *et al.* 2010, Ferrari *et al.* 2013, González 2013, Salazar y Guzmán 2014).

Diversas investigaciones respaldan la utilización de los extractos de plantas para el combate de nematodos. Por ejemplo, Hoste *et al.* (2006), mencionan que los taninos (polifenoles), poseen actividad antihelmíntica de nematodos gastrointestinales en rumiantes y efecto contra los nematodos parásitos de plantas. Renčo *et al.* (2014), señalan que soluciones acuosas de la planta *Castanea sativa*, contienen taninos eficaces para el combate de *Meloidogyne javanica* y *Globodera rostochiensis* en cultivos de tomate y papa, respectivamente.

Por otro lado, Thoden *et al.* (2007, 2009), encontraron que los alcaloides extraídos de arvenses como *Chromolaena odorata*, *Crotalaria* spp. y *Ageratum* spp., presentan actividad nematocida, ovicida y repelente de diferentes nematodos parásitos de plantas y de vida libre. Tsay *et al.* (2004), evaluaron el efecto nematocida de 56 especies y 43 géneros de Asteráceas contra *Meloidogyne incognita*, de las cuales el 60% de las especies evaluadas presentaron algún efecto nocivo para el nematodo.

Insunza *et al.* (2001), evaluaron la actividad nematocida de 30 especies de plantas (nueve nativas y 21 naturalizadas en Chile) contra *Xiphinema americanum sensu lato*. Se probaron

¹ Garro, J. 2013. Plantas utilizadas para elaborar extractos con propiedades nematocidas. Instituto Nacional de Innovación y Transferencia de Tecnología (INTA). Comunicación personal.

extractos acuosos de material vegetal fresco y material vegetal secado al aire libre. La actividad nematocida se evaluó según la motilidad de los nematodos luego de 24 y 48 horas de exposición a los extractos, seguido de 24 horas en agua destilada. La inmovilidad de los nematodos fue total a las 48 horas para la totalidad de las plantas evaluadas.

Grewal (1989), evaluó extractos de hojas, flores y semillas de *Bougainvillea spectabilis*, *Cedrella toona*, *Jacaranda acutifolia*, *Melia azadirach*, *Ricinus communis* y *Tagetes patula* contra *Aphelenchoides composticola*, los cuales redujeron las poblaciones del nematodo. A su vez, Cavoski *et al.* (2012), encontraron que los extractos de la semilla de *R. communis* y *M. azadirach* resultaron ser altamente tóxicos para *M. incognita*.

En el caso de *Quassia amara*, el efecto insecticida y nematocida se asocia principalmente al contenido de tres cuasinoides: cuasina y dos isómeros de neocuasina, llamados *alfa* y *beta*; siendo la cuasina el principio activo más importante al estar presente en mayor concentración. (Mancebo *et al.* 2000, Ocampo y Díaz 2006). Por su parte, Coats (1994) también atribuye propiedades insecticidas a la cantina, un aminoácido presente en la planta. Aunque dichas sustancias se pueden encontrar en toda la planta (raíz, follaje, flores, madera y corteza), la mayor concentración se presenta en la madera de ramas gruesas (Villalobos 1995, Flores 2003).

En plantas del género *Brugmansia* sp., estudios realizados por Kite y León (1995) con *B. candida*, determinaron en las flores la predominancia de los terpenoides y bencenoides (trans-ocimeno y 1,8-cineol, respectivamente). En el caso de las hojas de los compuestos examinados, el furanoide sesquiterpenoide (perileno) presentó la mayor concentración.

Por su parte, Passreiter *et al.* (1995), aislaron e identificaron siete lactonas sesquiterpenoides en las hojas de la planta de *Neurolaena lobata*. Para Aballay (2005), los compuestos de estas plantas además pueden interferir en la localización del hospedante, reconocimiento, alimentación y actividad reproductiva del nematodo. Estos compuestos actúan en el desarrollo del nematodo y pueden tener efectos directos sobre la planta hospedante, ya sea por estímulo al crecimiento de la planta, aumento de la tolerancia al ataque, o por activación de mecanismos de defensa en el hospedante.

2.7. Combate de *Aphelenchoides besseyi* en frijol con hongos antagonistas y extractos de plantas

En el caso específico del combate de *A. besseyi* por medio de microorganismos y extractos naturales en el cultivo de frijol, no se encontraron investigaciones que establecieran este tipo de herramientas. No obstante, en otros cultivos, Ramakrishnan y Rajendran (2002), en India, utilizaron el tratamiento de semilla y vía foliar de *Pseudomonas fluorescens* para el combate de los nematodos *Hirschmanniella gracilis* y *A. besseyi* en el cultivo de arroz; los resultados obtenidos mostraron que el tratamiento de semilla seguida de la aplicación foliar a los 45, 55 y 65 días después de la siembra redujeron la población de *A. besseyi* en 57% y la de *H. gracilis* en 82%.

Por su parte, Jagdale y Grewal (2002) en los Estados Unidos evaluaron la aplicación foliar de la bacteria *Pseudomonas cepacia* y el uso del extracto botánico de la planta *Syzygium aromaticum*, para el combate del nematodo *A. fragarie* en la planta ornamental *Hosta* spp.; los resultados obtenidos mostraron que el uso de la bacteria redujo la población del nematodo entre 67 y 85% en hojas y en 50% en el suelo. En el caso del extracto no mostró ningún efecto negativo contra *A. fragarie*.

En Ghana, Osei y Sackey-Asante (2006) evaluaron extractos botánicos de las plantas *Azadirachta indica* (neem) y *Capsicum frutescens* cv Legon 18 (chile) para el combate de *A. besseyi* en semillas de arroz; los resultados obtenidos mostraron reducción del 83% en la población del nematodo en muestras de semillas tratadas con extractos de chile y 82% con extractos de neem.

Chitwood (2002), informó sobre la actividad nematicida de extractos bencénicos de la raíz de *Daphne odora* (Thymelaeaceae) contra *A. besseyi*; el compuesto fue llamado odoracin, un diterpenoide compuesto de 20 carbonos con un efecto adverso a la concentración de 5,0 µg/mL.

Finalmente, los microorganismos y los extractos botánicos tienen limitantes en su uso, por lo que para ser empleados como estrategias para el combate de nematodos, se deben de estudiar en cada caso para hacerlas más efectivas. Según Fernández (2006), el combate biológico de nematodos puede no tener éxito debido al bajo nivel antagónico entre el agente

de combate y el nematodo, la elevada especificidad, o el elevado nivel reproductivo de algunos nematodos. En el caso de los extractos de plantas estos deben de extraerse bajo condiciones controladas, ya que muchos de estos compuestos pueden sufrir alteración química por oxidación o por el efecto de la temperatura y la radiación (Koul y Dhaliwali 2001).

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Elaboración de extractos de plantas

Se obtuvieron extractos de Reina de la noche (*Brugmansia* sp.), Gavilana (*Neurolaena lobata*) y Hombre grande (*Quassia amara*). El material vegetal de *Brugmansia* sp. se colectó en la Finca La Chinchilla del Centro Nacional Especializado en Agricultura Orgánica, ubicado en Oreamuno de Cartago; el material de *N. lobata* y *Q. amara* se colectó de fincas ubicadas en el asentamiento campesino Tres y Tres, ubicado en Pocosol de San Carlos de Alajuela.

Para la elaboración de los extractos se utilizaron flores y hojas de *Brugmansia* sp., hojas y tallos de *N. lobata* y tallos de *Q. amara*. En el caso de las dos primeras especies, para la elaboración de cada extracto se tomó 1,5 kg de material fresco, previamente lavado con agua, el cual se picó en trozos de aproximadamente 1 cm² que fueron colocados en un recipiente hermético color ámbar. Posteriormente, se adicionó 3 L de etanol al 95% y se dejaron reposar por un periodo de 15 días a temperatura ambiente. Finalizado el periodo, se procedió a filtrar los extractos y almacenarlos en botellas de vidrio color ámbar debidamente rotuladas en un lugar oscuro a temperatura ambiente. En el caso de la elaboración del extracto de *Q. amara*, los tallos se secaron al sol durante 15 días y se cortaron en astillas, luego se adicionó el etanol y se almacenó según el procedimiento descrito anteriormente.

En el Laboratorio de Fitoquímica de la Escuela de Química de la Universidad Nacional (UNA), se procedió a obtener el extracto crudo mediante la separación del solvente orgánico. Para ello se colocó cada extracto en un rotavapor marca Buchi Rotavapor R-200, en donde se eliminó el etanol a presión reducida por medio de evaporación. Una vez evaporado el etanol, el extracto se llevó a sequedad en un liofilizador marca Labconco Free Zone 2.5 Plus; seguidamente el extracto crudo fue envasado en viales de vidrio y almacenado a -18 C para su posterior uso.

3.2. Incremento de los hongos antagonistas a evaluar en condiciones *in vitro* e invernadero y preparación de las suspensiones de esporas utilizadas en las pruebas

3.2.1. Fuente de los hongos utilizados

Las cepas de los hongos *Paecilomyces lilacinus*, *Pochonia chlamydosporia*, *Arthrobotrys* sp. y *Lecanicillium* sp. utilizados en la investigación, corresponden a cultivos puros preparados en arroz como sustrato y facilitados por el Laboratorio Dr. Obregón.

Otro hongo utilizado fue la cepa A63-76 de *Trichoderma* sp., aislada por Peraza (2012), la cual fue necesario reactivar ya que se encontraba preservada en aceite mineral en la Micoteca del Laboratorio de Fitopatología de la UNA. El hongo se incrementó en arroz como sustrato para ser utilizado en la pruebas en condiciones *in vitro* e invernadero. Para reactivar e incrementar el hongo, se emplearon las metodologías descritas en los anexos 1 y 2, respectivamente.

3.2.2. Suspensión de esporas para la prueba *in vitro*

Para realizar las suspensiones de esporas se tomaron 20 g de arroz con el hongo esporulado y se depositaron en un beaker, seguidamente con un bisturí esterilizado y humedecido con agua destilada estéril, se procedió a transferir la mayor cantidad de esporas adheridas al bisturí a un beaker conteniendo 20 mL de agua destilada esterilizada, a la que se agregó Tween 80 como dispersante.

Para el conteo de esporas se utilizó un hematocímetro con rayado Neubauer y se siguió la metodología propuesta por French y Hebert (1980). Se contó la cantidad de conidios en cinco cuadros secundarios (los cuatro de las esquinas y el central), el número resultante se multiplicó por 50.000 para obtener la concentración de conidios por mL de la suspensión madre. Para el caso del hongo *P. chlamydosporia*, se contaron las clamidiosporas (esporas de mayor tamaño), por lo que el conteo de esporas se realizó en cinco cuadros primarios del rayado Neubauer; en este caso el número resultante se multiplicó por 2000 para obtener la concentración de clamidiosporas por mL de la suspensión madre.

Una vez conocida la concentración de esporas de las suspensiones madres para cada uno de los hongos, se procedió a ajustar dichas suspensiones con agua destilada estéril para obtener una concentración final de $1,5 \times 10^6$ esporas por mL.

3.2.3. Suspensión de esporas para la prueba en invernadero

Previo a la preparación de las suspensiones, se realizó una prueba de viabilidad de esporas para determinar el porcentaje de germinación, así como el conteo de conidios en 1 g de arroz con el hongo esporulado, para lo cual se siguieron los procedimientos descritos en los anexos 3 y 4, respectivamente. Posteriormente, se procedió a determinar la cantidad de arroz necesaria para preparar 200 mL de las suspensiones de esporas viables a las concentraciones deseadas, lo cual dependió de cada aislamiento, en función del porcentaje de viabilidad y cantidad de esporas presentes en 1 gr de arroz.

Las suspensiones se prepararon a una concentración de $1,5 \times 10^6$ conidios viables por mL, para cada uno de los hongos a evaluar, con excepción del hongo *P. chlamydosporia*, para el cual la concentración fue de $1,8 \times 10^5$ clamidiosporas viables por mL.

3.3. Extracción de *A. besseyi* del tejido foliar y preparación de la suspensión madre

El material vegetal infectado se colectó en plantaciones comerciales de frijol localizadas en Pérez Zeledón de San José, zona donde se ha determinado la mayor incidencia de la enfermedad. Se colectaron plantas de frijol con síntomas característicos de amachamiento, cada muestra se colocó en bolsas plásticas con papel húmedo para mantener la turgencia de los tejidos y la viabilidad de los nematodos. Posteriormente, en el Laboratorio de Nematología de la UNA, se procedió a seleccionar las muestras para su almacenamiento, colocándolas en bolsas plásticas con papel toalla y almacenándolas a 7 C, para su posterior procesamiento. El periodo máximo de almacenamiento del material vegetal fue de 15 días.

La extracción de *A. besseyi* del material vegetal se llevó a cabo en el Laboratorio de Nematología de la UNA, para lo cual se utilizó la técnica de Baerman Modificado (CIAT 1982), descrita en el anexo 5. La identificación de los nematodos se realizó tomando diez especímenes al azar de cada submuestra e identificándolos morfológicamente, según Hunt (1993), con ayuda de un microscopio de luz invertida.

Para obtener la suspensión madre, se repitió el procedimiento descrito en el anexo 5. La concentración de especímenes de la suspensión se obtuvo mediante el conteo de nematodos en una cámara de recuento, para un total de diez lecturas. El promedio de las lecturas dio la concentración de nematodos por mL de la suspensión, que se inoculó en los platos Petri para la prueba *in vitro*, y en las plantas para la prueba en invernadero, como se indica en los apartados respectivos.

3.4. Evaluación *in vitro* de la eficacia antagonista de hongos y la acción nematocida de los extractos de plantas

3.4.1. Evaluación de hongos antagonistas

Para evaluar la eficacia antagonista de los hongos seleccionados, se establecieron seis tratamientos, cinco con los hongos antagonistas (*Trichoderma* sp., *Paecilomyces lilacinus*, *Pochonia chlamydosporia*, *Arthrobotrys* sp. y *Lecanicillium* sp.) y un testigo (Cuadro 1).

Cuadro 1. Tratamientos utilizados para evaluar la eficacia antagonista de los hongos sobre *A. besseyi* en condiciones *in vitro*.

No.	Código	Tratamientos
T1	Tri	<i>Trichoderma</i> sp. + <i>A. besseyi</i>
T2	Pae	<i>Paecilomyces lilacinus</i> + <i>A. besseyi</i>
T3	Poc	<i>Pochonia chlamydosporia</i> + <i>A. besseyi</i>
T4	Art	<i>Arthrobotrys</i> sp. + <i>A. besseyi</i>
T5	Lec	<i>Lecanicillium</i> sp.+ <i>A. besseyi</i>
T6	Tes	Testigo (agua destilada estéril) + <i>A. besseyi</i>

Para el establecimiento de la prueba se depositó en platos Petri de 5 cm de diámetro, 1 mL de agar-agua sobre el cual, una vez solidificado, se adicionaron 100 µL de la suspensión de esporas a una concentración de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL. Posteriormente, la suspensión de esporas se dispersó en forma homogénea con un triángulo de vidrio esterilizado con la finalidad de favorecer la distribución de las esporas del hongo en el medio de cultivo. Los platos Petri se rotularon y se almacenaron durante cuatro días a temperatura ambiente y luz natural, según la metodología empleada por Peraza (2012). Transcurrido el periodo de incubación, se adicionó en cada plato Petri 1 mL de la suspensión de nematodos, conteniendo aproximadamente 104 especímenes de *A. besseyi*. Los platos se incubaron a temperatura ambiente y luz natural.

La evaluación de la eficacia antagonista de los hongos se realizó a las 120 y 144 h después de inoculados los nematodos y consistió en tomar cada uno de los platos Petri y observarlos a 10 y 40 X en el microscopio de luz invertido marca OLYMPUS CK30; se contó el número de nematodos vivos, parasitados y muertos. Se consideraron vivos aquellos especímenes que se desplazaban libremente por el medio de cultivo; parasitados, aquellos en los que se encontró en su interior estructuras fúngicas o atrapados por estructuras del hongo; y muertos, especímenes que no presentaban movilidad al estímulo mecánico y no mostraban estructuras fúngicas en su interior.

3.4.2. Evaluación de extractos etanólicos de plantas

Para evaluar la acción nematicida de los extractos, se establecieron cuatro tratamientos, tres con extractos de plantas (*Brugmansia* sp., *Neurolaena lobata* y *Quassia amara*) y un testigo (Cuadro 2).

Cuadro 2. Tratamientos utilizados para evaluar la eficacia nematicida de los extractos de plantas sobre *A. besseyi* en condiciones *in vitro*.

No.	Código	Tratamientos
T1	Bru	<i>Brugmansia</i> sp. + <i>A. besseyi</i>
T2	Neu	<i>Neurolaena lobata</i> + <i>A. besseyi</i>
T3	Qua	<i>Quassia amara</i> + <i>A. besseyi</i>
T4	Tes	Testigo (agua destilada estéril) + <i>A. besseyi</i>

Previo al establecimiento de la prueba se preparó para cada uno de los extractos una disolución a partir del sólido extraído en etanol, la concentración del extracto en la disolución fue de 1,33% m/v en agua destilada estéril. Para el establecimiento de la prueba se tomaron 3 mL de dicha disolución y se depositaron en un plato Petri de 5 cm de diámetro; seguidamente se agregó 1 mL de una suspensión de nematodos con aproximadamente 58 especímenes de *A. besseyi*. La concentración final del extracto fue del 1% m/v.

La evaluación de la acción nematicida de los extractos se realizó a las 24 y 48 h posteriores a la inoculación de los nematodos y consistió en tomar cada uno de los platos Petri y observarlos a 10 y 40 X en el microscopio de luz invertido marca OLYMPUS CK30, para determinar la movilidad de los nematodos ante el estímulo mecánico. Los especímenes que no presentaban movilidad al estímulo mecánico, fueron removidos y colocados en un plato

Petri con 5 mL de agua destilada estéril durante 24 h a temperatura ambiente para confirmar el efecto nematicida.

3.4.3. Diseño experimental de las pruebas

Para las dos pruebas realizadas en condiciones *in vitro*, se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar. La prueba con hongos antagonistas contó con seis tratamientos y cuatro repeticiones por tratamiento para cada tiempo de lectura (120 y 144 h después de inoculados los nematodos), y la prueba con extractos de plantas contó con cuatro tratamientos y cinco repeticiones por tratamiento para cada tiempo de lectura (24 y 48 h después del establecimiento de la prueba).

La unidad experimental para la prueba con hongos antagonistas fue cada plato Petri con medio agar agua. En el caso de la prueba con extractos de plantas la unidad experimental fue cada plato Petri sin medio de cultivo. En ambos casos se usaron platos Petri de 5 cm de diámetro.

3.5. Evaluación del efecto de las aplicaciones foliares de hongos antagonistas y extractos de plantas sobre el desarrollo del amachamiento en el cultivo de frijol, bajo condiciones de invernadero

La evaluación del efecto de las aplicaciones foliares de los hongos antagonistas y extractos de plantas seleccionados, se realizaron en una casa de mallas en la Estación Experimental Fabio Baudrit de la Universidad de Costa Rica, ubicada en Alajuela. Para la prueba se establecieron ocho tratamientos, de los cuales cinco correspondían a hongos antagonistas (*Arthrobotrys* sp., *Paecilomyces lilacinus*, *Pochonia chlamydosporia*, *Lecanicillium* sp., y *Trichoderma* sp.), dos a extractos de plantas (*Brugmansia* sp. y *Neurolaena lobata*), y un testigo con aplicación de agua destilada (Cuadro 3). Tanto los hongos como los extractos que se evaluaron en invernadero fueron también evaluados en condiciones *in vitro*.

Cuadro 3. Tratamientos utilizados para determinar el efecto de las aplicaciones foliares sobre el desarrollo del amachamiento y los componentes de rendimiento del cultivo de frijol en condiciones de invernadero.

No.	Código	Tratamientos
T1	Art	<i>Arthrobotrys</i> sp.
T2	Pae	<i>Paecilomyces lilacinus</i>
T3	Poc	<i>Pochonia chlamydosporia</i>
T4	Lec	<i>Lecanicillium</i> sp.
T5	Tri	<i>Trichoderma</i> sp.
T6	Bru	<i>Brugmansia</i> sp.
T7	Neu	<i>Neurolaena lobata</i>
T8	Tes	Testigo (agua destilada)

3.5.1. Siembra de plantas de frijol

Para el establecimiento de la prueba se utilizaron macetas plásticas de 4 L conteniendo suelo previamente desinfectado con Agri-Life 2 SL® al 0,05%, dentro de cada maceta se sembraron cuatro semillas de frijol de la variedad Cabecar; el sustrato se mantuvo húmedo para favorecer la germinación uniforme de las semillas. Una vez germinadas las semillas, se procedió a seleccionar las dos plántulas que presentaban mayor vigor con el propósito de mantener plantas homogéneas y sanas para ser inoculadas.

3.5.2. Inoculación artificial de *A. besseyi*

Para la inoculación de *A. besseyi* en las plantas se empleó la metodología propuesta por Barrantes y Araya (2008) y Chaves *et al.* (2013). Para ello, se realizaron tres inoculaciones durante el ciclo del cultivo. La primera inoculación se realizó a los 11 días después de la siembra y consistió en rociar con una bomba manual de baja presión, aproximadamente 3 mL por planta de una suspensión de nematodos, la cual contenía un aproximado de 27 especímenes por mL. Adicionalmente, se colocó 1 cm² con lesiones necróticas de amachamiento sobre cada hoja primaria expandida. Las dos inoculaciones restantes se realizaron a los 13 y 14 días después de la siembra; en este caso la inoculación se hizo solo utilizando lesiones necróticas a razón de 1 cm² por foliolo con una concentración aproximada de 5 nematodos por cm².

Las inoculaciones se realizaron entre las 15:00 y 17:00 h, con el fin de favorecer el establecimiento de los nematodos, ya que a temperaturas altas y bajas humedades relativas

se afecta el establecimiento de *A. besseyi* en las plantas de frijol. Para proporcionar un ambiente con alta humedad relativa, se dispuso de un sistema de nebulización.

3.5.3. Preparación y aplicación de los tratamientos en plantas inoculadas artificialmente con *A. besseyi*

Para la preparación de las soluciones de los extractos de *Brugmansia* sp. y *N. lobata*, se tomó 2 g del extracto crudo y se disolvió en 200 mL de agua destilada con ayuda de un agitador magnético.

La aplicación de los tratamientos se realizó mediante aspersiones foliares de 20 mL por unidad experimental a los 20, 27 y 34 días después de la siembra, con un atomizador manual de baja presión. Durante la aplicación de los tratamientos se colocó alrededor de la unidad experimental un pliego de cartón como barrera física, con el objetivo de evitar posibles derivas de las aspersiones a las plantas adyacentes. Las aspersiones se realizaron entre las 15:00 y 17:00 h con el fin de reducir el efecto adverso de la radiación solar y las altas temperaturas; además, para mantener la humedad de la planta por un mayor periodo de tiempo, con el objetivo de favorecer el establecimiento de los microorganismos.

Los extractos de plantas se aplicaron a una concentración del 1% y los hongos antagonistas se aplicaron a una concentración de $1,5 \times 10^6$ conidios viables por mL, para cada uno de los hongos, con excepción de *P. chlamydosporia*, para el cual la concentración fue de $1,8 \times 10^5$ clamidiosporas viables por mL.

3.5.4. Variables evaluadas

- Severidad del amachamiento:

La severidad del amachamiento se evaluó a los 28, 35 y 42 días después de la siembra (cada ocho días después del momento de aplicación de los tratamientos), con ayuda de la escala arbitraria de severidad descrita por Chaves (2011) (Cuadro 4).

Cuadro 4. Escala de evaluación de severidad de amachamiento.

Valor	Descripción
1	Sana: hoja trifoliada sana.
2	Daño leve: hoja trifoliada con un ligero engrosamiento de la vena central, sin síntomas en venas secundarias ni corrugamiento de la lámina foliar.
3	Daño medio: hoja trifoliada con engrosamiento y zigzagueo leve de vena central, con presencia de un ligero corrugamiento de la lámina foliar.
4	Daño severo: hoja trifoliada con engrosamiento y zigzagueo de vena central, venas laterales ligeramente engrosadas y corrugamiento severo de la lámina foliar.

- Componentes de rendimiento del cultivo:

Previo a la cosecha fue necesario sustraer las vainas que presentaban síntomas de infección por el hongo *Sclerotinia sclerotiorum* con el objetivo de evitar la propagación de la enfermedad en vainas sanas.

La cosecha de las vainas se realizó cuando se observaron en las plantas hojas con coloración amarilla y más de la mitad de estas se habían desprendido de la planta, además del cambio de coloración de las vainas, lo cual ocurrió a los 70 días después de la siembra. Se contó el número de vainas cosechadas por planta por tratamiento. Posteriormente, en el Laboratorio de Fitopatología de la UNA, se procedió a contar el número de granos por vaina cosechada y el peso de 100 semillas.

3.5.5. Diseño experimental

Para la evaluación de los tratamientos en condiciones de invernadero, se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar con ocho tratamientos y diez repeticiones. La unidad experimental consistió en una maceta de 4 L con dos plantas inoculadas artificialmente con *A. besseyi*.

3.6. Análisis estadístico

3.6.1. Pruebas realizadas en condiciones *in vitro*

Se realizó un análisis de regresión logística para determinar diferencias estadísticas entre los hongos antagonistas, según el porcentaje de nematodos muertos, parasitados y porcentaje de mortalidad potencial (nematodos muertos más parasitados). Éste análisis se realizó para cada evaluación. Las diferencias y significancias entre tratamientos se determinaron mediante medias ajustadas de mínimos cuadrados (LS Means). Para éste análisis se utilizó el procedimiento GenMod de SAS® 9.3. Siguiendo el mismo procedimiento, se realizó el análisis estadístico de las pruebas con extractos de plantas, donde se probaron los diferentes tratamientos sobre el porcentaje de mortalidad de los nematodos.

3.6.2. Pruebas realizadas en condiciones de invernadero

La variable severidad se analizó obteniendo las frecuencias según tratamiento y nivel de la escala de severidad, mediante el procedimiento Proc FREQ de SAS® 9.3. Para esta variable multinomial con escala ordinal, se determinaron diferencias entre tratamientos mediante el modelo lineal generalizado (Proc GenMod de SAS® 9.3). Además, se compararon los tratamientos mediante la opción “estimate”, para obtener la diferencia relativa entre pares de tratamientos, el error estándar de la diferencia y la probabilidad de contraste. Para efectos de resultados y discusión, solamente se presentan los contrastes de cada tratamiento con respecto al testigo.

Para determinar diferencias entre tratamientos para los componentes de rendimiento del cultivo (número de vainas cosechadas por planta, número vainas totales por planta, número de granos por vaina cosechada y peso de 100 semillas), se realizó un análisis de varianza mediante el procedimiento Proc GLM de SAS® 9.3. Las diferencias y significancias entre tratamientos se determinaron mediante medias ajustadas de mínimos cuadrados (LS Means).

4. RESULTADOS

4.1. Eficacia antagonista de los hongos y nematicida de los extractos de plantas sobre poblaciones de *A. besseyi* en condiciones *in vitro*

4.1.1. Pruebas con hongos antagonistas

La eficacia antagonista de los hongos sobre *A. besseyi* se evaluó a las 120 y 144 h después de inoculados los nematodos, mediante el conteo de nematodos muertos y parasitados. El análisis de los datos mostró diferencias estadísticas significativas entre tratamientos según el porcentaje de mortalidad en la evaluación efectuada a las 120 h ($P=0,0089$), no así en la evaluación posterior ($P=0,4398$), no obstante, la mortalidad fue mayor. Asimismo, el análisis estadístico mostró diferencias altamente significativas entre tratamientos según el porcentaje de nematodos parasitados y mortalidad potencial en las dos evaluaciones realizadas ($P<0,0001$), como se observa en el Cuadro 5.

De acuerdo con el porcentaje de nematodos muertos, en la evaluación efectuada a las 120 h los valores más altos de mortalidad se obtuvieron en los tratamientos con *Trichoderma* sp. y *Paecilomyces* sp., con 11% y 10%, respectivamente. En la evaluación posterior aumentó el porcentaje de nematodos muertos pero no hubo diferencias estadísticas significativas para la variable.

Los tratamientos que presentaron actividad parasítica contra *A. besseyi* a las 120 y 144 h, fueron *Arthrobotrys* sp., *Trichoderma* sp. y *Pochonia chlamydosporia*; el mayor porcentaje de parasitismo se presentó con *Arthrobotrys* sp. (12%) en la segunda evaluación (Cuadro 5). En los tratamientos con *Arthrobotrys* sp., *P. chlamydosporia* y *Trichoderma* sp., se observaron nematodos parasitados por estructuras del hongo, tal y como se observa en la Figura 2, 3 y 4, respectivamente.

Cuadro 5. Actividad antagonista *in vitro* de los hongos *Arthrobotrys* sp., *Trichoderma* sp., *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus* y *Lecanicillium* sp. contra el nematodo *A. besseyi*.

Código	Tratamientos	% Nematodos muertos		% Nematodos parasitados		% Mortalidad potencial	
		120 horas	144 horas	120 horas	144 horas	120 horas	144 horas
Art	<i>Arthrobotrys</i> sp.	5 c	15	8 a	12 a	13 ab	27 a
Tri	<i>Trichoderma</i> sp.	11 a	16	7 a	9 a	18 a	25 a
Poc	<i>Pochonia chlamydosporia</i>	6 bc	14	10 a	9 a	16 a	23 a
Pae	<i>Paecilomyces lilacinus</i>	10 ab	12	0 b	0 b	10 bc	12 b
Lec	<i>Lecanicillium</i> sp.	7 bc	12	0 b	0 b	7 cd	12 b
Tes	Testigo	5 c	13	0 b	0 b	5 d	13 b
Pr > ChiSq		0,0089	0,4398	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001

Separación de medias realizadas mediante la prueba de LSM means ($P < 0,05$). Porcentajes seguidos por la misma letra (a, b, c) y dentro de la misma columna no son significativamente diferentes.



Figura 2. Juveniles de *A. besseyi* parasitados por *Arthrobotrys* sp.

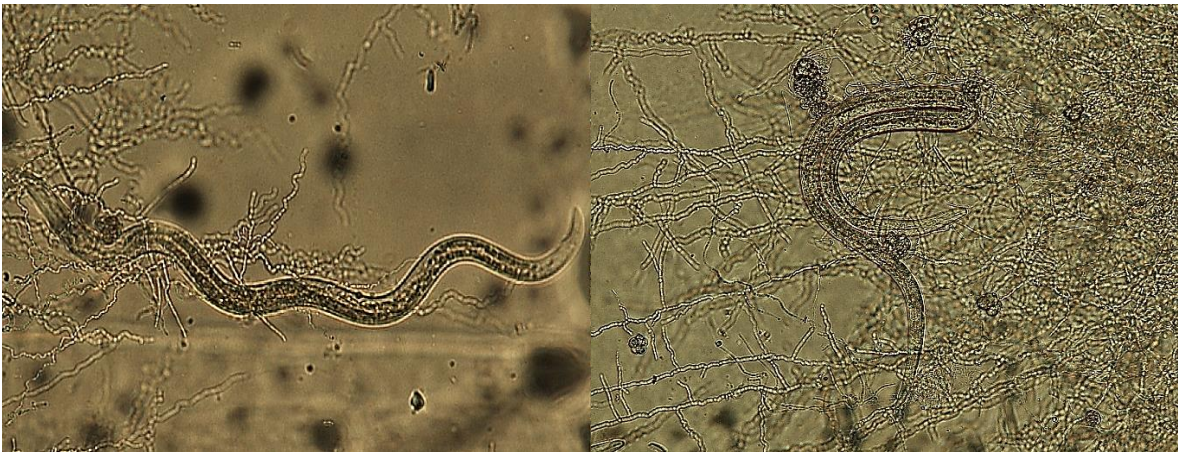


Figura 3. Juveniles de *A. besseyi* parasitados por *P. clamydosporia*.

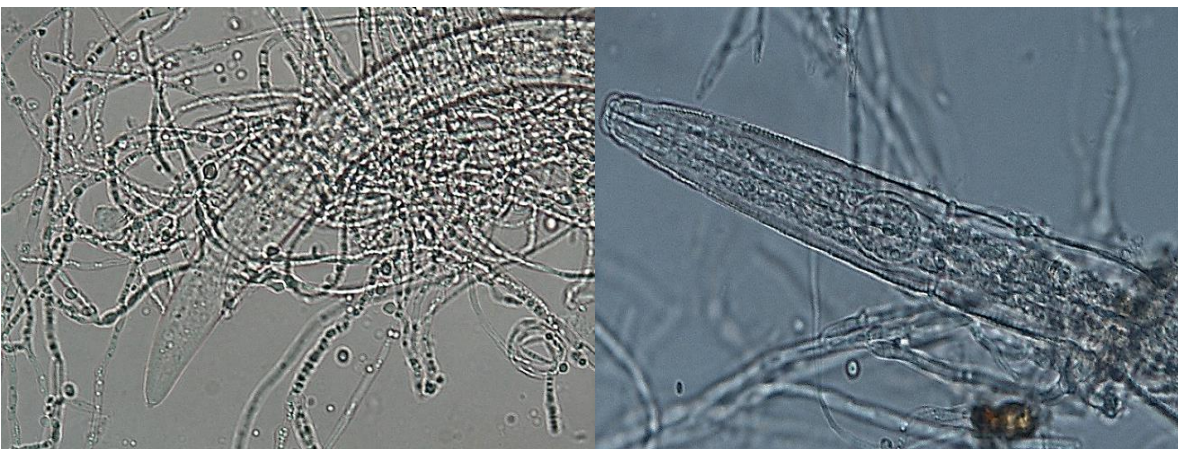


Figura 4. Juveniles de *A. besseyi* parasitados por *Trichoderma* sp.

En cuanto a la variable porcentaje de mortalidad potencial de *A. besseyi* por efecto de los diferentes tratamientos, los valores más altos se presentaron a las 144 h después de inoculados los nematodos en los tratamientos con *Arthrobotrys* sp. (27%), seguido por *Trichoderma* sp. (25%) y *Pochonia chlamydosporia* (23%), los cuales difirieron estadísticamente del testigo (Cuadro 5).

4.1.2. Pruebas con extractos de plantas

La acción nematicida de los extractos se evaluó a las 24 y 48 h después de inoculados los nematodos mediante el conteo de nematodos muertos. El análisis de regresión logística mostró diferencias altamente significativas entre tratamientos en el porcentaje de mortalidad de los nematodos en las evaluaciones realizadas a las 24 y 48 h de exposición a los extractos ($P < 0,0001$).

En la evaluación efectuada a las 24 h, el mayor porcentaje de nematodos muertos se presentó en el tratamiento con el extracto de *Brugmansia* sp. (36%), seguido por el extracto de *Neurolaena lobata* (22%), con diferencias estadísticas de ambos tratamientos con el testigo. El menor porcentaje de mortalidad se presentó con el extracto de *Quassia amara* (16%), el cual no presentó diferencias con el testigo. En la evaluación realizada a las 48 h, todos los tratamientos difirieron del testigo y el mayor porcentaje de mortalidad se obtuvo nuevamente con el extracto de *Brugmansia* sp. (38%), seguido por *Neurolaena lobata* y *Quassia amara* con 25% y 18%, respectivamente (Cuadro 6).

Cuadro 6. Actividad nematicida *in vitro* de extractos de *Brugmansia* sp., *Neurolaena lobata* y *Quassia amara* contra el nematodo *A. besseyi*.

Código	Tratamientos	% Nematodos muertos	
		24 horas	48 horas
Bru	<i>Brugmansia</i> sp.	36 a	38 a
Neu	<i>Neurolaena lobata</i>	22 b	25 b
Qua	<i>Quassia amara</i>	16 bc	18 c
Tes	Testigo	11 c	12 d
Pr > ChiSq		<0,0001	<0,0001

Separación de medias realizadas mediante la prueba de LSMeans ($P < 0,05$). Porcentajes seguidos por la misma letra (a, b, c) y dentro de la misma columna no son significativamente diferentes.

4.2. Efecto de las aplicaciones foliares de hongos antagonistas y extractos de plantas sobre el desarrollo del amachamiento en plantas de frijol en invernadero

En condiciones de invernadero se evaluó el efecto de las aplicaciones foliares de los tratamientos mediante la evaluación de la severidad de la enfermedad a los 28, 35 y 41 días después de la siembra.

En la primera evaluación de la severidad, todos los tratamientos mostraron plantas sanas y con grado de severidad leve (Figura 5); los tratamientos que presentaron plantas con grado medio (Figura 6) fueron *Lecanicillium* sp., *Neurolaena lobata* y el testigo, siendo este último el que mostró menor porcentaje de plantas sanas (25%) (Figura 7). Al comparar los tratamientos con el testigo, según el valor de la diferencia relativa, las plantas tratadas con *Paecilomyces lilacinus*, así como las tratadas con *Pochonia chlamydosporia*, fueron 51,82 veces más propensas a presentar grados inferiores de severidad que el testigo, seguido por el tratamiento con *Brugmansia* sp., el cual fue 15,57 veces más propenso que el testigo a presentar plantas en dicha condición (Cuadro 7).



Figura 5. Hoja trifoliada de frijol con grado de severidad leve, según escala arbitraria descrita por Chaves (2011).



Figura 6. Hoja trifoliada de frijol con grado de severidad medio, según escala arbitraria descrita por Chaves (2011).

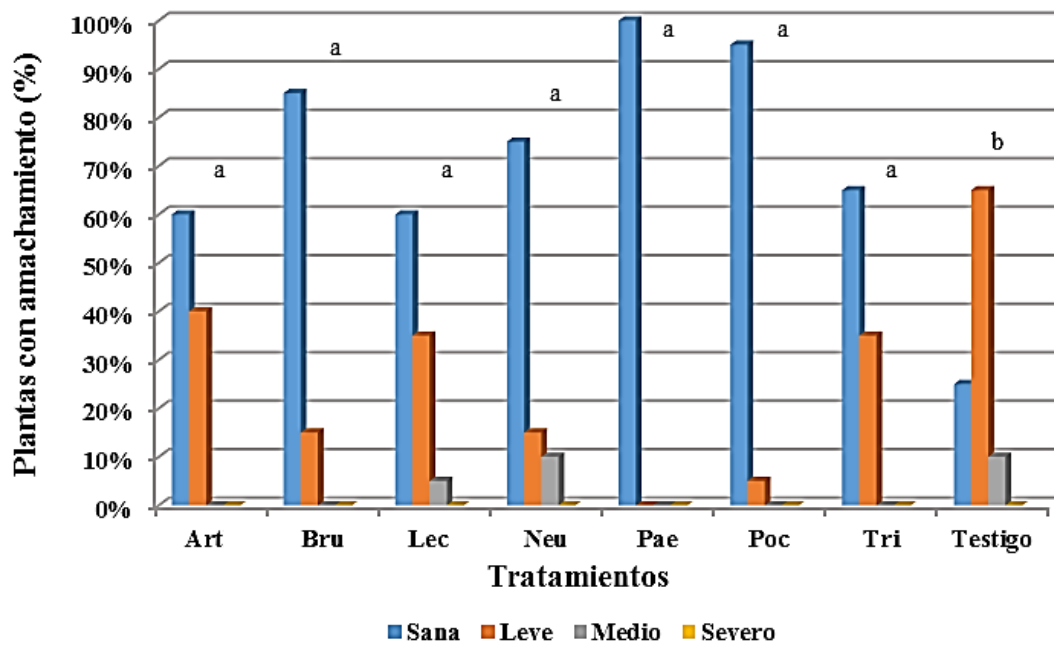


Figura 7. Porcentaje promedio de plantas con amachamiento, según tratamientos utilizados, 28 días después de la siembra. Tratamientos con letra distinta al testigo son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

Cuadro 7. Comparación de los tratamientos con respecto al testigo según severidad del amachamiento.

Contrastes	Evaluación 1		Evaluación 2		Evaluación 3	
	Diferencia relativa \pm error estándar	Pr>ChiSq	Diferencia relativa \pm error estándar	Pr>ChiSq	Diferencia relativa \pm error estándar	Pr>ChiSq
<i>Arthrobotrys</i> sp. vrs Testigo	4,30 \pm 2,76	0,0228	4,96 \pm 2,97	0,0075	4,78 \pm 2,76	0,0067
<i>Brugmansia</i> sp. vrs Testigo	15,57 \pm 12,13	0,0004	4,75 \pm 3,01	0,0139	5,51 \pm 3,28	0,0041
<i>Lecanicillium</i> sp. vrs Testigo	3,97 \pm 2,56	0,0326	4,36 \pm 2,58	0,0126	2,79 \pm 1,60	0,0732
<i>Neurolaena lobata</i> vrs Testigo	7,26 \pm 5,06	0,0045	3,39 \pm 2,03	0,0416	3,50 \pm 1,99	0,0275
<i>Paecilomyces lilacinus</i> vrs Testigo	51,82 \pm 58,37	0,0005	4,96 \pm 2,97	0,0075	3,60 \pm 2,09	0,0275
<i>Pochonia chlamydosporia</i> vrs Testigo	51,82 \pm 58,37	0,0005	2,69 \pm 1,57	0,0908	2,00 \pm 1,16	0,2361
<i>Trichoderma</i> sp. vrs Testigo	5,26 \pm 3,43	0,0110	6,29 \pm 4,08	0,0046	6,15 \pm 3,72	0,0027
Probabilidad	<0,0001		0,0772		0,0421	

Para la segunda evaluación, todos tratamientos mostraron plantas con grado de severidad medio; solo las plantas tratadas con *Trichoderma* sp. y el testigo expresaron grado severo (Figura 8). Sin embargo, el tratamiento con *Trichoderma* sp. fue el que presentó mayor porcentaje de plantas sanas (65%) (Figura 9). Según el valor de la diferencia relativa, las plantas asperjadas con dicho hongo, fueron 6,29 veces más propensas que el testigo a obtener grados de severidad inferiores mientras las asperjadas con *Arthrobotrys* sp. y con *Paecilomyces* sp. 4,96 veces más que el testigo (Cuadro 7).



Figura 8. Hoja trifoliada de frijol con grado severo, según escala arbitraria descrita por Chaves (2011).

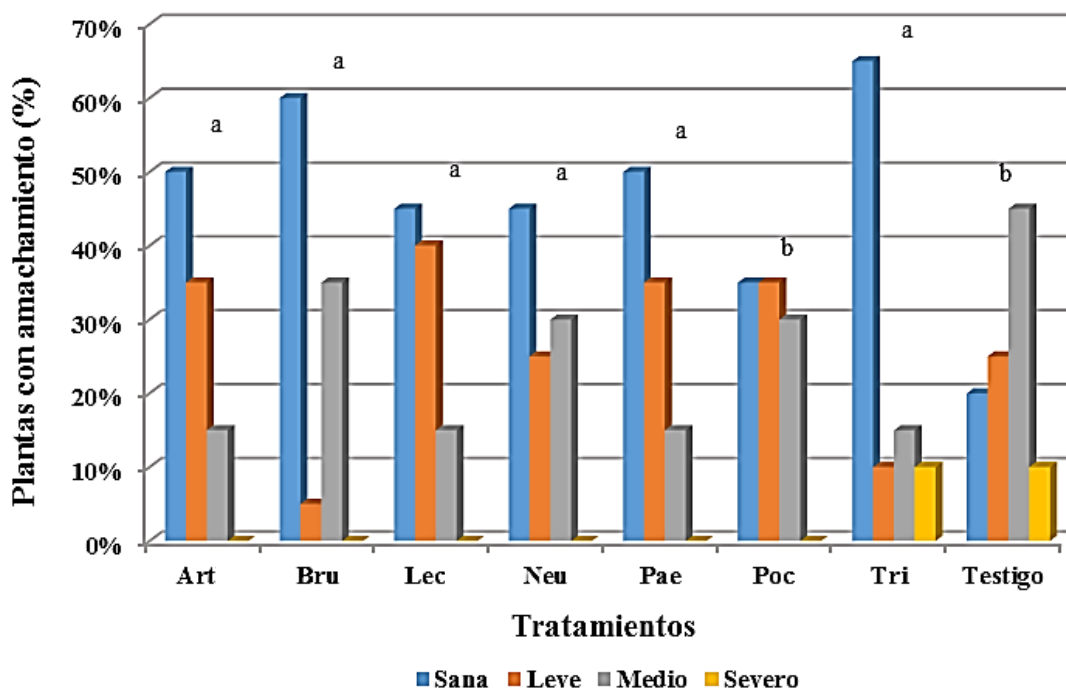


Figura 9. Porcentaje promedio de plantas con amachamiento, según tratamientos utilizados, 35 días después de la siembra. Tratamientos con letra distinta al testigo son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

En la última evaluación de la severidad, todos los tratamientos presentaron plantas en los distintos valores de la escala de evaluación utilizada; no obstante, los tratamientos que mostraron plantas más sanas fueron *Trichoderma* sp. y *Brugmansia* sp., con 50% cada uno (Figura 10). Asimismo, al comparar dichos tratamientos con el testigo, *Trichoderma* sp. fue 6,15 veces más propenso a presentar grados de severidad inferiores que el testigo, mientras que *Brugmansia* sp. 5,15 veces (Cuadro 7).

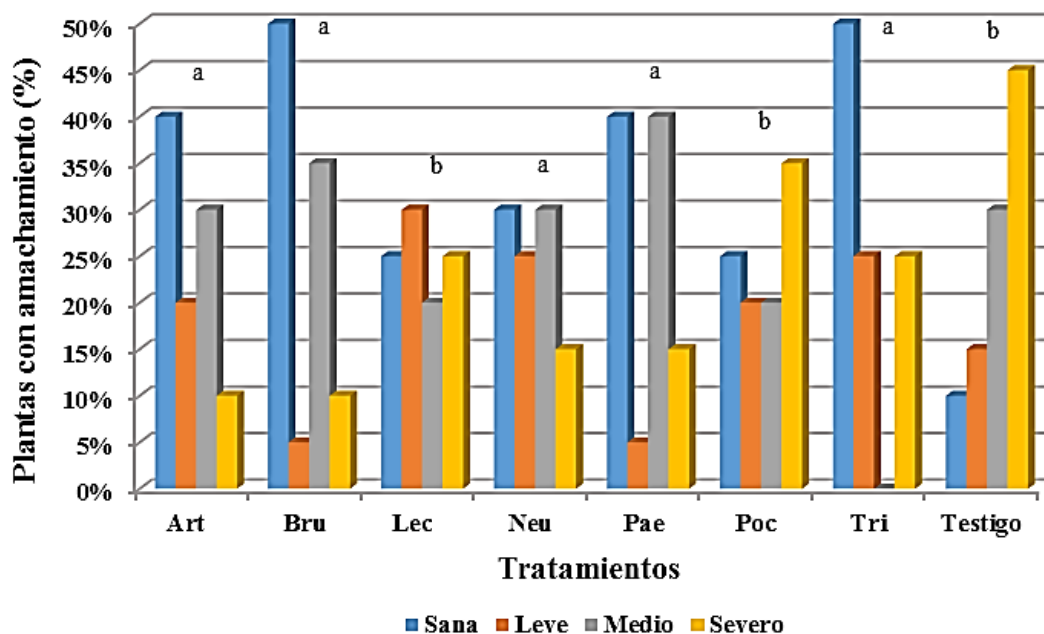


Figura 10. Porcentaje promedio de plantas con amachamiento, según tratamientos utilizados, 41 días después de la siembra. Tratamientos con letra distinta al testigo son significativamente diferentes ($P < 0,05$).

4.3. Efecto de las aplicaciones foliares de hongos antagonistas y extractos de plantas sobre los componentes de rendimiento del cultivo en condiciones de invernadero

La cosecha de vainas se realizó a los 70 días después de la siembra; posterior a la cosecha se determinó el efecto de las aplicaciones foliares de los tratamientos sobre los componentes de rendimiento del cultivo.

De acuerdo con el análisis de varianza, no se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos evaluados ($P > 0,05$) para los componentes de rendimiento del cultivo, por lo que para el número de vainas cosechadas por planta, número de vainas totales por planta, número de granos por vaina cosechada y peso de 100 semillas, estadísticamente todos los tratamientos fueron iguales. Sin embargo, el testigo fue el tratamiento que presentó menor número de vainas totales por planta (Cuadro 8).

Cuadro 8. Medias de los componentes de rendimiento del cultivo (número de vainas cosechadas por planta, número de vainas totales por planta, número de granos por vaina cosechada y peso de 100 semillas), según los tratamientos evaluados en invernadero.

Tratamientos	N° vainas cosechadas/ planta	N° vainas totales/planta	N° granos/vaina cosechada	Peso (g) de 100 semillas
<i>Arthrobotrys</i> sp.	25,50	25,70	4,52	20,81
<i>Trichoderma</i> sp.	23,20	23,40	4,58	23,98
<i>Pochonia chlamydosporia</i>	20,10	20,60	4,67	24,38
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	25,70	27,20	4,50	23,72
<i>Lecanicillium</i> sp.	21,70	22,60	4,67	24,43
<i>Brugmansia</i> sp.	24,80	25,70	4,55	24,89
<i>Neurolaena lobata</i>	27,10	27,80	4,70	24,17
Testigo	19,80	19,80	4,38	24,23
Error estándar	2,67	2,67	0,14	0,29
Probabilidad	0,4071	0,3041	0,7514	0,1433

5. DISCUSIÓN

5.1. Evaluación de la eficacia antagonista de los hongos y la acción nematicida de los extractos de plantas sobre poblaciones de *A. besseyi* mediante pruebas *in vitro*

Los cinco hongos antagonistas y los tres extractos de plantas evaluados en esta investigación, se seleccionaron según sus efectos demostrados y documentados contra otros nematodos (Chitwood 1992, Dávila *et al.* 1999, Ndjonka *et al.* 2013, Nguyen *et al.* 2007, Pérez *et al.* 2006, Salazar y Guzmán 2014, Stirling 1991); en el caso de las plantas seleccionadas para elaborar los extractos, también se consideró su utilización por parte de los agricultores para el combate de otras plagas.

5.1.1. Prueba con hongos antagonistas

La eficacia antagonista de los hongos se evaluó a las 120 y 144 h de exposición de los nematodos mediante el conteo de nematodos muertos y parasitados. Al evaluar la eficacia antagonista de los hongos para la variable nematodos muertos, el tratamiento que mostró mayor desempeño en condiciones *in vitro* fue *Trichoderma* sp. Para la variable nematodos parasitados *Trichoderma* sp. también ejerció un efecto sobre *A. besseyi* en las dos evaluaciones, y el mayor porcentaje de parasitismo, al igual que en el porcentaje de mortalidad, se presentó en la segunda evaluación. Los resultados obtenidos para ambas variables, sugiere que el efecto del hongo sobre *A. besseyi* podría ser mayor en función del tiempo, efecto que debe ser corroborado.

En cuanto a la eficacia antagonista de *Trichoderma* sp. sobre poblaciones de nematodos, Peraza (2012) evaluó en condiciones *in vitro* sepas de *Trichoderma* sp. para el combate de *Meloidogyne* spp., y observó juveniles inactivos sin movimiento aparente producto de una posible producción de compuestos tóxicos por parte del hongo, así como invasión del micelio sobre juveniles como se observó también en esta investigación. Al respecto, diversos autores señalan que los hongos del género *Trichoderma* pueden presentar varios mecanismos de acción contra nematodos, dentro de los que destacan el mico parasitismo, liberación de metabolitos tóxicos y enzimas proteolíticas que disminuyen la actividad de juveniles (Benítez

et al. 2004, Goldman *et al.* 1994, Harman *et al.* 1993, Howell 2003, Mathivanan *et al.* 2004, Sharon *et al.* 2001, Suárez *et al.* 2004, Sahebani y Hadavi 2008, Pathakm y Kumar 1995).

Al analizar los porcentajes de mortalidad obtenidos a las 120 h, además de *Trichoderma* sp., *Paecilomyces lilacinus* también ejerció un posible efecto tóxico. Para los tratamientos restantes, no es posible atribuir el porcentaje de mortalidad a dicho efecto, debido a que no presentaron diferencias con el testigo, en cuyo caso hubo una mortalidad natural de los nematodos. En cuanto a la posible capacidad de *P. lilacinus* de ejercer algún efecto tóxico contra *A. besseyi*, según la literatura consultada, este hongo produce toxinas nematocidas como leucinostatin y el lilacinin, las cuales causan inmovilidad, inactivación y muerte de nematodos (Barrón 1977, Kerry 2000, Stirling 1991, Zaki 1994). Asimismo, Peraza (2012), encontró que aislamientos de *Paecilomyces* sp. muestran inhibición en la capacidad de movimiento y parasitismo de juveniles de *Meloidogyne* spp. Sin embargo, los resultados obtenidos por dicho autor, en cuanto a la capacidad del hongo de parasitar juveniles de *Meloidogyne* spp., difieren con los obtenidos en esta investigación, ya que no se observaron especímenes de *A. besseyi* parasitados por el hongo, lo que sugiere respuesta diferenciada de los géneros de nematodos a este y otros tratamientos para su combate, incluso con productos químicos sintéticos (Ahmad y Ahmad 2010, Cayrol *et al.* 1986, Franco 1994, Jatala 1986).

Con respecto a la variable nematodos parasitados, además de *Trichoderma* sp. se observaron nematodos parasitados por *Arthrobotrys* sp. y *Pochonia chlamydosporia*. Los hongos del género *Arthrobotrys* se caracterizan por atrapar a los nematodos de forma mecánica, mediante anillos constrictores o mediante diferentes estructuras hifales, tales como hifas adhesivas o redes tridimensionales (Barrón 1977, Cruz *et al.* 2008, Hao *et al.* 2005, Su *et al.* 2007), condición que se observó en las placas Petri con *Arthrobotrys* sp., en donde se encontraron nematodos parasitados por el micelio del hongo.

En cuanto a los nematodos parasitados por *P. chlamydosporia*, no fue posible encontrar en la literatura consultada referencia sobre algún mecanismo empleado por el hongo para parasitar estados infectivos de nematodos. Al respecto, la actividad nematófaga del hongo se atribuye principalmente a su capacidad de parasitar huevos y quistes, mediante la presión que ejercen los apresorios de hifas diferenciadas y a la actividad enzimática (Manzanilla *et al.* 2013, Mukhtar *et al.* 2013, Navarro *et al.* 2009, Vergara *et al.* 2012), y no sobre fases móviles

de nematodos (Kerry y Bourne 2002, Manzanilla *et al.* 2013). Sin embargo, Vergara *et al.* (2012), evaluaron en condiciones *in vitro* el efecto de *P. chlamydosporia* sobre *Radopholus similis* y encontraron que el hongo parasitó todos los estados del nematodo fitoparásito. Este hallazgo reitera la respuesta diferencial al combate según el género de nematodo involucrado, lo que puede intensificarse con el comportamiento aéreo del género *Aphelenchoides*, en donde los nematodos además de tener diferentes mecanismos de parasitismo (Chaves 2011, Escuer y Bello 2000, Gandarilla 2005), poseen la habilidad de migrar desde el interior de la hoja a la superficie en condiciones de alta humedad.

5.1.2. Prueba con extractos de plantas

Los extractos se evaluaron a las 24 y 48 h después de inoculados los nematodos mediante el conteo de nematodos muertos. Con base en las evaluaciones realizadas todos los extractos mostraron algún efecto sobre la viabilidad de los nematodos al compararlos con el testigo.

El mayor porcentaje de mortalidad en las dos evaluaciones se presentó con el extracto de *Brugmansia* sp. El efecto sobre los nematodos pudo deberse a la posible presencia de alcaloides como la escopolamina, hiosciamina o atropina, los cuales tienen propiedades nematicidas (Araya 2014, CEA 2010, Shahwar *et al.* 1995, Salazar y Guzmán 2014). Los porcentajes de mortalidad alcanzados a las 24 y 48 h de exposición de los nematodos al extracto, fueron mayores y estadísticamente diferentes a los obtenidos con el testigo y con los otros tratamientos ($P < 0,05$). En un estudio similar realizado por Salazar y Guzmán (2014), se evaluó en condiciones *in vitro* el efecto nematicida de extractos metanólicos de *B. suaveolens* al 1%, sobre juveniles de *Meloidogyne* sp., los autores encontraron que la viabilidad de los nematodos se redujo en 14% y 15%, después de 24 y 48 h de exposición a los extractos, respectivamente.

En cuanto a los nematodos expuestos al extracto de *N. lobata*, también obtuvieron porcentajes de mortalidad mayores que el testigo en ambas evaluaciones ($P < 0,05$). Fujimaki *et al.* (2005) y Ndjonka *et al.* (2013), encontraron que el extracto etanólico de hojas de *N. lobata*, probado en condiciones *in vitro* contra *Brugia pahangi*, nematodo causante de la filariasis en animales, mostró efecto sobre la motilidad de los nematodos. Según Rodríguez y Blanco (1992), las propiedades insecticidas y nematicidas de dicha planta se debe a la presencia de

lactonas (sesquiterpen-lactona) y un flavonoide en las hojas y tallos. A pesar de que no se encontraron informes científicos relacionados con la utilización de *N. lobata* para el combate de nematodos fitoparásitos, varios autores señalan la utilización de ésta planta en la agricultura orgánica para el combate de insectos y nematodos (Bernal *et al.* 1995, CEDECO 2004, Duke 2009, González 2013).

Los porcentajes de mortalidad más bajos se presentaron con el extracto de *Q. amara*, los cuales fueron similares a los obtenidos con el testigo. Dichos resultados no difieren de los encontrados por Salazar y Guzmán (2014), en donde el promedio de mortalidad de juveniles de *Meloidogyne* sp., expuestos a extractos metanólicos de *Q. amara* al 1% por un periodo de 24 y 48 h, fue de 16% y 18%, respectivamente. El efecto tóxico de *Q. amara* sobre insectos y nematodos, se atribuye principalmente a la presencia de cuasinoides como la cuasina y neocuasina, los cuales han sido ampliamente evaluados por su potencial para suprimir poblaciones de nematodos fitoparásitos (Ferrari *et al.* 2013, López 2010, Mancebo *et al.* 2000, Ocampo 1994)

En cuanto al efecto que ejercieron los extractos de *Brugmansia* sp., *N. lobata* y *Q. amara* sobre *A. besseyi*, se pudo determinar que se debió a un efecto tóxico, ya que los nematodos que no mostraban movilidad al estímulo mecánico a las 24 y 48 h, mantuvieron dicha condición posterior a su colocación en agua destilada. Por otro lado, los datos obtenidos para la variable evaluada sugieren que el efecto de los extractos sobre *A. besseyi*, no aumenta con el tiempo de exposición, por lo que su acción se completa a las 24 h; sin embargo, es preciso determinar si el efecto es posible obtenerlo antes de dicho periodo de exposición de los nematodos al extracto.

5.2. Evaluación del efecto de las aplicaciones foliares de hongos antagonistas y extractos de plantas sobre el desarrollo del amachamiento en plantas de frijol en invernadero

Los hongos antagonistas y extractos de plantas utilizados en esta fase fueron previamente evaluados en condiciones *in vitro* y resultan de los tratamientos que mostraron mejor desempeño antagonista y nematicida sobre *A. besseyi* en esas condiciones.

El efecto de las aplicaciones foliares de los tratamientos sobre el desarrollo del amachamiento en condiciones de invernadero, se evaluó a los 28, 35 y 42 días después de la siembra de las plantas mediante la variable severidad, para lo cual se utilizó la escala arbitraria descrita por Chaves (2011). El análisis estadístico de los resultados obtenidos para dicha variable permitió determinar el porcentaje de plantas con amachamiento en los distintos grados de severidad para cada uno de los tratamientos, así como la tendencia de obtener plantas con grados inferiores de severidad, producto de la aplicación foliar de los hongos y extractos evaluados.

De acuerdo con los datos de severidad del amachamiento registrados durante las tres evaluaciones y al comparar los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos con el testigo, es posible determinar que hubo un efecto de los hongos antagonistas y los extractos de plantas sobre la severidad de la enfermedad en las plantas de frijol inoculadas previamente con *A. besseyi*. En la primera evaluación, si bien todos los tratamientos presentaron síntomas iniciales de corrugamiento de la lámina foliar, producto de la infección del nematodo, el testigo fue el único tratamiento que presentó grado medio de corrugamiento y mostró menor porcentaje de plantas sanas, por lo que la aplicación inicial del producto redujo la población de nematodos en la planta que se tradujo en plantas con grados de severidad más bajos que el testigo al momento de la evaluación. Dicha situación fue similar en las evaluaciones posteriores, ya que el testigo fue el tratamiento que presentó mayor número de plantas con grados severos de corrugamiento. A pesar que el grado de severidad del amachamiento aumentó en forma proporcional a la edad de las plantas en las tres evaluaciones, aquellas asperjadas con los hongos antagonistas y extractos de plantas fueron las que presentaron mayor porcentaje de plantas sanas.

De lo anterior se puede inferir que la aplicación foliar de los microorganismos y extractos evaluados, ejercieron un efecto adverso en el establecimiento de *A. besseyi* en la planta, donde posiblemente al haber menor cantidad de nematodos en las partes superiores de la planta debido al efecto del producto, hubo menor parasitismo de los primordios foliares y por ende grados de severidad más bajos, lo cual se tradujo en plantas más sanas con respecto al testigo. Chaves (2011), señala que al aumentar la población de nematodos la severidad de los síntomas y la incidencia de la enfermedad aumenta; a su vez, Barrantes y Araya (2008)

mencionan que el avance de la enfermedad se encuentra ligado a la producción de inóculo secundario dentro la planta.

Al tomar en consideración el avance de la severidad en las tres evaluaciones, las cuales ocurrieron antes de la etapa de floración del cultivo y próximas a dicha etapa, fue posible determinar que las plantas asperjadas con los hongos *Paecilomyces* sp. y *Trichoderma* sp., así como las asperjadas con el extracto de *Brugmansia* sp., fueron las más propensas a obtener categorías inferiores de severidad, por lo tanto una mayor cantidad de plantas más sanas en comparación con el testigo. De acuerdo con Chaves (2011), *A. besseyi* daña los primordios florales y provoca altos porcentajes de aborto floral en las plantas de frijol, lo que se traduce en una disminución en el número de vainas. Por lo tanto, aquellos tratamientos que contribuyan a reducir el inóculo de *A. besseyi* antes del periodo de floración son considerados más efectivos; posterior a dicha etapa el combate del nematodo no contribuye a reducir las pérdidas ocasionadas por la enfermedad, pues *A. besseyi* no afecta las vainas de frijol (Chaves *et al.* 2016).

5.3. Determinación del efecto de las aplicaciones foliares de hongos antagonistas y extractos de plantas sobre los componentes de rendimiento del cultivo en condiciones de invernadero

Para determinar el efecto de las aplicaciones foliares sobre los componentes de rendimiento del cultivo, se realizó la cosecha de las vainas a los 70 días después de la siembra. De acuerdo con los resultados obtenidos mediante el análisis estadístico, para el número de vainas cosechadas y número de vainas totales por planta, ningún tratamiento presentó diferencias estadísticas significativas ($P > 0,05$). Chaves (2011) señala que en condiciones de campo, es común encontrar en plantas con síntomas severos de amachamiento una drástica disminución en el número de vainas, lo cual ocurre por el aborto floral que se produce cuando *A. besseyi* daña los primordios florales. Por otro lado, en dichas condiciones la infestación del nematodo en la planta ocurre de manera permanente durante el ciclo del cultivo por medio del salpique de lluvia y por el roce entre plantas. A diferencia de la infestación que ocurre en campo, en las condiciones en las que se efectuó esta investigación, en la que se realizaron tres inoculaciones artificiales de *A. besseyi* durante el ciclo de cultivo, pudo haber influido el hecho que no se presentara movilidad interna por falta del salpique, o bien menor

reproducción del nematodo dentro de la planta para ocasionar mermas significativas en la producción de vainas. Al respecto, Barrantes (2006) menciona que en frijol existe una alta influencia del inóculo primario de *A. besseyi* en el desarrollo de la enfermedad y en la disminución de los rendimientos del cultivo. No obstante, de acuerdo con los datos obtenidos el testigo fue el tratamiento que mostró el menor número de vainas totales por planta, lo que también sugiere un posible efecto de la aplicación foliar de los hongos y extractos al evitar que los nematodos alcanzaran los primordios florales.

En cuanto al número de granos por vaina cosechada y al peso de 100 semillas, tampoco se presentaron diferencias estadísticas significativas entre tratamientos. Al respecto Chaves y Araya (2012b), señalan que como *A. besseyi* no afecta las vainas sino los brotes florales, cuando estas se desarrollan lo hacen de la misma forma que en una planta sana, por lo que el número de semillas por vaina no es afectado por la enfermedad; a diferencia del peso de las semillas, ya que en las plantas con pocas vainas el tamaño del grano es mayor en comparación con el de una planta sana, condición que no ocurrió en esta investigación.

CONCLUSIONES

Esta investigación representa el primer estudio de la evaluación de hongos antagonistas y extractos de plantas en condiciones *in vitro* e invernadero para el combate de *A. besseyi* en el cultivo de frijol.

Los hongos y extractos evaluados en condiciones *in vitro* mostraron actividad antagónica variable contra *A. besseyi*.

Con base en los resultados obtenidos en la prueba realizada en invernadero, se determinó que todos los hongos antagonistas y extractos de plantas evaluados ejercieron un efecto adverso en el establecimiento de *A. besseyi*, el cual se vio reflejado en la severidad de la enfermedad en las plantas de frijol.

Se determinó que la aplicación foliar de los hongos antagonistas y extractos de plantas no afectaron los componentes de rendimiento del cultivo en condiciones de invernadero, probablemente por acción de los tratamientos que logró reducir la población del nematodo y limitó su ascenso en la planta para afectar los brotes florales.

Debido a las pérdidas que ocasiona la enfermedad en condiciones de campo y con base en los resultados obtenidos en esta investigación, se considera necesario desarrollar investigaciones orientadas a la utilización de hongos antagonistas y extractos de plantas como alternativas para el manejo del amachamiento del frijol.

TRABAJOS A FUTURO

Intensificar estudios sobre el efecto de hongos antagonistas y extractos de plantas sobre los distintos estadios de *A. besseyi*, ya que el énfasis se ha dado con otros géneros de nematodos.

Evaluar en condiciones de invernadero y campo el efecto combinado de aplicaciones foliares del hongo antagonista *Trichoderma* sp. y el extracto de *Brugmansia* sp. sobre el desarrollo del amachamiento en plantas de frijol y sobre los componentes de rendimiento del cultivo.

Desarrollar la caracterización química de los extractos de *Brugmansia* sp., y *N. lobata* y *Q. amara* para la separación, identificación y cuantificación de los principales metabolitos bioactivos responsables de la actividad inhibitoria de nematodos fitoparásitos.

Establecer experimentos en condiciones *in vitro* con el propósito de evaluar el efecto nematicida de los extractos de *Brugmansia* sp. y *N. lobata* a concentraciones mayores al 1% sobre poblaciones de *A. besseyi*.

LITERATURA CITADA

Aballay, E. 2005. Uso de plantas antagónicas para el control de nematodos fitoparásitos en vides. (en línea) Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. Santiago, Chile. Consultado el 02 de febrero del 2013.. Disponible en http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/19.html.

Agrios, G. 2005. Plant Phytopathology. Elsevier Academic Press. Quinta edición. EUA. 952 p.

Ahmad, GM; Ahmad, KT. 2010. Biological potential of *Paecilomyces lilacinus* on pathogenesis of *Meloidogyne javanica* infecting tomato plant. European Journal of Applied Sciences 2(2):80-84.

APS (American Phytopathological Society, USA). 1992. Compendium of Rice Diseases. R. Webster y P. Gunnell eds. St. Paul, Minnesota, USA. APS Press. 86 p.

Arauz, L. 1998. Fitopatología: un enfoque agroecológico. San José, Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica. 468 p.

Araya, C. 2000. Estatus de las principales enfermedades del cultivo de frijol y posibilidades organizativas para su manejo integrado en Costa Rica. Manejo integrado de Plagas y Agroecología. No. 55:6-11.

Araya, C. 2001. Distribución agroecológica de enfermedades del frijol en Costa Rica. In PITTA-FRIJOL ed. V Taller Anual de Resultados de Investigación y Transferencia en Tecnología del PITTA-FRIJOL. Alajuela, Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica. p. 111-117.

Araya, C. 2003. Coevolución de Interacciones Hospedante-Patógeno en Frijol Común. Fitopatología Brasileira. No. 28:221-228.

Araya, C.; Hernández J. 2003. Distribución agroecológica de enfermedades del frijol en Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología. No. 68:26-33.

- Araya, C.; Hernández, J. 2006. Guía para la identificación de las enfermedades del frijol más comunes en Costa Rica. Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). San José. CR. 44 p.
- Araya, M. 2014. Opciones para el manejo integrado de nematodos en la producción intensiva de cultivos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. No. 32:13.
- Baoyu, T; Jinkui, Y; Ke-Qin, Z. 2007. Bacteria used in the biological control of plant-parasitic nematodes: populations, mechanisms of action, and future prospects. *FEMS Microbiology Ecology*. No. 61:197-213.
- Barrantes, W. 2006. Epidemiología de la falsa mancha angular (*Aphelenchoides* spp) en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L). Tesis presentada para obtener el grado de Magister Scientiae en Ciencias Agrícola y Recursos Naturales con énfasis en Protección de Cultivos. San Pedro, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 123 p.
- Barrantes, W; Araya, C. 2008. Reacción de variedades de frijol a la inoculación artificial de *Aphelenchoides besseyi*, agente causal de la falsa mancha angular. *Agronomía Mesoamericana*. 19(1):19-26.
- Barrón, GL. 1977. The nematode destroying fungi. Lancaster, Pennsylvania. Editorial Lancaster Press, Inc. 140 p.
- Benítez, T; Rincón, A; Limón, M; Codón, A. 2004. Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *International Microbiology*. No. 7:249-260.
- Bernal, J.; Hidalgo, C.; García, J. 1995. Industria, importación y comercialización de plaguicidas en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. 19(1):95-107.
- Cavoski, I; Chami, Z; Bouzwbboudja, F; Sasanelli, N; Simeone, V; Mondelli, D; Miano, T; Sarais, G; Ntalli, N; Caboni, P. 2012. *Melia azedarach* controls *Meloidogyne incognita* and triggers plants defence mechanisms on cucumber. *Crop Protection*. No. 35:85-90.
- Cayrol, J; Castet, R; Samson, R. 1986. Comparative activity of different *Hirsutella* species towards three plant parasitic nematodes. *Revue de Nématologie*. 9(4): 412-414.
- CEA (Coordinadora Ecuatoriana de Agroecología). 2010. Alternativas para el manejo de plagas y enfermedades en nuestras fincas. (en línea). Quito Ecuador. Consultado el 09 de

febrero de 2016. Disponible en <http://urban.agroeco.org/wp-content/uploads/2016/02/BIOPESTICIDAS-CEA-PROGRESSIO.pdf>

CEDECO (Corporación Educativa para el Desarrollo Costarricense). 2004. Control y prevención de insectos y enfermedades. Serie de Agricultura Orgánica N°11. (en línea). San José Costa Rica. Consultado el 16 de febrero del 2016. Disponible en http://cedeco.or.cr/files/Control_y_prevenccion_insect.pdf.

Chaves, N. 2011. Epidemiología del amachamiento y cuantificación de pérdidas que ocasiona en el cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris*). Tesis presentada para obtener el grado de Magister Scientiae en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales con énfasis en Protección de Cultivos. San Pedro, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 168 p.

Chaves, N.; Hernández, J.; Araya, C. 2016. Determinación de la capacidad de transmisión por semilla del amachamiento del frijol (*Aphelenchoides besseyi* CHRISTIE). *Agronomía Mesoamericana*. 27(1):109-113.

Chaves, N; Araya, C. 2012a. Efecto de la rotación de cultivos en la incidencia del amachamiento (*Aphelenchoides besseyi* Christie) en frijol. *Agronomía Costarricense*. 36(2):61-70.

Chaves, N; Araya, C. 2012b. Pérdidas causadas por el amachamiento del frijol (*Aphelenchoides besseyi* Christie) y reacción del germoplasma comercial al patógeno. *Agronomía Mesoamericana*. 23(1):01-12.

Chaves, N; Cervantes, E; Zabalgoeazcoa, I; Araya, C. 2013. *Aphelenchoides besseyi* Christie (Nematoda: Aphelenchoididae), agente causal del amachamiento del frijol común. *Tropical Plant Pathology*. 38(3):243-252.

Chen, S; Dickson, DW. 2004. Biological control of nematodes by fungal antagonist. In: Z.X Chen. SY Chen. DW Dickson (Eds) *Nematology. Advances and perspectives*, Volume II. Beijing, China. p. 979-1039.

Chitwood, D. 2002. Phytochemical based strategies for nematode control. *Phytopathology*. No. 40:221-249.

Chizhov, V.; Chumakova, O.; Subbotin, A. Beldwin, J. 2006. Morphological and molecular characterization of foliar nematodes of the genus *Aphelenchoides*: *A. fragariae* and *A. ritzemabosi* (Nematoda: Aphelenchoididae) from Main Botanical Garden of the Russian Academy of Sciences, Moscow. Russian Journal of Nematology. 14(2):179-184.

Christie, J. 1942. A description of *Aphelenchoides besseyi* the summer-dwarf nematode of strawberries, with comments on the identity of *Aphelenchoides subtenuis* and *Aphelenchoides hodsoni*. Helminthological Society. No. 9:82-84.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1982. Principales nematodos que atacan el frijol común y su control; guía de estudio para ser usada como complemento de la Unidad Audiotutorial sobre el mismo tema. Palmira, Colombia. Palmira, Colombia. 37 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1984. Morfología de la planta de fríjol común; guía de estudio para ser usada como complemento de la Unidad Audiotutorial sobre el mismo tema. Palmira, Colombia. 56 p.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1986. Etapas de desarrollo de la planta de frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.). Cali, Colombia. 34 p.

CNP (Consejo Nacional de Producción, CR). 2012. Ficha técnica de Frijol. Periodo Agrícola 2012-2013. (en línea). Consultado el 06 de enero del 2013. Disponible en http://web.cnp.go.cr/images/SIIM/analisis/granos/FT_Frijol_15_11-12.pdf.

Coats, J. 1994. Risks from natural versus synthetic insecticides. Annual Review of Phytopathology. No. 40:221-229.

Cole, GT; Kendrick, B (eds). 1981. Biology of Conoidal Fungi. Vol. 2. Academia Press. EUA. 660 p.

Cruz, DG; Cordeiro, RC; Lopes, A; Rocha, LV; Santos, CP. 2008. Comparação da eficácia de diferentes isolados dos fungos nematófagos *Arthrobotrys* spp. e *Duddingtonia flagrans* na redução de larvas infectantes de nematóides após a passagem pelo trato digestivo de ovinos. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 17(1):133-137.

- Dávila, M.; Acosta, N; Betancourt, C y Negrón, J. 1999. Capacidad quitinolítica de hongos aislados de suelos agrícolas infestados con el nemátodo nodulador (*Meloidogyne* spp.) en Puerto Rico. *The Journal of Agriculture of the University of Puerto Rico*. No. 83:189-199.
- Duke, J. 2009. *Duke's Handbook of Medicinal plants of Latin America*. USA. CRC Press. 962 p.
- Dumani, M. 2001. Producción nacional de frijoles: su significado para la salud y el estado nutricional de la población costarricense. *In* PITTA-FRIJOL ed. V Taller Anual de Resultados de Investigación y Transferencia en Tecnología del PITTA-FRIJOL. Alajuela, Costa Rica. Editorial Universidad de Costa Rica. p. 13-16.
- EPPO (European and Mediterranean Plant Protection Organization). 2004. *Aphelenchoides besseyi*. Bulletin OEEO/EPPO. Bulletin. No. 34:303-308.
- Escuer, M. y Bello, A. 2000. Nematodos del género *Aphelenchoides* de interés fitopatológico y su distribución en España. *Boletín de sanidad de plagas*. No. 26:47-63.
- Fernández, G. 2006. Consideraciones sobre los agentes de control biológico de nematodos. *Fitosanidad*. 10(2):170-171.
- Ferrari, M; Duarte, C; Botelho, R; Dallemole, R; Martins, S; Zaluski, W. 2013. *In vitro* and foliar spray evaluation of *Verbena officinalis* (L.), *Erythrina mulungu* (Mart. ex Benth.), *Quassia amara* (L.), *Bidens pilosa* (L.) and *Plantago lanceolata* (L.), extracts on *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White, 1919) Chitwood, 1949. *IDESIA*. 31(1):109-115.
- Ferraz, S; Freitas, L; Lopes, E; and C.R. Dias-Arieira 2010. Manejo sustentável de fitonematoides. Viçosa, Brasil. UFV, 245 p.
- Flores, M. 2003. Evaluación de fracciones de extractos y de sustancias puras de origen vegetal como disuasivos o repelentes de adultos de *Bemisia tabaci*. Tesis presentada para obtener el grado de Magister Scientiae. Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 145 p.
- Franco, J. 1994. Problemas de nematodos en la producción de papa en climas templados en la Región Andina. *Nematropica* 24(2):179-195.

French, R; Hebert, T. 1980. Métodos de investigación fitopatológica. San José, C.R. Instituto Centroamericano de Ciencias Agrícolas. 289 p.

Fujimaki, Y.; Kamachi, T.; Yanagi, T.; Cáceres, A.; Maki, J.; Aoki, Y. 2005. Macrofilaricidal and microfilaricidal effects of *Neurolaena lobata*, a Guatemalan medicinal plant, on *Brugia pahangi*. Journal of Helminthology. No. 79:23-28.

Gan, Z; Yang, J; Tao, N; Liang, L; Mi, Q; Li, J; Zhang, K-Q. 2007. Cloning of the gene *Lecanicillium psalliotae* chitinase Lpch1 and identification of its potential role in the biocontrol of root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. Applied Microbiology Biotechnology. 79(6):1309-1317.

Gandarilla, H. 2005. Algunos aspectos sobre las principales especies de fitonematodos asociadas a los cultivos de plantas ornamentales. Fitosanidad. No. 9:49-57.

Goettel, M.;Koike, M.; Kim, J.; Aiuchi, D.; Shinya, R.; Brodeur, J. 2008. Potential of *Lecanicillium* spp. for management of insects, nematodes and plant diseases. Journal of Invertebrate Pathology. No. 98:256-261.

Goldman, G; Hayes, C; Harman, G. 1994. Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. Biotechnology Tintech. No. 23:1011-1020.

Gommers, F. J. 1981. Biochemical interactions between nematodes and plant and their relevance to control. Helminthological Abstract. No. 50:9-24.

González, J. 2013. Plantas útiles de la Selva. (en línea). Organización para Estudios Tropicales. Consultado el 08 de mayo del 2016. Disponible en http://sura.ots.ac.cr/florula4/docs/plantas_utiles_LS_etnobotanica_2013.pdf.

Gray, NF. 1987. Nematophagous fungi with special reference to their ecology. Biological Reviews. No. 62:25-304.

Grewal, P. 1989. Nematicidal effect of some plant-extracts to *Aphelenchoides composticola* (Nematoda) infesting mushrooms, *Agaricus bisporus*. Revue de Nématologie. No. 12:317-322.

Halbrendt, M. 1996. Allelopathy in the management of plant-parasitic nematodes. *Journal of Nematology*. No. 28:8-14.

Hans-Börje, J. 1985. The biology of the nematophagous fungus *Drechmeria coniospora*. In *Fitonematología Avanzada (1)*. Marbán-Mendoza, N. and Thomason I.J. (Eds.). Colegio de Postgraduados, Chapingo, México. p. 177-194.

Hao, YE; Mo, MH; Su, HY; Zhang, KQ. 2005. Ecology of aquatic nematode trapping hyphomycetes in southwestern China. *Aquatic Microbial Ecology*. No. 40:175-181.

Harman, G; Hayes, C; Lorito, M; Broadway, R; Di Pietro, A; Peterbauer, C; Tronsmo, A. 1993. Chitinolytic Enzymes of *Trichoderma harzianum*: Purification of Chitobiosidase and Endochitinase. *Phytopathology*. No. 83:313-318.

Hoste, H.; Jackson, F.; Athanasiadou, S.; Thamsborg, S.M.; Hoskin, O.S. 2006. The effects of tanninrich plants on parasitic nematodes in ruminants. *Trends in Parasitology*. No. 22:253-261.

Howell, C. 2003. Mechanisms Employed by *Trichoderma* Species in the Biological Control of Plant Diseases: The History and Evolution of Current Concepts. *Plant Disease*. 87(1):4-10.

Hunt, J. 1993. Aphelenchida, Longidoridae and Trichodoridae: Their systematics and bionomics. Wallingford. CAB International. 352 p.

INEC (Instituto Nacional de Estadística y Censo). 2015. VI Censo Nacional Agropecuario: Resultados Generales. San José, Costa Rica. 146 p.

Insunza, V; Aballay, E; Macaya, J. 2001. *In vitro* nematicidal activity of aqueous plant extracts on Chilean populations of *Xiphinema americanum sensu lato*. *Nematropica*. 31(1):48-54.

INTA (Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, CR). 2008. Manual de recomendaciones técnicas. Cultivo de frijol. San José, CR. 82 p.

INTA (Instituto Nacional de Innovación y Transferencia en Tecnología Agropecuaria, CR). 2010. Identificación, control de plagas y enfermedades en hortalizas con el uso de extractos naturales, hongos antagonistas y entomopatógenos. San José, CR. 20 p.

Jagdale, G; Grewal, P. 2002. Identification of alternatives for the management of foliar nematodes in floriculture. *Pest Management Science*. 58(5):451-458.

Jatala, P. 1986. Biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology* 24:453-489.

Jiménez, M. 2008. Descripción morfológica e histológica del desarrollo ontogénico del eje embrionario cigótico de cuatro variedades costarricenses de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) bajo condiciones de cultivo *in vitro*. Tesis presentada para obtener el grado de Licenciatura en Biología con énfasis en Genética y Biotecnología. San Pedro, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 128 p.

Jones, J; Haegeman, A; Danchin, E; Gaur, H; Helder, J; Jones, M; Kikuchi, T; López, R; Palomares, J; Wesemael, W; Perry, R. 2013. Top 10 plant-parasitic nematodes in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 14(9):946-961.

Katsumi, T; Shigeru, H. 2001. Distribution pattern and mortality of the white tip nematode, *Aphelenchoides besseyi* (Nematoda: Aphelenchoididae), among rice seeds. *Nematology*. 3(1):17-24.

Kerry, BR. 2000. Rhizosphere interactions and the exploitation of microbial agents for the biological control of plant-parasitic nematodes. *Annual Review of Phytopathology*. No. 38:423-441.

Kerry, BR; Bourne, J. 2002. A manual for research on *Verticillium chlamydosporium* a potential biological control agent for root-knot nematodes. Cornell University. Gent, Belgium. 84 p.

Khan, A; Williams, K; Nevalainen, K.M. 2006. Control of plant-parasitic nematodes by *Paecilomyces lilacinus* and *Monacrosporium lysipagum* in pot trials. *BioControl*. No. 51:643-658.

- Kite, G; Leon, C. 1995. Volatile compounds emitted from flowers and leaves of *Brugmansia candida* (Solanaceae). *Phytochemistry*. 40(4):1093-1095.
- Koul, O; Dhaliwal, G.S. 2001. *Phytochemical Biopesticides*. S.G. Harword Academic Publisher. 223 p.
- Liou, GY; Tzean, S. 1997. Phylogeny of the Genus *Arthrobotrys* and Allied Nematode-Trapping Fungi Based on rDNA Sequences. *Mycologia*. 89(6):876-884.
- Liu, X; Xiang, M; Che, Y. 2009. The living strategy of nematophagous fungi. *Mycoscience*. No. 50:20-25.
- López, A.P. 2010. Evaluación de extractos de cuatro especies de plantas y sus compuestos orgánicos sobre la mortalidad de *Radopholus similis* en condiciones *in vitro*. Tesis presentada para obtener el grado de Licenciatura en Ingeniería en Agronomía. Alajuela, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 96 p.
- MAG-SEPSA (Ministerio de Agricultura y Ganadería y Secretaria Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria, CR). 2007. Caracterización y plan para el desarrollo de la agrocadena de frijol (*Phaseolus vulgaris*) en la región Huetar Norte. San José, CR, MAG Dirección Regional Huetar Norte. 43 p.
- MAG-SEPSA (Ministerio de Agricultura y Ganadería y Secretaria Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria, CR). 2016. Boletín Estadístico Agropecuario N°26. Serie Cronológica 2012-2015. (en línea). Consultado el 12 de septiembre de 2016. Disponible en <http://www.infoagro.go.cr/BEA/BEA26/BEA26.pdf>
- Mancebo, F.; Hilje, L.; Mora, G.A.; Salazar, R. 2000. Antifeedant activity of *Quassia amara* (Simaroubaceae) extracts on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. *Crop Protection*. No. 19:301-305.
- Manzanilla, R; Esteves, I; Finetti-Sialer, M; Hirsch, P; Ward; E; Devonshire, J; Hidalgo, L. 2013. *Pochonia chlamydosporia*: Advances and Challenges to Improve Its Performance as a Biological Control Agent of Sedentary Endo-parasitic Nematodes. *Journal of Nematology*. 45(1):1-7.

Márquez, G; Torres, S; Escobar, H. 2003. Evaluación del efecto nematocida de cepas de *Bacillus* spp. Fitosanidad. No. 7:55-58.

Mathivanan, N; Prbavathy,V.R.; Murugesan, K. 2004. Biocontrol potential of microorganisms: focus on *Trichoderma* as biofungicide for the management of plant diseases. In: Mayee CD, Manoharachary C, Tilak KVBR, Mukadam KS, Deshpande J (Eds). Biotechnological approaches for the integrated management of crop diseases. Daya, Delhi. P. 88-109.

Meyer, S.L.F; Johnson, G; Dimock, M; Fahey, J.W; Huettel, R.N. 1997. Field Efficacy of *Verticillium lecanii*, Sex Pheromone, and Pheromone Analogs as Potential Management Agents for Soybean Cyst Nematode. Journal of Nematology. 29(3):282-288.

Moens, M; Perry, R. 2009. Migratory plant endoparasitic nematodes: a group rich in contrasts and divergence. Annual Review of Phytopatology. No. 47:313-332.

Morales, F; Araya, C; Hernández, J; Arroyave, J; Cuervo, M; Velasco, A; Castaño, M. 1999. Etiología del “amachamiento” del frijol común en Costa Rica. Manejo Integrado de Plagas. No. 52:42-48.

Mukhtar, T; Arshad, M; Zameer, M. 2013. Biocontrol potential of *Pasteuria penetrans*, *Pochonia chlamydosporia*, *Paecilomyces lilacinus* and *Trichoderma harzianum* against *Meloidogyne incognita* in okra. Phytopathologia Mediterranea. 52(1):66-76.

Navarro, F; Vilchis, K; Miranda, J. 2009. New records of *Pochonia chlamydosporia* from Mexico: isolation, root colonization and parasitism of *Nacobbus Aberrans* eggs. Nematropica. 39(1):133-142.

Ndjonka, D.; Nakamura, L.; Silber, A.M.; Liebau, E.; Wrenger, C. 2013. Natural Products as a Source for Treating Neglected Parasitic Diseases. International Journal of Molecular Sciences. No. 14:3395-3439.

Nguyen, N; Kim, Y-J; Oh, K-T; Jung, W-J; Park, R-D. 2007. The role of chitinase from *Lecanicillium antillanum* B-3 in parasitism to root-knot nematode *Meloidogyne incognita* eggs. Biocontrol Science & Technology. 17(10):1047-1058.

Nordbring-Hertz, B; Chet, I. 1983. Fungal lectins and agglutinins, *Microbial Lectins and Agglutinins: Properties and Biological Activity*, D. Mirelman. John Wiley & Sons, New York. p. 393-408.

Nordbring-Hertz, B; Mattiasson, B. 1979. Action of a nematode-trapping fungus shows lectin-mediated host-microorganism interaction. *Nature (London)*. No. 281:477-479.

Ocampo, R. 1994. Estudios etno-botánico de las palmas empleadas por indígenas en Talamanca, Costa Rica. *Revista Forestal (CR)*. No. 7:1-6.

Ocampo, S; Díaz, R. 2006. Cultivo, conservación e industrialización del Hombre Grande (*Quassia amara*). San José, Costa Rica. S.e. 72 p.

Orozco, M; Álvarez, V; Jiménez, A; Acuña, O. 2009. Evaluación *in vitro* de hongos nematófagos para el control biológico de nematodos gastrointestinales de rumiantes. *Revista MVZ Córdoba*. 14(3):1820-1830.

Osei, K; Sackey-Asante, J. 2006. Frequency of the white tip nematode, *Aphelenchoides besseyi*, in Ghana and its management white botanicals. *Nematología Mediterránea*. No. 34:171-174.

Passreiter, C; Wendisch, D; Gondol, D. 1995. Sesquiterpene lactones from *Neurolaena lobata*. *Phytochemistry*. No. 39:133-137.

Pathakm, K; Kumar, B. 1995. Nematotoxic effects of *Trichoderma harzianum* culture filtrate on second stage juveniles of rice root knot nematode. *Indian Journal of Nematology*. No. 2:223-224.

Peraza, W. 2012. Aislamiento, identificación y pruebas *in vitro* de hongos nematófagos para el combate del nematodo agallador *Meloidogyne* sp. (Goeldi 1892) de zonas arroceras de Costa Rica. Tesis presentada para obtener el grado de Magister Scientiae en Agricultura Alternativa con énfasis en Agricultura Ecológica. Heredia, Costa Rica. Universidad Nacional de Costa Rica. 133 p.

Peraza, W; Orozco, M; Esquivel, A; Rivera, G; Chaverri, F. 2011. Aislamiento e identificación de hongos nematófagos nativos de zonas arroceras de Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*. 22(2):233-243.

Pérez, D; Pérez, N; Acosta, N; Gandarilla, H; Pérez, A; Rodríguez, R; Basterrechea, M; Fernández, E; Stefanova, M; Robaina, N; Olivares, N; Santana, T; González, M; Lluvides, J; Devesa, L; Gutiérrez, E; Andreu, C. 2006. *Trichoderma*, alternativa para el control biológico de nematodos dentro de una agricultura sostenible. *Fitosanidad*. 10(2):165.

Proyecto Red SICTA. 2008. Guía de campo para la identificación y manejo integrado de enfermedades del frijol en América Central. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 32 p.

Proyecto Red SICTA. 2014. Cadenas de valor de maíz blanco y frijol en Centroamérica: actores, problemas y acciones para su competitividad. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 127 p.

Ramakrishnan, S; Rajendran, G. 2002. Management of rice nematodes through *Pseudomonas fluorescens*. In Proceedings of National Symposium on Biodiversity and Management of Nematodes in Cropping Systems for Sustainable Agriculture, Jaipur, India, 11-13 November, 2002. p. 144-147.

Ramírez, M; García, B; Rodríguez, H; Morales, H; Castro, R. 2001. Evaluación del efecto de insecticidas de extractos de plantas sobre *Leptophobia aripa* Elodia. Manejo integrado de plagas (Costa Rica). No. 60:50-56.

Renčo, M; Sasanelli, N; Maistrello, L. 2014. Plants as natural sources of nematicides. In: "Nematodes: Comparative Genomics, Disease Management and Ecological Importance. NOVA Science publisher, New York. 120 p.

Rodríguez, C; Lagunes, A. 1992. Plantas con propiedades insecticidas; resultados de pruebas experimentales en laboratorio, campo y granos almacenados. *Agroproductividad*. No. 1:17-25.

Rodríguez, H.; Blanco, F. 1992. Uso de cuatro extractos orgánicos para el control del pulgón verde (*Myzus persicae* Sulz.). *Uniciencia*. No. 9:51-55.

Rodríguez, L. 2004. El proyecto "Campaña educativa para incrementar el consumo de frijoles". *Agronomía Mesoamericana*. No. 15:245-261.

- Rodríguez, L; Dumani, M. 2000. Campaña educativa con respecto al consumo de frijoles. *In* PITTA-FRIJOL ed. IV taller Anual de Resultados de Investigación y Transferencia de Tecnología del PITTA-FRIJOL. San José, Costa Rica. p. 35-41.
- Saeed, M; Roessner, J. 1984. Anhydrobiosis in five species of plant associated nematodes. *Journal of Nematology*. 16(2):119-124.
- Sagüés, F; Purslowc, P; Fernández, S; Fuséa, L; Iglesias, L; Saumell, C. 2011. Hongos nematófagos utilizados para el control biológico de nematodos gastrointestinales en el ganado y sus formas de administración. *Revista Iberoamericana de Micología*. 28(4):143-147.
- Sahebani, N; Hadavi, N. 2008. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Soil Biology & Chemistry*. No. 40:2016-2020.
- Salas, L.; Vargas, E. 1984. El nematodo foliar *Aphelenchoides besseyi* Christie (Nematoda: Aphelenchoididae) como agente causante de la falsa mancha angular del frijol en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*. No. 8:65-68.
- Salazar, J. 1999. Situación actual y perspectivas de la producción de frijol en Costa Rica. *In* PITTA-FRIJOL ed. III Taller Anual de Resultados de Investigación y Transferencia en Tecnología del PITTA-FRIJOL. Alajuela, Costa Rica. Universidad Nacional. p. 11-18.
- Salazar, W; Guzmán, T. 2014. Efecto nematocida de extractos de *Quassia amara* y *Brugmansia suaveolens* sobre *Meloidogyne* sp. asociado al tomate en Nicaragua. *Agronomía Mesoamericana*. 25(1):111-119.
- Samson, RA; Evans, HC; Latge, JP. 1988. Atlas of Entomophatogenic Fungi. Springer Verlag. Berlín. 187 p.
- Sarker, S; Latif, Z; Gray, A. 2005. Natural Products Isolation. 2da edición. USA. Humana Press Inc. 529 p.
- Shahwar, D; Abid, M; Rehman, A. U.; Maqbool, M.A.; Choudhary, M.I. 1995. Nematicidal compounds from *Datura fastuosa*. *En: 19th IUPAC Symposium on the chemistry of Natural Products*. Res. Inst. of Chemistry, University of Karachi, Karachi 75270- Pakistan. p. 171-179.

- Sharon, E; Bar-Eyal, I; Chet, I; Herrera, A; Kleifeld, O; Spiegel, Y. 2001. Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*. No. 91:687-693.
- Stirling, G. 1991. Biological control of plant parasitic nematodes. Wallingford. UK: CAB International. 282 p.
- Su, H; Hao, Y; Mo, M; Zhang, K. 2007. The ecology of nematode trapping hyphomycetes in cattle dung from three plateau pastures. *Veterinary parasitology*. No. 144:293-298.
- Suárez, B; Rey, M; Castillo, P; Monte, E; Llobell, A. 2004. Isolation and characterization of PRA1, a trypsin-like protease from the biocontrol agent *Trichoderma harzianum* CECT 2413 displaying nematocidal activity. *Applied Microbiology Biotechnology*. No. 65:46-55.
- Tanada, Y; Kaya, HK. 1993. *Insect Pathology*. Academic Press, Inc. USA. 665 p.
- Thoden, T; Boppré, M; Hallmann, J. 2007. Pyrrolizidine alkaloids of *Chromolaena odorata* act as nematocidal agents and reduce infection of lettuce roots by *Meloidogyne incognita*. *Nematology*. 9(3):343-349.
- Thoden, T; Boppré, M; Hallmann, J. 2009. Effects of pyrrolizidine alkaloids on the performance of plant-parasitic and free-living nematodes. *Pest Management Science*. No. 65:823-830.
- Tsay, T.T; Wu, S.T; Lin, Y.Y. 2004. Evaluation of Asteraceae plants for control of *Meloidogyne incognita*. *Journal of Nematology*. 36(1):36-41.
- Tzeng, C; Lin, Y. 2005. The intraspecific variation of *Aphelenchoides besseyi* populations in Taiwan. *Plant Pathology Bulletin*. 14(1):67-75.
- Veltcheva, M; Svetleva, D. 2005. *In vitro* regeneration of *Phaseolus vulgaris* L. via organogenesis from petiole explants. *Journal Central European Agriculture*. 1(6):53-58.
- Vergara, AD; Guzmán, O; Leguizamón, J. 2012. Efecto *in vitro* de *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Luangsaard *et al.* y *Pochonia chlamydosporia* (Goddard) Zare y Gams sobre el nematodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorne. *Agronomía*. 20(2):25-36.

Vilchis, K. 2011. Compatibilidad del hongo *Pochonia chlamydosporia* y extractos vegetales para el manejo integrado de *Meloidogyne incognita* en frijol. Tesis presentada para obtener el grado de Magister Scientiae en Manejo Agroecológico de Plagas y Enfermedades. Yautepec, Morelos, México. Instituto Politécnico Nacional. 88 p.

Villalobos, R. 1995. Distribución de *Quassia amara* L. ex Blom en Costa Rica, y su relación con los contenidos de cuasina y neocuasina (insecticidas naturales) en sus tejidos. Tesis presentada para obtener el grado de Magister Scientiae en Ciencias Agrícolas y Recursos naturales. Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 174 p.

Volcy, C; Pardo, V. 1994. Principios de micología. Centro de publicaciones Universidad Nacional de Colombia. Sede Medellín. Edición 19. 141 p.

Yang, J; Li, J; Liang, L; Tian, B; Zhang, Y; Cheng, C; Zhang, Ke. 2007. Cloning and characterization of an extracellular serine protease from the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys conoides*. Archives of Microbiology. 188(2):167-174.

Yen, Y; Yeh, M; Hsiao, W. 2007. Synthesis and nematocidal activity of ascaridole derivatives against *Meloidogyne incognita* and *Aphelenchoides besseyi*. Journal of Pesticide Science. 32(1):49-52.

Zaki, F. 1994. Effect of culture filtrates of *Paecilomyces lilacinus* on *Meloidogyne javanica*. Nematología Mediterránea. No. 22:41-43.

ANEXOS

Anexo 1. Procedimiento para reactivar hongos preservados en aceite mineral

- a) Se toma el vial que contiene el hongo y bajo la cámara de flujo laminar se extrae completamente el aceite mineral.
- b) Se cortan pequeños fragmentos de la colonia y se depositan sobre papel toalla estéril con la finalidad de reducir la mayor cantidad posible de aceite.
- c) Los fragmentos de la colonia se cultivan por triplicado sobre una placa Petri con PDA acidificado y se almacenan durante dos semanas a temperatura ambiente y luz natural para favorecer la esporulación.

Anexo 2. Procedimiento para incrementar hongos en arroz como sustrato

- a) En bolsas de polipropileno se coloca 200 g de arroz 90% grano entero y se agrega 90 mL de agua destilada, se sellan las bolsas y se autoclavan a 121 C y 21 libras de presión por un periodo de 15 minutos.
- b) Se toma un cultivo puro y esporulado del hongo de siete días de edad, y se prepara una suspensión de conidios en agua destilada estéril.
- c) De la suspensión de conidios se toma una alícuota de 15 mL con una jeringa estéril, la cual se inoculara en las bolsas de polipropileno con arroz previamente esterilizadas.
- d) Se identifican las bolsas y se incuban durante cuatro días en oscuridad, posteriormente se pasan a luz natural para facilitar la esporulación del hongo.

Anexo 3. Procedimiento empleado para la prueba de viabilidad de esporas

- a) Sobre un portaobjetos esterilizado, se vierten dos alícuotas de medio agar-agua previamente esterilizado.
- b) Una vez solidificado el medio se deposita sobre este 25 μ L de la suspensión de conidios del hongo a probar, la cual se esparce con una barra de vidrio esterilizada.
- c) El portaobjetos se coloca dentro de una cámara húmeda estéril, conformada por una placa Petri con papel absorbente al fondo, humedecido con agua destilada y dos

mondadientes como soporte para el portaobjetos, todos los componentes previamente esterilizados.

- d) La placa Petri con el portaobjetos se almacena a temperatura ambiente y luz natural, por un periodo de 24 h.
- e) Transcurrido el periodo se procede a evaluar la germinación de las esporas. Se consideran germinadas aquellas que desarrollan un tubo germinativo igual o mayor al diámetro de la espora.

Anexo 4. Procedimiento empleado para el conteo de conidios

- a) Se toma 1 g de arroz con crecimiento del hongo y se deposita en un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada estéril, a partir del cual se realizan diluciones seriadas hasta 10^{-6} .
- b) Se realiza el conteo de conidios empleando un hematocímetro con un rayado Neubauer, utilizando la dilución apropiada para dicho objetivo.
- c) Una vez definida la dilución apropiada, se toma el tubo correspondiente a la dilución y se agita en un vortex durante 30 segundos e inmediatamente se toma una alícuota con una micropipeta, y se deposita en la cámara de conteo.
- d) Con ayuda de un microscopio se realiza el conteo de conidios según la metodología propuesta por French y Herbert (1980).
- e) Una vez efectuadas las lecturas se calcula la concentración de esporas, para lo cual se multiplica el promedio del número de esporas obtenido por el inverso de la dilución empleada para el conteo por el inverso del factor de la cámara, siguiendo la siguiente fórmula:

$$C = N \times De \times Fe$$

Donde:

C = Concentración inicial (conidios / mL)

N= Número promedio de conidios por cuadrante

De = Dilución empleada

Fe = Factor de la cámara

Anexo 5. Extracción de nematodos por medio de la técnica de Baerman modificado (CIAT 1982)

- a) Se homogeniza la muestra de follaje y se pesan 10 g los cuales se pican en 2 mm² aproximadamente.
- b) El follaje se coloca en un beaker y se adiciona 250 mL de agua destilada, se deja reposar por dos horas a temperatura ambiente.
- c) Se vierte la suspensión en cribas de 100 y 400 mesh simultáneamente y se realizan lavados con agua a presión por un periodo de 2 min aproximadamente.
- d) Se recoge el residuo de la criba de 400 mesh y se coloca en un beaker.
- e) Para muestras con mucha suciedad, se coloca el residuo de la criba de 400 mesh en un tubo de ensayo plástico de 50 mL y se centrifuga por 3 min a 3000 rpm.
- f) Se elimina el sobrenadante y se vierte sobre el tubo una solución de azúcar; se vuelve a centrifugar por 3 min a 3000 rpm.
- g) Se vierte el sobrenadante en una criba de 500 mesh y se lava el exceso de azúcar.
- h) Con ayuda de una pizeta con agua destilada, se colecta el residuo de la criba de 500 mesh y se coloca en un beaker.

Anexo 6. Comparación de los tratamientos según severidad del amachamiento.

Contrastes	Evaluación 1		Evaluación 2		Evaluación 3	
	Diferencia relativa ± error estándar	Pr>ChiSq	Diferencia relativa ± error estándar	Pr>ChiSq	Diferencia relativa ± error estándar	Pr>ChiSq
<i>Arthrobotrys</i> sp. vrs <i>Brugmansia</i> sp.	0,28 ± 0,21	0,0943	1,05 ± 0,65	0,9430	0,87 ± 0,50	0,8062
<i>Arthrobotrys</i> sp. vrs <i>Lecanicillium</i> sp.	1,08 ± 0,69	0,8993	1,14 ± 0,65	0,8226	1,71 ± 0,96	0,3365
<i>Arthrobotrys</i> sp. vrs <i>N. lobata</i>	0,59 ± 0,41	0,4468	1,46 ± 0,86	0,5145	1,37 ± 0,76	0,5750
<i>Arthrobotrys</i> sp. vrs <i>P. lilacinus</i>	0,08 ± 0,09	0,0262	1,00 ± 0,58	1,0000	1,33 ± 0,76	0,6197
<i>Arthrobotrys</i> sp. vrs <i>P. chlamydosporia</i>	0,08 ± 0,09	0,0262	1,84 ± 1,06	0,2852	2,40 ± 1,38	0,1290
<i>Arthrobotrys</i> sp. vrs <i>Trichoderma</i> sp.	0,82 ± 0,53	0,7550	0,79 ± 0,50	0,7073	0,78 ± 0,46	0,6686
<i>Brugmansia</i> sp. vrs <i>Lecanicillium</i> sp.	3,93 ± 3,03	0,0769	1,09 ± 0,66	0,8900	1,98 ± 1,14	0,2390
<i>Brugmansia</i> sp. vrs <i>N. lobata</i>	2,15 ± 1,75	0,3490	1,40 ± 0,87	0,5872	1,57 ± 0,90	0,4288
<i>Brugmansia</i> sp. vrs <i>P. lilacinus</i>	0,30 ± 0,36	0,3170	0,96 ± 0,59	0,9430	1,53 ± 0,90	0,4693
<i>Brugmansia</i> sp. vrs <i>P. chlamydosporia</i>	0,30 ± 0,36	0,3170	1,76 ± 1,08	0,3514	2,76 ± 1,64	0,0866
<i>Brugmansia</i> sp. vrs <i>Trichoderma</i> sp.	2,96 ± 2,30	0,1627	0,76 ± 0,50	0,6724	0,90 ± 0,54	0,8568
<i>Lecanicillium</i> sp. vrs <i>N. lobata</i>	0,55 ± 0,39	0,3829	1,29 ± 0,74	0,6615	0,80 ± 0,44	0,6813
<i>Lecanicillium</i> sp. vrs <i>P. lilacinus</i>	0,08 ± 0,09	0,0220	0,88 ± 0,50	0,8226	0,78 ± 0,44	0,6526
<i>Lecanicillium</i> sp. vrs <i>P. chlamydosporia</i>	0,08 ± 0,09	0,0220	1,62 ± 0,92	0,3918	1,40 ± 0,80	0,5584
<i>Lecanicillium</i> sp. vrs <i>Trichoderma</i> sp.	0,75 ± 0,49	0,6641	0,69 ± 0,43	0,5580	0,45 ± 0,27	0,1779
<i>N. lobata</i> vrs <i>P. lilacinus</i>	0,14 ± 0,16	0,0878	0,69 ± 0,40	0,5145	0,97 ± 0,55	0,9598
<i>N. lobata</i> vrs <i>P. chlamydosporia</i>	0,14 ± 0,16	0,0878	1,26 ± 0,72	0,6883	1,76 ± 1,00	0,3222
<i>N. lobata</i> vrs <i>Trichoderma</i> sp.	1,38 ± 0,96	0,6439	0,54 ± 0,34	0,3299	0,57 ± 0,33	0,3330
<i>P. lilacinus</i> vrs <i>P. chlamydosporia</i>	1,00 ± 1,45	1,0000	1,84 ± 1,06	0,2852	1,80 ± 1,05	0,3098
<i>P. lilacinus</i> vrs <i>Trichoderma</i> sp.	9,86 ± 11,09	0,0420	0,79 ± 0,50	0,7073	0,59 ± 0,35	0,3700
<i>P. chlamydosporia</i> vrs <i>Trichoderma</i> sp.	9,86 ± 11,09	0,0420	0,43 ± 0,27	0,1732	0,32 ± 0,20	0,0616
Probabilidad	<0,0001		0,0772		0,0421	

