

**Evaluación in vitro de hongos nematófagos contra el nematodo barrenador
Radopholus similis (Cobb, 1893) Thorne, 1949 en Costa Rica**

**In vitro evaluation of nematophagous fungi against the boring nematode *Radopholus
similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949 in Costa Rica**



Environment & Technology | ISSN: 2711-4422

Vol. 5 No. 1. Enero-Julio, 2024: 28-48

URL: <https://revistaet.environmenttechnologyfoundation.org/>

DOI: <https://doi.org/10.56205/ret.5-1.2>

Recibido: 09/12/2023

Revisado: 12 /05/2024

Aprobado: 12 /06/2024

Berlioth Ugalde Monge
Licenciada en Agricultura Alternativa
Servicio Fitosanitario del Estado (SFE). San José
berlioth.ugalde.monge@est.una.ac.cr
<https://orcid.org/0000-0002-7481-7561>
Costa Rica

Roy Artavia-Carmona
Licenciado en Agricultura Alternativa
Universidad Nacional, Escuela de Ciencias Agrarias
Laboratorio de Nematología, Heredia
roy.artavia.carmona@una.cr
<https://orcid.org/0000-0003-0906-5444>
Costa Rica

Alejandro Vargas Martínez
Maestría en Estadística Aplicada
Universidad Nacional. Escuela de Ciencias Agrarias. Heredia
alejandro.vargas.martinez@una.ac.cr
<http://orcid.org/0000-0001-8039-8984>
Costa Rica

Walter Peraza-Padilla
Maestría en Agricultura Alternativa
Universidad Nacional. Escuela de Ciencias Agrarias
Laboratorio de Nematología, Heredia
walter.peraza.padilla@una.cr
<https://orcid.org/0000-0003-4651-5555>
Costa Rica

Resumen

El objetivo fue evaluar la capacidad nematocida *in vitro* de hongos nematófagos (HN) de plantaciones de banano de la región Huetar Atlántica contra el nematodo *Radopholus similis*. Previamente identificados los HN, se utilizaron varios aislamientos para evaluar su patogenicidad contra *R. similis*. Estos incluyeron dos aislamientos de *Fusarium oxysporum* (Fox2 y Fox3), dos de *Trichoderma asperellum* (Trich1 y Trich3) y uno de *Purpureocillium lilacinum* (Pli). Se realizó una suspensión y conteo de esporas de cada hongo para determinar la concentración de conidios (UFC/ml) a inocular. Posteriormente se depositó por plato 0,5 ml de una suspensión que contenía 60 adultos y juveniles de *R. similis* y se realizó el conteo de nematodos a las 24h y 42h y se verificó la capacidad depredadora de cada aislamiento. Se realizó un análisis estadístico ANOVA y comparaciones de medias con el programa estadístico InfoStat para evaluar el efecto de los tratamientos en la mortalidad de *R. similis*. A las 24 horas después de la inoculación, no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos, con un promedio de mortalidad del 15-30%. Sin embargo, a las 42 horas, se identificaron diferencias significativas en la capacidad antagonista de los aislamientos Trich3, Fox3, Fox2 y Trich1, con porcentajes de mortalidad del 53.3%, 41.6%, 37.9% y 37.7% respectivamente. El aislamiento Pli (25.8%) no mostró diferencias significativas en comparación con el control (Tx1). Los aislamientos de *T. asperellum* y *F. oxysporum* poseen una alta capacidad nematófaga contra *R. similis* con potencial para ser utilizados como agentes de control biológico.

Palabras clave: Nematodo barrenador; control biológico; patogenicidad; antagonismo, mortalidad

Abstract

The objective was to evaluate the *in vitro* nematocidal capacity of nematophagous fungi (HN) from banana plantations in the Huetar Atlantic Region against the nematode *Radopholus similis*. Once HN were previously identified, several isolates were used to evaluate their pathogenicity against *R. similis*. These included two isolates of *Fusarium oxysporum* (Fox2 and Fox3), two of *Trichoderma asperellum* (Trich1 and Trich3), and one of *Purpureocillium lilacinum* (Pli). A suspension and spore count of each fungus was carried out to determine the concentration of conidia (CFU/ml) to inoculate. Subsequently, 0.5 ml of a suspension containing 60 adults and juveniles of *R. similis* was deposited per plate and the nematodes were counted at 24 and 42 hours and the predatory capacity of each isolate was verified. An ANOVA statistical analysis and comparisons of means were performed with the InfoStat statistical program to evaluate the effect of the treatments on the mortality of *R. similis*. At 24 hours after inoculation, no significant differences were observed between treatments, with an average mortality of 15-30%. However, at 42 hours, significant differences were identified in the antagonistic capacity of the Trich3, Fox3, Fox2 and Trich1 isolates, with mortality percentages of 53.3%, 41.6%, 37.9% and 37.7% respectively. The Pli isolate (25.8%) did not show significant differences compared to the control (Tx1). The isolates of *T. asperellum* and *F. oxysporum* have a high nematophagous capacity against the *R. similis* with the potential to be used as biological control agents.

Keywords: Borer nematode; biologic control; pathogenicity; antagonism, mortality

Introducción


El banano (*Musa paradisiaca*) es una planta procedente del Sudeste Asiático que se cultiva desde hace aproximadamente 10 000 años (UNCTAD, 2013). Esta herbácea gigante, perteneciente a la clase de las monocotiledóneas y a la familia de las musáceas, crece en los trópicos y por sus propiedades nutritivas, se posiciona entre los principales alimentos y frutas cultivadas en muchas partes del mundo (Vargas-Céspedes *et al.*, 2017).

El fruto de esta musácea representa un alimento esencial para más de 400 millones de personas a nivel mundial (Dita *et al.*, 2010). Se estima que las exportaciones mundiales de banano alcanzaron los 20,2 millones de toneladas en 2019 (FAO, 2020). Los mayores exportadores de banano a nivel mundial fueron Ecuador y Filipinas, seguido por países de América Latina y el Caribe (Guatemala, Costa Rica, Panamá y República Dominicana) (Zhiminaicela-Cabrera *et al.*, 2020).

El cultivo de banano en Costa Rica posee una importante participación en el sector agropecuario, con un valor de exportaciones de \$ 997 550 000 USD al 2019. Estos datos colocan a esta fruta en el primer lugar en términos de valor de las exportaciones del sector, lo que representó aproximadamente un 35,8% de la participación total en esta actividad. Además, durante este año, se produjeron aproximadamente 2 183 158 toneladas métricas de banano (Castillo-Benavides, 2021). Esta actividad se desarrolla en Costa Rica principalmente en la región Huetar Atlántica del país (Barraza *et al.*, 2020).

En la actualidad, la superficie de exportación de esta fruta en Costa Rica abarca alrededor de 42,066 hectáreas. Las áreas principales de cultivo de banano se encuentran distribuidas en varios cantones, destacando Limón centro, Talamanca, Matina, Guácimo, Sarapiquí, Siquirres y Pococí. Estos representan más del 97% de las hectáreas de banano cultivadas en el país (Mata-Martínez, 2021).

Al ser el banano un monocultivo, es propenso a la incidencia de enfermedades y plagas, entre estas últimas, los nematodos fitoparásitos. En plantaciones con varios años de establecidas, es común encontrar comunidades poliespecíficas de nematodos (Gowen, Quénéhervé & Fogain, 2005). De acuerdo con las frecuencias y densidades poblacionales,




durante el año y en las zonas productoras de plátano y banano de cada país, *R. similis* es el más abundante y la principal especie fitoparásita, constituyendo entre el 82 y 97% de la población de nematodos en raíces y cormos (Guzmán-Piedrahita, 2011; Holguín-Quispe, 2018).

En plantas infectadas con *R. similis*, los primeros síntomas son evidentes cuando se observan lesiones en forma de estrías que rodean completamente las raíces. Estas heridas destruyen todas las raíces y a medida que la lesión aumenta, se forman cavidades en la corteza que facilitan la entrada de otros microorganismos secundarios, como hongos, bacterias saprofitas o fitopatógenas. La presencia de estos microorganismos puede causar la muerte de la planta (Rendón-Restrepo, 2020).

Tradicionalmente el control de nematodos fitoparásitos se realiza mediante el uso de nematicidas químicos de los grupos organofosforados y carbamatos los cuales han sido clasificados como plaguicidas altamente peligrosos por su alta toxicidad (SFE, 2020). Estos productos químicos provocan efectos ambientales negativos y la eliminación de organismos no blanco como nematodos de vida libre (Arboleda, Guzmán y Mejía, 2012), los cuales juegan un papel esencial en los ecosistemas al descomponer materia orgánica, reciclar nutrientes y regular poblaciones microbianas. La creciente preocupación por reducir el uso de agroquímicos impulsa el desarrollo de tecnologías que facilitan la obtención de productos a partir de microorganismos, tanto en términos de calidad como de cantidad, para la aplicación en áreas de cultivo (Burges, 2007).

La implementación de alternativas no químicas representa un desafío en el desarrollo de estrategias para combatir plagas y enfermedades (Kerry, 2001). Dentro del amplio grupo de organismos que pueden ser utilizados se encuentran los hongos nematófagos (HN), los cuales han sido ampliamente estudiados y son los más importantes en la regulación de poblaciones de nematodos (Chen & Dickson, 2004). Los HN poseen la capacidad para capturar, atacar, matar y destruir nematodos en todos sus estadios, dependiendo de la especie y el género (Fernández-Jiménez *et al.*, 2019). La forma de captura de estos hongos es mediante órganos especializados como redes, botones y conidios adhesivos, además, algunos poseen anillos constrictores o simples (Ocampo-Gutiérrez, 2021).



La mayoría de estos hongos pueden sobrevivir como saprófitos, atacar a otros hongos (micoparásitos), colonizar raíces de plantas o ser producidos en laboratorio en medios nutritivos (Bojanich, 2019). Costa Rica posee gran potencial para utilizar los HN como medio de control biológico, debido a su diversidad y amplia distribución geográfica que incluye ecosistemas naturales y agrícolas (Varela-Benavides *et al.*, 2017). Por este motivo, la siguiente investigación tuvo como objetivo la evaluación del potencial nematicida *in vitro* de cinco hongos aislados de fincas bananeras de la Región Huetar Atlántica de Costa Rica contra una población del nematodo barrenador *Radopholus similis*.

Metodología

Sitios de muestreo


Durante junio a agosto de 2021, se llevaron a cabo giras de prospección para la recolectar muestras de suelo. El muestreo se realizó de manera aleatoria tomando 25 submuestras por hectárea en seis fincas bananeras en los cantones de Limón, Pococí, Siquirres y Talamanca todas pertenecientes a la región Huetar Atlántica.

Las muestras de suelo se recolectaron con un barreno y luego se cuarteó hasta obtener aproximadamente 1 kg de muestra. Las muestras se guardaron en bolsas plásticas y se etiquetaron con la fecha, el lugar de recolección y las coordenadas geográficas correspondientes. Posteriormente, cada muestra se trasladó en un contenedor térmico al Laboratorio de Nematología de la Universidad Nacional para su procesamiento y análisis.

Aislamiento, purificación e identificación de hongos antagonistas

El aislamiento de HN en las muestras de suelo se llevó a cabo utilizando el método de “espolvoreado en placa” descrito por Barrón (1977). Para cada muestra recolectada, se extrajo entre 0,5 a 1,0 g de suelo, el cual se dispuso en platos Petri con agar-agua (AA) de 10 cm de diámetro. Este procedimiento se realizó con un total de 5 repeticiones por cada localidad muestreada. Posteriormente se incubó cada caja Petri a temperatura ambiente (17-27°C) a luz natural durante una semana.

Después de observar la presencia de estructuras como hifas, conidios o esporas, se procedió al aislamiento con la ayuda de un pincel delgado con un cabello fino unido al




extremo anterior que permitió sujetar dichas estructuras. Luego, cada estructura encontrada se colocó en platos Petri con medio papa dextrosa agar (PDA) con ácido láctico al 25% (p/v) que evitó la presencia de bacterias y favoreció el crecimiento micelial (Sánchez-Miranda *et al.*, 2021).

Después de una semana, se observó el crecimiento de los hongos y se llevó a cabo la fase de purificación y replicación mediante tres repeticiones en platos Petri con PDA y antibiótico hasta obtener cultivos puros. Posteriormente mediante la técnica de cultivos monospóricos descrita por Cañedo y Ames (2004), se establecieron tres repeticiones de cultivos monospóricos para cada aislamiento. Para conservar cada hongo aislado se utilizó el “método de conservación en aceite mineral estéril”, descrito por Little y Gordon (1967), y modificado por Deshmukh (2003). Los hongos se conservaron en viales de 7 cm alto x 1.6 cm de ancho con capacidad para 25 ml con PDA y aceite mineral a una temperatura de 4°C, lo cual redujo su tasa metabólica para preservar su viabilidad a largo plazo.

La identificación morfológica se realizó con las claves de Cooke y Godfrey (1964) y Barnett y Hunter (1998). Se realizó un montaje de las estructuras fúngicas para cada uno de los hongos aislados. Se utilizó un microscopio Nikon eclipse 80i y se observó cada hongo a una ampliación de 100x. Se comparó la morfología observada con las características descritas en las claves mencionadas anteriormente, con el fin de lograr la identificación cada hongo.

Para la identificación molecular de los hongos, se realizó la extracción de ADN mediante la metodología de Hoyos-Carvajal *et al.* (2008), con algunas modificaciones y se efectuaron pruebas de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) para la amplificar de distintas regiones del genoma (ITS, TEF1 α , 1-alfa, rpb2 y β -tubulina). Los productos de PCR se evaluaron por electroforesis en geles de agarosa TopVision al 1% teñidos con GelRed 1X y se visualizaron bajo a luz UV. Posteriormente, fueron enviados a Macrogen Inc. en Corea del Sur, para su purificación y secuenciación en ambas direcciones mediante el método Sanger (Sanger *et al.*, 1977).

Una vez obtenidos estos resultados, se construyeron secuencias consenso y se editaron utilizando el programa BioEdit Sequence Alignment Editor versión 7.2.5, a partir de las dos hebras (*forward* y *reverse*) con respecto al electroferograma obtenido. Finalmente, se



compararon las secuencias de ADN obtenidas con accesiones reportadas en el GenBank® por medio de la herramienta BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para la identificación de especies.


Reproducción de *R. similis* en discos de zanahoria

Para obtener el inóculo del nematodo, se utilizó la metodología descrita por O'Bannon y Taylor (1968) y Moody *et al.* (1973), se llevó a cabo en el Laboratorio de Nematología de la UNA. Para la reproducción de la población de *R. similis* en cultivo monoxénico, se utilizaron zanahorias frescas y sanas. Las zanahorias se desinfectaron previamente utilizando detergente líquido para eliminar cualquier contaminante externo. Luego, se dejaron sumergidas 15 minutos en una solución que contenía 2 L de agua destilada y 400 mL de cloro al 3%. Transcurrido ese tiempo, se lavaron con agua destilada y se llevaron a una cámara de flujo laminar previamente desinfectada donde se flamearon con alcohol al 95%. Luego, se eliminó la cáscara de la zanahoria y se cortó en discos de 4 cm de diámetro por 0.5 cm ancho.

En total se cortaron 10 discos que fueron transferidos con pinzas previamente esterilizadas a platos Petri de 6 cm de diámetro y se sellaron con papel Parafilm®. Durante tres días se observó cada plato Petri para descartar alguna contaminación. Posteriormente, se procedió a inocular en cada uno de ellos de una suspensión de 75 µl de agua destilada que contenía aproximadamente 100 nematodos. Los platos Petri fueron rotulados y sellados nuevamente con papel Parafilm® y se almacenaron en una incubadora en oscuridad a una temperatura de 27 °C. Dos meses después de la inoculación, se observó la reproducción de los nematodos en los discos de zanahoria.

Pruebas de antagonismo *in vitro*

Se utilizaron cinco HN previamente identificados morfológica y molecularmente para las pruebas *in vitro* los cuales se encontraban en medio papa dextrosa agar (PDA). Después se preparó una suspensión de esporas de cada hongo, rozando con un asa bacteriológica la superficie del medio de cultivo junto con el hongo. Posteriormente, se realizó el conteo de esporas en un hemocitómetro y se determinó la concentración de conidios (UFC/ml) a



colocar por plato Petri. Las pruebas de antagonismo se realizaron en el Laboratorio de Nematología de la Escuela de Ciencias Agrarias de la UNA.

Para determinar el potencial biocontrolador de los hongos seleccionados se utilizaron cajas Petri de 6 cm para cada hongo. Cada caja contenía 8 ml de AA (20g/L). Además, se adicionó una cantidad anteriormente definida de UFC (1×10^6) para cada aislamiento. Los platos Petri se incubaron entre 17 a 27°C y luz natural durante cuatro días. Posteriormente, se realizó el lavado con agua destilada de los discos de zanahoria que contenían los nematodos; el objetivo era obtener la máxima cantidad posible de nematodos.

Luego se llevaron a cabo los conteos, se realizaron diluciones y se obtuvo la cantidad requerida de nematodos por alícuota. Se depositó por plato 0,5 ml de una suspensión con 60 individuos (hembras, machos y juveniles) de la especie *R. similis*. Las cajas se incubaron en las condiciones de luz y temperatura descritas anteriormente y por último se realizó el conteo de nematodos a las 24h y 42h y se verificó la capacidad antagónica de cada aislamiento. Se llevó a cabo la observación y verificación de la capacidad de movimiento de los nematodos. En los casos en que no se evidenció actividad de desplazamiento, se utilizó un pescador de nematodos para comprobar su estado, es decir, si estaban vivos o muertos.

Diseño experimental

La unidad experimental correspondió a la misma que la unidad observacional, que consistió en una placa Petri con agar agua que contenía una suspensión de 0.5 ml de nematodos. La estructura de tratamiento fue bifactorial con interacción, donde el primer factor fueron los hongos nematófagos con cinco niveles correspondientes a los aislamientos y el segundo factor fueron las evaluaciones con 2 niveles correspondientes a las lecturas. Cada combinación de factores tuvo cinco repeticiones y por ser la parcela homogénea estructuralmente, se estableció un diseño completamente aleatorizado (DCA).

Análisis estadístico

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre el porcentaje de mortalidad en *R. similis*, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas en el tiempo bajo la teoría de los modelos lineales mixtos. El modelo lineal para el experimento fue bifactorial con interacción. Se comprobaron los supuestos del ANOVA con gráficos diagnósticos (cuantiles de los términos de error, gráficos de residuos y gráficos de residuos vs. predichos) y se escogió el mejor modelo en función de los criterios de Akaike (AIC) y de información Bayesiano (BIC). Una vez comprobado que en el porcentaje de mortalidad existieron diferencias estadísticas para la interacción o algún factor individual, se realizó las comparaciones de medias por medio de la prueba de Prueba de Di Rienzo, Guzmán y Casanoves (DGC) ($p \leq 0.05$) y se utilizó el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2020).

Resultado y discusión

Identificación morfológica y molecular de HN

Se aislaron un total de cinco HN, basados en las descripciones microscópicas, aspectos morfológicos y la identificación molecular mediante PCR. Los resultados obtenidos de las comparaciones de las secuencias de nucleótidos con accesiones reportadas en el GenBank®, permitieron la correcta identificación de cada uno de los cinco hongos. La secuencia de nucleótidos de la región TEF1- α de los aislamientos provenientes de muestras de suelo de Siquirres (Fox2) y de Pococí (Fox3) presentaron un nivel de homología de 100% con *F. oxysporum* (MN386735) reportado en Malasia (Kee *et al.*, 2020).

La secuencia de nucleótidos de los productos amplificados de la región TEF1- α de los aislamientos Trich1 de Limón y Trich3 de Pococí, presentaron homología del 100% con *T. asperellum* (MZ442656) reportado en Paraguay (Florentín, 2022). Finalmente, el aislamiento Pli proveniente de muestras de suelo de Talamanca, presentó un nivel de homología del 99.7% en el gen de la β -tubulina con respecto a *P. lilacinum* (KY488512) reportado en Brasil (Amatuzzi *et al.*, 2017). Las secuencias obtenidas en este estudio fueron subidas al GenBank® y se obtuvieron los números de accesión para cada uno de los hongos identificados (Tabla 1).

Tabla 1.

Origen e identificación de los hongos nematófagos aislados de muestras de suelo de la Región Huetar Atlántica, utilizados en las pruebas in vitro. Costa Rica, 2021

Procedencia	Nombre científico	Código	Identidad (%*)	Accesión* *
Pococí	<i>Trichoderma asperellum</i>	Trich3	100	OR418173
Siquirres	<i>Fusarium oxysporum</i>	Fox2	100	OR828460
Limón	<i>Trichoderma asperellum</i>	Trich1	100	OR418174
Pococí	<i>Fusarium oxysporum</i>	Fox3	100	OR828461
Talamanca	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	Pli	99,7	OR418119

*Porcentajes de identidad (%) calculados por medio de la herramienta en línea BLAST Nucleotide del *National Center for Biotechnology Information* (NCBI). ** Números de accesión de cada uno de los hongos identificados en este estudio.

Evaluación del antagonismo in vitro de hongos nematófagos

El análisis de varianza (ANOVA) reveló diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la interacción de los hongos con las evaluaciones ($p < 0.05$), lo que evidenció una relación entre los diferentes aislamientos y el tiempo de lectura. Estas variaciones ejercieron un impacto significativo en la capacidad antagónica sobre los nematodos, ya que el índice de mortalidad más alto se observó luego de 42 horas de exposición, en comparación con la primera lectura efectuada a las 24 horas.

El tratamiento control (Tx1), el cual únicamente contenía nematodos en los platos Petri, en términos del porcentaje de mortalidad, fue similar a los otros tratamientos en los dos tiempos de lectura ($p < 0.005$). El tratamiento control (Tx1) manifestó en promedio un porcentaje de mortalidad del 22.1% en la primera lectura (24 horas) y un 25.5% en la segunda lectura (42 horas) (Figura 1). La diferencia en mortalidad en ambas lecturas fue del 3,3%, lo que hace indicar que *R. similis* se mantuvo activo y móvil, como era de esperar, ya que los

nematodos se encontraban en el medio de cultivo AA + agua destilada, sin estar expuestos a ningún antagonista.

En el caso de *T. asperellum* (*Trich3*) y *T. asperellum* (*Trich1*) mostraron un promedio de porcentaje de mortalidad del 28.8% y 25.1%, a las 24 horas después de la inoculación respectivamente. Estos valores no presentaron una diferencia significativa en comparación con el tratamiento control (Tx1). A las 42 horas de exposición, los tratamientos *Trich3* y *Trich1* mostraron un aumento en el promedio de porcentaje de mortalidad, con valores del 53.3% y 37.7%, es decir, la diferencias entre ambos fueron del 24.5% y 12.6% respectivamente. Estos resultados tienen relación con los reportados por Candellero et al. (2015), quienes mediante pruebas in vitro después de 48 horas de inoculación, demostraron la capacidad antagónica de varias especies de *Trichoderma spp.* sobre juveniles de *Meloidogyne incognita* con porcentajes de reducción, en algunos casos, de hasta el 100%.

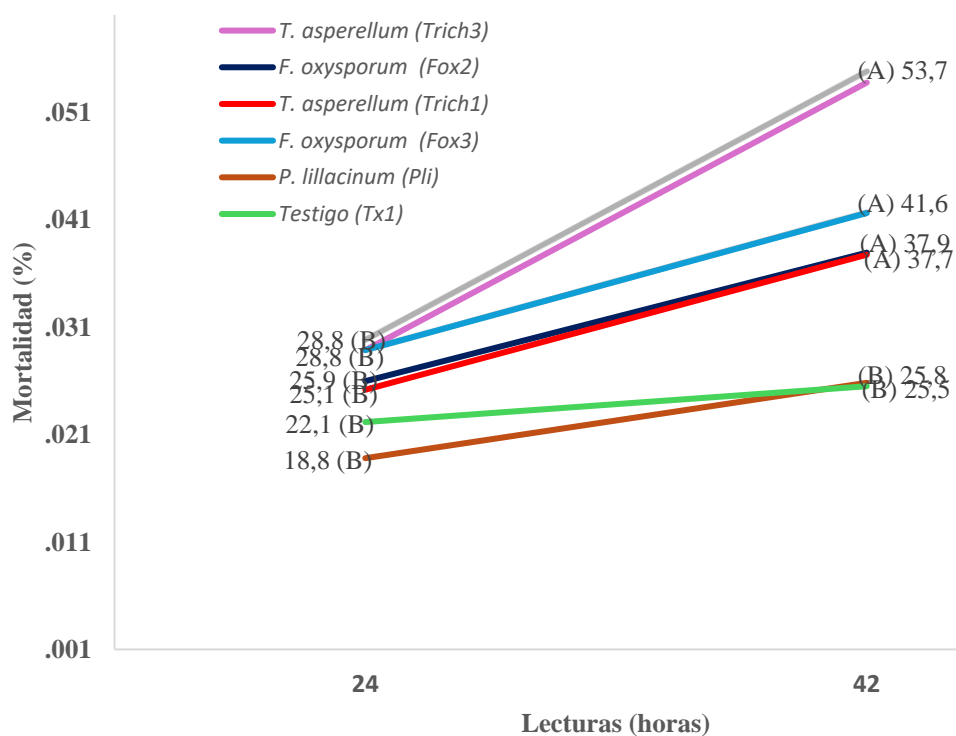



Figura 1. Gráfico de líneas de las medias de mortalidad (%) en función de los aislamientos para cada lectura [Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ($p > 0.05$)].




En las cajas Petri inoculadas con *T. asperellum* (Trich1 y Trich3), se observó gran cantidad de esporas y micelio alrededor de la cutícula de los nematodos (Figura 2 A y B). Este efecto se podría asociar con la capacidad de micoparasitismo que posee *Trichoderma*, así como a su habilidad para competir por recursos nutricionales y espacio. De acuerdo con Herrera *et al.* (2023), el fenómeno de micoparasitismo involucra la producción de una variedad de enzimas, entre las cuales se incluyen quitinasas, glucanasas, quitobionas, peroxidases, celulasas y proteasas. Estas enzimas, pudieron en este estudio, explicar la capacidad de este hongo de penetrar la cutícula de los nematodos. Además, investigaciones realizadas por Medina-Olea (2020) y Hernández-Ochandía *et al.* (2015), indicaron que aislamientos de *T. asperellum* poseen la habilidad de degradar la pared celular de *R. similis*, lo cual está directamente vinculado con la actividad de las enzimas líticas mencionadas anteriormente.

Asimismo, no se descarta la posibilidad de que *T. asperellum* (Trich1 y Trich3) hayan producido y liberado al medio, metabolitos secundarios (MS) que, al interactuar con los nematodos, hayan provocado su inmovilización y finalmente la muerte. Según Medina (2016) y Mesa-Vanegas *et al.* (2019), algunos de estos compuestos son policétidos, terpenos, terpenoides, pirógenos, fenoles y alcaloides.

En el caso de los dos aislamientos de *F. oxysporum* (Fox2 y Fox3), ambas presentaron porcentajes de mortalidad del 25.9% y 28.8% respectivamente, a las 24 horas después de la inoculación, similares al tratamiento control (Tx1) que fue de 25.5 %. Ambos aislamientos, no mostraron diferencias estadísticamente significativas en términos del promedio de mortalidad en comparación con el Tx1 en la primera lectura.

En la segunda lectura, ambos tratamientos (Fox2 y Fox3), mostraron un aumento significativo en el promedio de mortalidad de adultos y juveniles de *R. similis* con porcentajes del 37.9% y 41.6% respectivamente. Ambos aislamientos mostraron diferencias del 12.0% y 12.8% en la segunda lectura a las 42 horas.

Resultados similares con el uso de compuestos como la bikaverina y el ácido fusárico, aislados del hongo endófito *F. oxysporum*, fueron reportados por Seong *et al.* (2021). Estos compuestos produjeron mortalidades del 50.0% y 43.0% al nematodo *Bursaphelenchus*



xylophilus, respectivamente. En este estudio, la observación de nematodos juveniles y adultos inmóviles en los platos Petri inoculados con este hongo, podría indicar la presencia de este compuesto (Figura 2 C y D). Adicionalmente, en un ensayo realizado por Morales-García (2014), en el cual evaluó el potencial de biocontrol de dos aislamientos de *F. oxysporum* contra *R. similis* en plantas de banano producidas en condiciones *in vitro*, se obtuvieron resultados similares a los de este estudio con una reducción de las poblaciones en raíz de un 39.2% y 54.1%, respectivamente.

De los cinco aislamientos utilizadas en esta investigación, *P. lilacinum* (Pli) fue el que mostró el menor porcentaje de parasitismo como potencial agente de control biológico. En la lectura a las 24 horas, mostró un porcentaje de mortalidad del 18.8%, menor que el que se observó en el tratamiento control (Tx1). En la segunda lectura a las 42 horas, alcanzó un promedio de mortalidad del 25.8%, sin mostrar diferencias significativas con respecto al (Tx1) y con una media muy por debajo de los demás tratamientos (Trich1, Trich3, Fox2 y Fox3) (Figura 1).

En una investigación realizada por Varela-Benavides *et al.* (2017), donde evaluaron el potencial antagonista *in vitro* de *P. lilacinum* a las 96 horas contra *R. similis*, obtuvieron una tasa de mortalidad del 37.2%, lo que representó una diferencia del 11.4% mayor en comparación con los resultados obtenidos en este estudio, con el uso de un aislamiento de la misma especie. La diferencia en el porcentaje de mortalidad podría estar relacionada con algunas variables como el tiempo de exposición del nematodo con el antagonista, el sitio donde fue aislado y el tipo de suelo (Flores-Castañeda, 2016).

Adicionalmente, podría obedecer a pequeñas variaciones en las condiciones de laboratorio, como la temperatura, humedad y el medio de cultivo. Por otra parte, a pesar de ser la misma especie, las diferencias en el parasitismo podrían deberse a la variabilidad genética y fisiológica de cada aislamiento de hongo, según su nivel de eficacia.

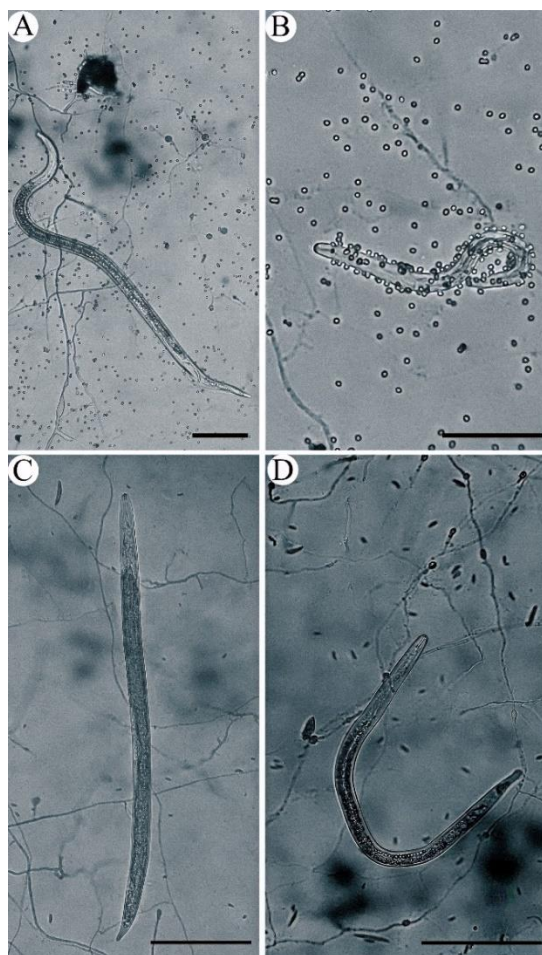



Figura 2. Actividad nematófaga de algunos aislamientos utilizados para las pruebas las pruebas in vitro. A: *F. oxysporum*. B: *T. asperellum*. C: *F. oxysporum*. D: *T. asperellum*. Heredia, 2023. Escala: A: 110 μm . B: 120 μm . C: 170 μm y D: 145 μm .

Conclusiones

Se observó un aumento significativo en el porcentaje de mortalidad de los nematodos en los tratamientos después de 42 horas de exposición en comparación con las mediciones realizadas a las 24 horas. Los hongos *T. asperellum* y *F. oxysporum* demostraron una mayor eficacia en el control de *R. similis* en comparación con *P. lilacinus* y el tratamiento control.

Los resultados revelaron una interacción importante entre las variables de tipo de hongo y tiempo de exposición. Esto significa que el efecto de los hongos en la mortalidad de los nematodos puede variar dependiendo del tiempo de exposición.



El uso de hongos nematófagos es una prometedora estrategia de control de nematodos fitoparásitos; sin embargo, se requieren más investigaciones para evaluar su eficacia en diversas condiciones de suelo y cultivos, así como para determinar su posible impacto ambiental y en otros organismos no objetivo. Es importante realizar pruebas en invernadero y campo para confirmar el potencial de estos hongos como controladores de nematodos y para identificar factores que puedan afectar su efectividad, como temperatura, densidad de inóculo y fuentes de carbono.

Finalmente, este estudio brinda información importante sobre el potencial de algunos de estos hongos como métodos alternativos para el control de *R. similis* en el suelo. Además, se evidenció la presencia de HN en la región Huetar Atlántica, por lo que podrían ser una alternativa más a los programas de manejo integrado de plagas (MIP) en cultivos de importancia agrícola en Costa Rica, para reducir el uso de nematicidas altamente tóxicos que provocan efectos negativos a la salud humana y al ambiente.

Agradecimiento

Los autores desean agradecer toda la ayuda brindada al Ing. Agrónomo Jefferson Araúz Badilla.

Referencias

Arboleda, F., Guzmán, A., & Mejía, L. F. (2012). Efecto de extractos cetónicos de higuierilla (*Ricinus communis* Linneo.) sobre el nematodo barrenador [*Radopholus similis* (cobb.) thorne] en condiciones in vitro. *Luna Azul*, 35, 28-47. Recuperado de <https://revistasoj.s.ucaldas.edu.co/index.php/lunazul/article/view/1724>.

Amatuzzi, R.F., Poitevin, C. G., Poltronieri, A. S., Zawadneak, M. A. C. & Pimentel, I. C. (2017). Entomopathogenic fungi as a biological control agent against *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae). *Basic Pathology*, Federal University of Parana State, Centro Politécnico, Curitiba, Parana 91531990. Brasil, 10(1), 18. Recuperado de <https://doi.org/10.1590/1519-6984.166681>

Barnett, H., & Hunter, B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. The American Phytopathological Society. US Department of Agriculture, Agricultural Research

Service, Washington State University, Pullman. APS Press. USA. St. Paul, Minnesota USA.

Barraza, D., Jansen, K., Wesseling, C., & van Wendel de Joode, B. (2020). Pesticide risk perceptions among bystanders of aerial spraying on bananas in Costa Rica. *Environmental Research*, 189. Art. 109877. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109877>

Barrón, G. L. (1977). The nematode destroying fungi. Lancaster, Pennsylvania. USA. Lancaster Press, Inc. 140 p.


Bojanich, M. V. (2019). Interacción biológica de las enzimas producidas por hongos nematófagos saprófitos de suelo, contra huevos de *Toxocara canis*. [Tesis de Doctorado] Universidad Nacional de La Plata. Recuperado de <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/74972>.

Burges, H. D. (2007). Techniques for testing microbials for control of arthropod pests in greenhouses. *Field Manual of Techniques in Invertebrate Pathology*, 463-479. Recuperado de https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5933-9_22

Candelerio, D., Cristóbal, A., Reyes, R., Tun, S., Gamboa, A., & Ruíz, S. E. (2015). *Trichoderma* spp. promotoras del crecimiento en plántulas de *Capsicum chinense* Jacq. y antagónicas contra *Meloidogyne incognita*. *Revista Internacional de Botánica Experimental, Phytón*, 84(1), 113-119. Recuperado de <https://doi.org/10.32604/phyton.2015.84.113>

Cañedo, V., & T. Ames. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, 62 p. Recuperado de <http://www.cipotato.org/library/pdfdocs/AN65216.pdf>.

Castillo-Benavides, J. (2021). Desarrollo de una propuesta metodológica para evaluar la contribución del sector bananero al desarrollo territorial sostenible del cantón de Matina en la provincia de Limón, Costa Rica. [Tesis Maestría] Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica. Recuperado de



https://repositorio.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/10579/Desarrollo_de_una_propuesta_metodol%c3%b3gica.pdf?sequence=5&isAllowed=y

- Chen, S. & Dickson, D. (2004). Biological control of nematodes by fungal antagonist. *Nematology. Advances and perspectives*, 2. Beijing, China.
- Cooke, R. & Godfrey, B. (1964). A key to the nematode-destroying fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 47(1), 61-74.
- Deshmukh, S. (2003). The Maintenance and Preservation of Keratinophilic Fungi and Related Dermatophytes. *Mycoses*, 46, 203-207, Alemania. Recuperado de <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2003.00860.x>
- Dita, M., Waalwijk, C., Buddenhagen, I., Souza Jr, M. & Kema, G. (2010). A molecular diagnostic for tropical race 4 of the banana *Fusarium* wilt pathogen. *Plant pathology*, 59(2), 348-357. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2009.02221.x>
- Di Rienzo J., Casanoves F., Balzarini M., González L., Tablada M., & Robledo, C. (2020). Centro de Transferencia InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. Recuperado de <http://www.infostat.com.ar>
- FAO. (2020). Análisis del mercado del banano: resultados preliminares 2019. Roma. Recuperado de <https://www.fao.org/publications/card/es/c/CA7567ES/>
- Fernández-Jiménez, M., Bulla-Castañeda, D., Sanabria-Villate, A., & Pulido-Medellín, M. (2019). Implementación de hongos nematófagos para el control de parásitos gastrointestinales. *Pensamiento y Acción*, 27, 7-20. Recuperado de https://revistas.uptc.edu.co/index.php/pensamiento_accion/article/view/10201
- Flores-Castañeda, D. (2016). Evaluación del potencial nematófago de los hongos *Arthrobotrys musiformis* y *Arthrobotrys oligospora* en bovinos. [Tesis Licenciatura] Universidad de La Salle. Colombia.
- Florentin, M. (2022). Isolation and characterization of *Trichoderma* species with biocontrol potential from Paraguay. *Biotechnología*, Facultad de Ciencias Químicas, Mcal. Lopez,

San Lorenzo, Paraguay. Recuperado de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MZ442656.1>

Gowen, S. R., Quénéhervé, P. & Fogain, R. (2005) Nematode parasites of bananas and plantains. In: Luc, M., Sikora, R. A. and Bridge, J. (eds.) Plant Parasitic Nematodes in Subtropical and Tropical Agriculture. CABI, Wallingford,

Holguín-Quispe, A. (2018). Nematodos parásitos asociados al cultivo de banano (*Musa* spp.) en el distrito de la matanza, Valle del Alto Piura. Perú. [Tesis Licenciatura]. Universidad Nacional de Piura. Recuperado de <http://repositorio.unp.edu.pe/handle/UNP/1287>

Herrera, E., Reyes, M., Cristóbal, J., Basto, C., Zavala, M. (2023). *Trichoderma*: recurso microbiológico y sus aplicaciones en la agricultura en Yucatán, México. *Centro de Investigación Científica de Yucatán*, A.C. Recuperado de http://www.cicy.mx/sitios/desde_herbario/

Hernández-Ochandía, D., Rodríguez, M., Peteira, B., Miranda, I., Arias, Y. & Martínez, B. (2015). Efecto de cepas de *Trichoderma asperellum* Samuels, Lieckfeldt y Nirenberg sobre el desarrollo del tomate y *Meloidogyne incognita* Chitwood. *Protección Vegetal*. 30(2), 139-147.

Hoyos-Carvajal, L., Chaparro, P., Abramsky, M., Chet, I. & Orduz, S. (2008). Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones in vitro y de invernadero. *Agronomía Colombiana*, 26(3), 451-458. Recuperado de <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/11477>

Guzmán-Piedrahita, O. (2011). El nematodo barrenador (*R. similis* [Cobb] Thorne) del banano y plátano. *Revista Luna Azul*, 33, 137-153. Universidad de Caldas Manizales, Colombia.

Kee, Y., Zakaria, L., & Mohd, M. (2020). Morphology, phylogeny and pathogenicity of *Fusarium* species from *Sansevieria trifasciata* in Malaysia. *Plant Pathology*, 69(3), 442-454. Recuperado de <https://doi.org/10.1111/ppa.13138>

Kerry, B. R. (2001). Exploitation of the nematophagous fungal *Verticillium chlamydosporium* Goddard for the biological control of root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.). Fungi as Biocontrol Agents-Progress, Problems and Potential. Wallingford, UK: *CAB International*, 155-166. Recuperado de <https://doi.org/10.1079/9780851993560.0155>.

Little, G. & Gordon, M. (1967). «Survival of Fungal Cultures Maintained Under Mineral Oils for Twelve Years. *Mycologia*, 59 (4), 733-736, EE. UU. Recuperado de <https://doi.org/10.2307/3757105>

Mata-Martínez, F. (2021). El encadenamiento productivo desarrollado por las empresas bananeras en la zona Huetar Caribe de Costa Rica: estudio de caso sobre upgrading social y económico. [Tesis Maestría]. Universidad Nacional de Costa Rica. Recuperado de <https://repositorio.una.ac.cr/handle/11056/22504>.


Medina Olea, R. (2020). Manejo integrado del nematodo (*Radopholus similis*) en el cultivo de banano (Musa AAA)". [Tesis de Bachillerato]. Universidad Técnica De Babahoyo, Ecuador. Recuperado de <http://dspace.utb.edu.ec/handle/49000/8373>


Medina, F. S. (2016). Mecanismos de protección de *Trichoderma* sp. y patogénesis de *Fusarium oxysporum* en el Nardo (*Polianthes tuberosa*) [Tesis Doctorado]. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco. Guadalajara, Jalisco. Recuperado de <http://ciatej.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1023/373>

Mesa-Vanegas, A. M., Marín, A., & Calle-Osorno, J. (2019). Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. *Actualidades biológicas*, 41(111), 32-44. Recuperado de <https://doi.org/10.17533/udea.acbi.v41n111a02>

Moody, E., Lownsbery, B., & Ahmed, J. (1973). Culture of the root-lesion nematode *Pratylenchus vulnus* on carrot disks. *Journal of Nematology*, 5(3), 225.

Morales-García, D. (2014). Bioprospección de hongos endófitos para el control biológico del nematodo barrenador *R. similis* (Cobb) Thorne en el cultivo del banano. [Tesis

- 
- Maestría]. Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. Recuperado de <https://hdl.handle.net/2238/5797>
- O'Bannon, J., & Taylor, A. (1968). Migratory endoparasitic nematodes reared on carrot discs. *Phytopathology*, 58(3), 385.
- Ocampo-Gutiérrez, A. (2021). Caracterización taxonómica y actividad depredadora de hongos nematófagos, evaluación y clasificación química de los compuestos con actividad nematicida contra *Haemonchus contortus*. [Tesis Doctorado]. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. México. Recuperado de <http://riaa.uaem.mx/handle/20.500.12055/1487>
- Rendón-Restrepo, L. (2020). Capacitación a productores sobre el nematodo fitoparásito *Radopholus similis*, en cultivos de musáceas y su respectivo biocontrolador, *Paecilomyces lilacinus*, en el municipio de Andes-Antioquia, Colombia. [Tesis de grado]. Universidad de Antioquia. Recuperado de <https://hdl.handle.net/10495/18372>.
- Sánchez-Miranda, M. D., Moreno-Mayorga, L. F., & Páramo-Aguilera, L. A. (2021). Identificación morfológica y molecular de especies autóctonas *Trichoderma* spp., aisladas de suelos de importancia agrícola. *Revista Ciencia Y Tecnología El Higo*, 11(1), 26–42. Recuperado de <https://doi.org/10.5377/elhigo.v11i1.11715>
- Sanger, F., Air, G. M., Barrell, B.G., Brown, N. L., Coulson, A. R., Fides, C. A., Hutchison, C. A., Slocombe, M., Smith, M. (1977). Nucleotide sequence of bacteriophage uX174 DNA. *Nature*, 265:687-95. Recuperado de <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/870828/>
- Servicio Fitosanitario del Estado (SFE). (2020). Productos restringidos en Costa Rica al 01/06/2020. Unidad de registros de Agroquímicos y equipos de aplicación. Departamento de agroquímicos y equipos. Recuperado de https://www.sfe.go.cr/DocsStatusRegistro/Listado_de_Restringidos.pdf.
- Seong, J., Shin, J., Kim, K., & Cho, B.K. (2021). Microbial production of nematicidal agents for controlling plant-parasitic nematodes. *Process Biochemistry*, 108, 69–79. Recuperado de <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.06.006>



UNCTAD. (2013). Mercado de productos básicos en los países en desarrollo: Banano. Ginebra, Suiza. Recuperado de https://unctad.org/es/system/files/official-document/INFOCOMM_cp01_Banana_es.pdf.

Varela-Benavides, I., Durán-Mora, J. & Guzmán-Hernández, T. (2017). Evaluación in vitro de diez cepas de hongos nematófagos para el control de *Meloidogyne exigua*, *Meloidogyne incognita* y *Radopholus similis*. *Revista Tecnología en Marcha*, 30(1), 27-37. Recuperado de https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec_marcha/article/view/3062

Vargas, A., Watler, W., Morales, M. & Vignola, R. (2017). Ficha técnica cultivo de banano. Prácticas efectivas para la reducción de impactos por eventos climáticos en el cultivo de banano en Costa Rica. Recuperado de <https://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-8205.pdf>.

Zhiminaicela Cabrera, J. B., Quevedo Guerrero, J. N., & García Batista, R. M. (2020). La producción de banano en la Provincial de El Oro y su impacto en la agrobiodiversidad. *Revista Metropolitana de Ciencias Aplicadas*, 3(3), 189-195. Recuperado de <https://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA/article/view/327/350>.