

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

**Aislamiento, identificación y evaluación in vitro de hongos nematófagos  
como posibles agentes de control biológico del nematodo barrenador  
*Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949 en fincas bananeras de la  
región Huetar Atlántica**

Trabajo Final de Graduación bajo la modalidad de Artículo Científico para optar por el grado de Licenciatura en  
Ingeniería en Agronomía

**Estudiante**

Bach. Berlioth Ugalde Monge

**Tutor**

M. Sc. Wálter Peraza Padilla

**Asesores**

M. Sc. Alejandro Vargas Martínez

Lic. Roy Artavia Carmona

Campus Omar Dengo

Heredia, 2023

**Aislamiento, identificación y evaluación in vitro de hongos nematófagos  
como posibles agentes de control biológico del nematodo barrenador  
*Radopholus similis* (Cobb, 1893) Thorne, 1949 en fincas bananeras de la  
región Hueta Atlántica**

Berlioth Ugalde Monge

**Trabajo final de graduación modalidad artículo científico sometido a consideración del tribunal examinador de la Escuela de Ciencias Agrarias para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería en Agronomía**

**Tribunal Examinador**

---

M. Sc. Allan González Herrera

Representante de la decanatura Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar

---

M. Sc. Alonso Calvo Araya

Representante de la dirección de la Escuela de Ciencias Agrarias

---

M. Sc. Wálter Peraza Padilla

Director de Tesis

---

M. Sc. Alejandro Vargas Martínez

Asesor

---

Lic. Roy Artavia Carmona

Asesor

---

Berlioth Ugalde Monge

Sustentante

## **DEDICATORIA**

*A Dios, por darme la sabiduría para culminar esta etapa de mi vida y demostrarme que s  
es infinito.*

*A mi papá y mamá, por luchar incansablemente por mi carrera profesional y por impulsarme  
siempre a alcanzar mis sueños. A mis hermanos,  
que son el motor de mi vida y a mi sobrino por darme un gran motivo para seguir adelante.*

*A Francisco GR mi mejor amigo y el amor de mi vida, por creer en mí y apoyarme  
incondicionalmente.*

*A la Familia González Rodríguez, por su apoyo, su cariño y por abrirme las puertas de su  
hogar.*

## **AGRADECIMIENTOS**

*Agradezco de una forma especial al M. Sc. Wálter Peraza Padilla por abrirme las puertas en su  
equipo de trabajo, por guiarme en todo el proceso y por confiar en mí para la elaboración del  
proyecto de graduación. También a la M. Sc. Irena Hilje Rodríguez por enseñarme  
pacientemente y por apoyarme tanto, a la Lic. Steffany Orozco Cayasso por aconsejarme y  
brindarme siempre su colaboración. Además, al Lic. Jefferson Aráuz Badilla por toda su ayuda.*

*Agradecer también a los profesionales formadores de la ECA, de manera especial al Lic. Roy  
Artavia Carmona por brindarme su gran ayuda y guía en mi Trabajo Final de Graduación, así  
como también al M.Sc. Alejandro Vargas Martínez por su gran ayuda como lector y en la parte  
estadística del trabajo.*

*Finalmente, agradezco a cada una de las personas que de alguna manera me alentaron e  
hicieron que esto fuera posible.*

*Muchas gracias.*

## Tabla de Contenido

<b>Introducción general.....</b>	<b>6</b>
<b>Aislamiento e identificación de hongos nematófagos en fincas bananeras de la Región Huetar Atlántica de Costa Rica.....</b>	<b>8</b>
Resumen .....	8
Abstract .....	9
Introducción .....	9
Materiales y métodos .....	12
Resultados .....	15
Discusión.....	12
Conclusiones .....	14
Agradecimientos.....	14
Conflicto de intereses .....	15
Referencias .....	15
<b>Evaluación in vitro de hongos nematófagos contra el nematodo barrenador <i>Radopholus similis</i> (Cobb, 1893) Thorne, 1949 en Costa Rica.....</b>	<b>1</b>
Introducción .....	2
Metodología .....	5
Resultados y discusión .....	9
Conclusiones .....	16
Agradecimiento .....	16
Referencias .....	17

## INTRODUCCIÓN GENERAL

El banano es un cultivo originario del suroeste de Asia, el cual se ha extendido a muchas zonas de América Central y América del Sur. Pertenece a la familia Musaceae y la mayoría de sus cultivares tuvieron origen en dos especies silvestres: *Musa acuminata* (A) y *Musa balbisiana* (B) que debido a su poliploidía e hibridación generaron las variedades cultivadas actualmente (Hoyos *et al.*, 2012). Este se cultiva en todas las regiones tropicales y tiene una importancia fundamental para las economías de muchos países en desarrollo, es el cuarto cultivo alimentario más importante en el mundo (Arias *et al.*, 2004).

Los problemas más comunes asociados a la actividad bananera se relacionan con enfermedades y plagas; entre estas últimas, hongos, bacterias, virus y nematodos (Cooman, 2009). Estos últimos provocan daño en sus raíces y cormos, por lo que afectan su crecimiento y desarrollo. El nematodo fitoparásito más destructivo en las plantaciones de banano en todo el mundo es *R. similis*. De acuerdo con Cañizares (2003) es la especie de mayor importancia en las regiones tropicales y subtropicales. Debido a que estos nematodos generan daños en las raíces y el cormo, inducen a un crecimiento deficiente de las plantas. Adicionalmente, las hojas crecen más pequeñas y en menor número, los frutos tienen un peso reducido y las plantas se vuelcan con facilidad debido a la pudrición del sistema radical (Valencia, 2014).

La manera tradicional y frecuente de combatir los nematodos fitoparásitos en musáceas, ha sido por medio del uso de agroquímicos como carbamatos y organofosforados (Gómez, Mario, y Rojas, 2008). Sin embargo, el control químico aparte de que afecta a grupos de nematodos benéficos perjudica también a las poblaciones de microorganismos, así como la estructura física y química del suelo (Meneses, 2003).

Es por esto, que la creciente búsqueda de alternativas de manejo integrado de plagas y enfermedades ha llevado a realizar muchas más investigaciones sobre el potencial que poseen los microorganismos dentro de los sistemas productivos para disminuir la dependencia de productos químicos sintéticos y el impacto sobre el ambiente (Morales, 2014). En este sentido, el uso de hongos para el control biológico es una alternativa utilizada como herramienta de manejo de plagas, mediante el desarrollo de bioplaguicidas.

Existe evidencia de la diversidad del uso de hongos como controladores biológicos de plagas, resultando muy efectivos. Por su parte, Fernández, Bulla, Sanabria y Pulido (2019)

indicaron que existen más de 300 especies de hongos que controlan nematodos (HN). Existen reportes que demuestran el potencial de control sobre *R. similis* y de otros nematodos, por medio del efecto de hongos como *P. lilacinum*, *Trichoderma* spp., *Arthrobotrys cladode* y *Aspergillus niger* (Corbana, 2009). En suelos de Costa Rica los HN se encuentran ampliamente distribuidos; se han encontrado especies de *Arthrobotrys oligospora*, *A. conoides*, *A. dactyloides*, *Candelabrella musiformis* y *Monacrosporium* sp., ya que estos han sido aislados de diversos tipos de sustratos, sistemas productivos, y áreas geográficas (Peraza *et al.*, 2011; Soto, 2011).

Cabe mencionar que, de acuerdo con su estrategia de captura, los HN pueden clasificarse en endoparásitos y depredadores (Cole y Kendrick, 1981). Los hongos endoparásitos forman estructuras adhesivas o de ingestión (conidios adhesivos o ingeribles) y así infectan a los nematodos (Barrón, 1977; Peraza *et al.*, 2011). En el caso de los hongos depredadores se caracterizan por producir una red hifal extensa en el sitio donde se encuentran. Las estructuras depredadoras de estos hongos pueden ser muy simples y forman hifas adhesivas septadas, o complejas como redes y botones adhesivos, anillos constrictores y no constrictores (Lazcano *et al.*, 2015).

Según Chaves (2007), *Trichoderma* sp. y *Fusarium* sp. son los géneros más abundantes de hongos endofíticos presentes en tejidos internos de raíces de banano y que muestran un alto potencial como antagonistas de los nematodos, encontrando reducciones de hasta un 90% en la población final de *R. similis* en el sistema radical de plantas de banano protegidas con estos hongos endofíticos. Por lo anterior, esta investigación plantea la búsqueda de una herramienta de control biológico mediante la identificación y uso posterior de HN, contra el nematodo barrenador del banano (*R. similis*) en condiciones *in vitro*, como una alternativa al uso indiscriminado de productos químicos en las zonas bananeras de Costa Rica.

## Aislamiento e identificación de hongos nematófagos en fincas bananeras de la Región Huetar Atlántica de Costa Rica<sup>1</sup>

## Isolation and identification of nematophagous fungi in banana plantations in the Huetar Atlantic Region of Costa Rica<sup>1</sup>

Berlioth Ugalde-Monge<sup>2</sup>, Roy Artavia-Carmona<sup>3</sup>, Irena Hilje-Rodríguez<sup>4</sup>, Walter Peraza-Padilla<sup>5</sup>

### Resumen

**Introducción.** El uso de hongos nematófagos (HN) para el control biológico de nematodos es una alternativa para reducir el uso de productos químicos sintéticos en cultivos agrícolas importantes.

**Objetivo.** Aislamiento e identificación de hongos HN presentes en muestras de suelo de plantaciones de banano de la región Huetar Atlántica. **Materiales y métodos.** El estudio se desarrolló entre mayo de 2021 y junio de 2023 a partir de muestras de suelo procedentes de cinco cantones de la región Huetar Atlántica de Costa Rica. Se analizaron diez muestras de suelo mediante el método de espolvoreado en placas con agar-agua para buscar estructuras de HN. Para la selección y purificación de hongos nematófagos se utilizaron placas Petri con papa dextrosa agar (PDA), identificando las estructuras morfológicas para el diagnóstico a nivel de género. Los hongos identificados morfológicamente se replicaron y se conservaron en una micoteca en viales con PDA y aceite mineral a 4 °C. De los hongos aislados y purificados se extrajo el ADN y mediante amplificación por PCR (Reacción de Cadena de la Polimerasa) y secuenciación bidireccional de diferentes regiones del genoma (ITS, TEF1- $\alpha$ , rpb2 y  $\beta$ -tubulina), se identificaron molecularmente.

**Resultados.** Se aislaron e identificaron doce hongos, entre ellos *Trichoderma asperellum*, *Penicillium steckii*, *Purpureocillium lilacinum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium pseudocircinatum*, y *Talaromyces* sp. **Conclusión.** La diversidad de hongos nematófagos encontrada en la Región Huetar Atlántica apunta hacia su potencial uso como agentes de control biológico.

---

<sup>1</sup> Esta investigación formó parte de los resultados del trabajo final de graduación de Licenciatura en Agronomía del primer autor. Universidad Nacional (UNA). Costa Rica.

<sup>2</sup> Servicio Fitosanitario del Estado (SFE). San José, Costa Rica. Apartado Postal 1521-1200. Berlioth Ugalde Monge [berlioth.ugalde.monge@est.una.ac.cr](mailto:berlioth.ugalde.monge@est.una.ac.cr), (<https://orcid.org/0000-0002-7481-7561>).

<sup>3</sup> y <sup>5</sup> Laboratorio de Nematología, Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica. Apartado Postal 86-3000. [roy.artavia.carmona@una.cr](mailto:roy.artavia.carmona@una.cr) (<https://orcid.org/0000-0003-0906-5444>); [walter.peraza.padilla@una.cr](mailto:walter.peraza.padilla@una.cr) (<https://orcid.org/0000-0003-4651-5555>).

<sup>4</sup> Laboratorio de Biología Molecular. Universidad Nacional. Heredia, Costa Rica. Apartado Postal 86-3000. [irena.hilje.rodriguez@una.ac.cr](mailto:irena.hilje.rodriguez@una.ac.cr), (<https://orcid.org/0009-0002-7616-8646>).





**Palabras clave:** Control biológico, taxonomía, identificación molecular, BLAST, Musaceae

## Abstract

**Introduction.** The use of nematophagous fungi (NF) for biological control of nematodes is an alternative to reduce the use of synthetic chemicals in important agricultural crops. **Objective.** To isolate and to identify NF present in soil samples from banana plantations in the Huetar Atlántica region. **Materials and methods.** The study was developed between May 2021 and June 2023 from soil samples from five cantons of the Huetar Atlantic region of Costa Rica. Ten soil samples were analyzed by the water-agar plate sprinkling method to search for NF structures. For selection and purification of nematophagous fungi, Petri dishes with PDA were used, identifying morphological structures for diagnosis at genus level. Morphologically identified fungi were replicated and preserved in vials with PDA and mineral oil at 4°C. DNA was extracted from the isolated and purified NF and through PCR amplification (Polymerase Chain Reaction) and bidirectional sequencing of different genome regions (ITS, TEF1- $\alpha$ , rpb2 and  $\beta$ -tubulin), they were molecularly identified. **Results.** Twelve fungi were isolated and identified, including *Trichoderma asperellum*, *Penicillium steckii*, *Purpureocillium lilacinum*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium pseudocircinatum*, and *Talaromyces* sp. **Conclusion.** Diversity of nematophagous fungi found in the Huetar Atlantic Region points to its potential use as biological control agents.

**Keywords:** biological control, taxonomy, molecular identification, BLAST, musaceae

## Introducción

En Costa Rica, hay 43 444 hectáreas destinadas al cultivo de banano, distribuidas en 153 fincas. Los cantones de Matina, Siquirres y Pococí son los que poseen la mayor cantidad de área sembrada, representando el 26, 19 y 17 %, respectivamente (Ministerio de Agricultura y Ganadería, MAG, 2022). Durante el año 2019, la producción de banano destinada a la exportación alcanzó 121 millones de cajas, cada una con un peso promedio de 18,14 kg. Este desempeño representó un ingreso de divisas que superó los USD 1004,5 millones en el país (Promotora de Comercio Exterior de Costa Rica, PROCOMER, 2020). Además, el sector bananero tuvo un impacto significativo en el empleo, ya que proporcionó trabajo directo a unas 43 000 personas y de forma indirecta cerca de 100 000 empleos adicionales (Rojas-Contreras, 2021).

Al igual que cualquier sistema productivo, las plantaciones de banano a nivel global enfrentan desafíos asociados con enfermedades y plagas, siendo los nematodos fitoparásitos (NF) uno de los problemas más significativos. La infestación por nematodos puede causar daños de consideración en las raíces y los cormos de las plantas, lo que conduce a una reducción en el crecimiento y desarrollo de la planta. Este impacto afecta la calidad y la cantidad de frutos (Morales-García, 2014; Robinson et al., 1999).

Entre los NF que afectan la producción de banano, *Radopholus similis* Cobb Thorne destaca como la especie más perjudicial a nivel mundial, especialmente en plantaciones comerciales del subgrupo Cavendish en regiones tropicales y subtropicales (Cañizares-Monteros, 2003). En algunos países, la infestación por nematodos ha causado reducciones de hasta el 50 % en el rendimiento, lo que resulta en pérdidas económicas significativas para los pequeños productores (Valencia-Serna, 2014).

La estrategia más común para controlar NF en plantaciones de banano es mediante el uso de productos químicos sintéticos como carbamatos y organofosforados (Gómez et al., 2008). Sin embargo, debido a la búsqueda de alternativas ambiental y económicamente más sostenibles, más saludables para el ser humano y eficaces en el manejo integrado de plagas, la investigación se ha dirigido hacia el potencial de biocontrol que presentan diferentes microorganismos. Este enfoque busca mejorar la eficiencia en el uso de los recursos, disminuir la dependencia de productos químicos sintéticos y reducir el impacto ambiental y a la salud (Morales-García, 2014; Vargas, 2017; Cedeño, 2017). En este contexto, el uso de hongos como herramienta de manejo de plagas mediante el desarrollo de bioplaguicidas, se ha convertido en una alternativa cada vez más empleada.

Se han identificado más de 700 especies de hongos entre las cuales existen algunos entomopatógenos eficaces en el control de una amplia variedad de insectos plaga, así como hongos que controlan otros hongos (Espinell-Correal et al., 2018). Por su parte, Fernández-Jiménez et al. (2019) indicaron que existen más de 300 especies de hongos que controlan nematodos (HN) los cuales, según su estrategia de captura, se clasifican en endoparásitos y depredadores (Cole & Kendrick, 1981). Los hongos nematófagos endoparásitos forman estructuras adhesivas o de ingestión (conidios adhesivos o ingeribles) y así infectan nematodos o parasitan huevos formando apresorios (Barrón, 1977; Peraza-Padilla et al., 2011). En el caso de hongos depredadores, producen una red de hifas extensa en el sitio donde se encuentran.

La evidencia científica respalda la eficacia del uso de hongos como agentes de control biológico de plagas (Acuña-Segura & Brenes-Madriz, 2020). Especies como *Duddingtonia flagrans* Duddington, Cooke (Reyes-Guerrero et al., 2021; Mendes et al., 2022) y varias pertenecientes al

género *Arthrobotrys* Hard, tales como *A. musiformis* Drechsler, *A. oligospora* Zopf, *A. robusta* Duddington y *A. superba* Corda han sido utilizadas de forma exitosa en el control de parásitos de rumiantes (Rodríguez-Labastida, 2019). Además, se ha documentado que otros hongos resultan altamente efectivos en el combate de NF. También, otras especies como *Verticillium chlamydosporium* Goddard, *Trichoderma* spp., Persoon, *Purpureocillium* spp., Bainier, *F. oxysporum* y *Monacrosporium* spp., han demostrado su eficacia contra nematodos de la especie *Meloidogyne javanica* Treub, Chitwood (Fernández-Jiménez et al., 2019; Quevedo et al., 2022).

Si bien diversos microorganismos del suelo pueden ser considerados como controladores biológicos, los géneros *Trichoderma* y *Fusarium* Link destacan como los hongos endofíticos más abundantes en los tejidos internos de raíces de banano (Álvarez-Ortega & Gutiérrez-Miranda, 2022). Estos hongos han demostrado potencial como antagonistas de nematodos, ya que han logrado reducciones de hasta el 90 % en poblaciones de *R. similis* en las raíces de plantas de banano que han sido protegidas con estos hongos (Chaves-Méndez, 2007).

En un estudio llevado a cabo por Ali et al. (2022) se comprobó el potencial nematocida de varias especies de *Trichoderma*, siendo la más efectiva la especie *T. harzianum*. Esta especie demostró un efecto ovicida y larvicida significativo, alcanzando un 100 % de eficacia contra huevos y larvas de segundo estadio (J<sub>2</sub>) del nematodo *Meloidogyne incognita* Kofoid and White. Además, existen algunos aislamientos de *Fusarium* que son endófitos de plantas asintomáticas, los cuales pueden producir sustancias promotoras de crecimiento vegetal y funcionan como inductores de resistencia o tolerancia a diferentes fitopatógenos (Chinchilla-Salazar, 2020). De acuerdo con Silva-Valenzuela et al. (2020) la interacción entre *F. oxysporum*, plátano y *R. similis* permitió que los exudados radicales emanados por las plantas de plátano colonizadas con el hongo endófito redujeran el número de juveniles y adultos de *R. similis* hasta en un 50 %, lo que mejoró la salud y el rendimiento del cultivo.

La eficacia de *Purpureocillium lilacinum* (Thom) Samson y en particular, su capacidad para incidir e infectar en las fases iniciales del desarrollo de huevos del nematodo agallador *M. enterolobii* Yang & Eisenback fueron comprobadas por Silva et al. (2017). En dicha investigación, se observaron porcentajes de parasitismo que oscilaron entre un 57 % y un 84 % en comparación con los huevos no tratados.

Debido a su ubicación en una región tropical, Costa Rica alberga una amplia diversidad de hongos en sus ecosistemas naturales y agrícolas. Esta riqueza fúngica le confiere un potencial significativo para aprovechar los hongos como una estrategia de control biológico (Varela-Benavides et al., 2017). Por lo anterior, la presente investigación tuvo como objetivo el aislamiento

e identificación de HN presentes en muestras de suelo de plantaciones de banano de la Región Huetar Atlántica de Costa Rica.

## Materiales y métodos

### Recolección de muestras de suelo

Durante los meses de junio a agosto del 2021 se llevó a cabo una prospección de suelo en seis fincas comerciales y no comerciales de banano en los cantones de Limón, Guácimo, Pococí, Siquirres y Talamanca de la región Huetar Atlántica (Cuadro 1). Se realizó un muestreo al azar, con veinticinco submuestras por hectárea de cada finca. Estas submuestras se recolectaron a una profundidad de 0 a 25 cm, con el objetivo de asegurar que las muestras fueran representativas reduciendo el sesgo en los resultados.

El suelo se recolectó utilizando una pala, evitando alterar la capa superficial de materia orgánica. Luego, se procedió a dividir el suelo en cuartos, hasta obtener una muestra de 1 kg, la cual fue depositada en bolsas de polietileno. Estas bolsas fueron debidamente identificadas con la fecha y ubicación de la recolección, así como las coordenadas geográficas correspondientes. Posteriormente, las muestras se transportaron en un recipiente herméticamente sellado, hasta el Laboratorio de Nematología de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional para su procesamiento y análisis correspondiente.

**Cuadro 1.** Características de los sitios de procedencia de las muestras de suelo analizadas. (Región Huetar Atlántica, Costa Rica. 2021).

**Table 1.** Characteristics of the origin sites of soil samples analyzed. (Huetar Atlantic Region, Costa Rica. 2021).

Cantón	Localización	Coordenadas	Zona de vida*	Altitud (msnm)
Limón	Cerere	9°70'82,69" N 82°99'43,65" O	bmh-T	11
	Tortuguero	10°29'44,23" N 83°37'08,56" O	bmh-T	16
Pococí	Lomas	10°18'21,62" N 83°29'31,51" O	bmh-T	15
Siquirres	El Carmen	10°19'90,28" N 83°47'84,66" O	bmh-P	20
Guácimo	Duacará N°2	10°34'42,15" N 83°62'93,68" O	bmh-P	37
Talamanca	Bajo Coen	9°55'44,20" N 83°00'51,54" O	bh-T	94

\*Según clasificación de Holdridge (1982): bmh-T (Bosque muy Húmedo Tropical), bmh-P (Bosque Húmedo Premontano), bh-T (Bosque Húmedo Tropical).

\*According to Holdridge's (1982) classification: bmh-T (Very Humid Tropical Forest), bmh-P (Premontane Humid Forest), bh-T (Tropical Humid Forest).

## **Análisis de textura y pH de las muestras de suelo**

Para llevar a cabo el análisis textural, se utilizó la metodología propuesta por Bouyoucos (Núñez-Solís, 1996; Maldonado-Paucar, 2016). Una vez calculados los porcentajes de partículas de arena, limo y arcilla, se utilizó el diagrama textural del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) para determinar la textura de cada muestra de suelo (Nesta-Silva & Rodrigues-Nunes, 2014). En el caso de medición del pH se realizó según la metodología de López-Aguilar et al. (2002). Estos procedimientos se llevaron a cabo con el propósito de establecer posibles relaciones entre estas variables y la presencia de hongos nematófagos en el suelo.

## **Aislamiento y purificación de HN**

Para el aislamiento y purificación de los hongos presentes en las muestras de suelo, se utilizó el método de "espolvoreado en placa" descrito por Barrón (1977) para el aislamiento de HN. Esta técnica consistió en utilizar entre 0,5 a 1,0 g de suelo de cada muestra recolectada los cuales se colocaron en platos Petri de 9 cm de diámetro que contenían agar-agua (AA). Posteriormente, los platos se incubaron a temperatura ambiente (18-26 °C) y con luz natural durante cinco días. Transcurrido ese tiempo, se inició la búsqueda de estructuras tales como hifas, esporas o nematodos parasitados.

Después de identificar la presencia de estas estructuras, se procedió al aislamiento de cada una de ellas. Para ello, se empleó un pincel delgado con un cabello fino en su extremo. Cada estructura hallada fue transferida a placas Petri que contenían medio de cultivo Papa-Dextrosa-Agar (PDA) para favorecer el crecimiento micelial y Ácido láctico al 25 % (p/v) para acidificar el medio con el objeto de evitar el desarrollo de bacterias (Sánchez-Miranda et al., 2021).

Después las placas Petri se incubaron durante siete días a temperatura ambiente y posteriormente se llevó a cabo la fase de purificación y replicación de cada aislamiento. Además, una vez que se purificaron los aislamientos individualmente, se realizó la identificación morfológica de los hongos mediante un análisis comparativo de la morfología de cada hongo, recurriendo a las claves dicotómicas descritas por Cooke y Godfrey (1964); Barnett y Hunter (1998).

Luego, con el objetivo de obtener aislamientos genéticamente puros se procedió a realizar cultivos monospóricos mediante la técnica descrita por Cañedo y Ames (2004), los cuales se incubaron a temperatura ambiente durante cinco días. Finalmente, mediante el "método de conservación en aceite mineral estéril" de Little y Gordon (1967) y adaptado por Deshmukh (2003),

estos hongos se conservaron en viales en una micoteca a una temperatura de 4 °C, con la finalidad de disminuir la tasa metabólica de los hongos.

### **Extracción de ADN, PCR y secuenciación**

A partir de cultivos monospóricos de los hongos aislados se hizo extracción de ADN utilizando la metodología propuesta por Hoyos et al. (2008) con algunas modificaciones. Se verificó la calidad y la cantidad de los ADNs extraídos mediante electroforesis en geles de agarosa al 0.8 % (p/v) teñidos con GelRed 1X y sometidos a luz UV. Para la identificación de los aislamientos se amplificaron diferentes regiones del genoma (ITS, TEF1- $\alpha$ , 1- $\alpha$ , rpb2 y  $\beta$ -tubulina) mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Cada reacción de PCR contenía un volumen total de 25  $\mu$ l distribuido en 7,25  $\mu$ l de agua ultrapura, 2,5  $\mu$ l de DreamTaq buffer 10X, 2,5  $\mu$ l de dNTPs, 2,5  $\mu$ l de cada imprimador (10  $\mu$ M), 0,25  $\mu$ l de enzima DreamTaq polimerasa y 7,25  $\mu$ l de ADN.

Para la identificación de los aislamientos del género *Trichoderma*, se amplificó parcialmente el gen que codifica para el factor de elongación de la traducción 1- $\alpha$  (TEF1- $\alpha$ ). Para ello se utilizaron los cebadores EF-728M (5'-CATYGAGAAGTTCGAGAA GG) y EF-2R (5'-GGARGT ACCAGTSATCATGTT) reportados previamente por Todd (2019); Umaña-Castro et al. (2019).

Para el género *Fusarium* se emplearon dos pares de cebadores, EF1F (5' ATGGGTAAGGARGACAAGAC) y EF2R (5' GGARGTACCAGTSATCATGTT) que amplifican también el TEF1- $\alpha$  y el ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT GCG G) e ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC) que amplifican los espaciadores internos transcritos del ADN ribosomal, según los protocolos propuestos por O'Donnell et al. (1998); Hernández-Medina et al. (2015).

Para los hongos *Penicillium* sp. y *Talaromyces* sp., Benjamin se utilizaron dos pares de cebadores, Bt2a (5' GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC) y Bt2b (5' ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC) que amplifican parcialmente el gen de la  $\beta$ -tubulina, a una temperatura de hibridación de 58°C, y frpb2-5F (5' GAY GAY MGW GAT CAY TTY GG) junto con frpb2-7CR (5' CCC ATR GCT TGY TTR CCC AT) que amplifican una región de la subunidad 2 de la ARN polimerasa, a una temperatura de hibridación de 57°C según lo propuesto por Liu (1999); Rodríguez-Andrade (2020).

En el caso de *P. lilacinum* también se emplearon dos pares de cebadores, Bt2a/Bt2b e ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC) / ITS5 (5' GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG) reportados por Maldonado-Haro (2019); Almaraz-Sánchez et al. (2012) bajo las mismas condiciones de termociclado anteriormente descritas para esos cebadores.

Los productos de PCR se evaluaron por medio de electroforesis en geles de agarosa TopVision al 1 % teñidos con GelRed 1X y sometidos a luz UV. Posteriormente, se enviaron los productos de PCR obtenidos de todos los hongos aislados a la empresa MacroGen Inc. (Corea del Sur) para su purificación y secuenciación en ambas direcciones mediante el método Sanger.

Una vez obtenidas las secuencias 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) y los electroferogramas obtenidos. 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.

### **Análisis de textura y pH de las muestras de suelo**

Para llevar a cabo el análisis textural, se utilizó la metodología propuesta por Bouyoucos (Maldonado-Paucar, 2016; Núñez-Solís, 1996). Una vez calculados los porcentajes de partículas de arena, limo y arcilla, se utilizó el diagrama textural del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA) para determinar la textura de cada muestra de suelo (Nesta-Silva & Rodrigues-Nunes, 2014). En el caso de medición del pH se realizó según la metodología de López-Aguilar et al. (2002). Estos procedimientos se llevaron a cabo con el propósito de establecer posibles relaciones entre estas variables y la presencia de hongos nematófagos en el suelo.

## **Resultados**

### **Identificación morfológica y molecular de hongos nematófagos**

Se logró aislar 12 especies de hongos a partir de las muestras suelo bananero de los cantones de Limón, Guácimo, Pococí, Siquirres y Talamanca. Las especies de hongos identificadas fueron *Trichoderma asperellum*, *Fusarium oxysporum* Snyder y Hansen, *F. pseudocircinatum*, *F. solani*, *Purpureocillium lilacinum*, *Penicillium steckii* y *Talaromyces* sp. (Cuadro 2). El 50 % de los aislamientos fueron del género *Fusarium*, 25 % de *Trichoderma* y un 8,33 % de cada uno de los géneros *Penicillium*, *Purpureocillium* y *Talaromyces*. De los hongos aislados, en la literatura se reporta a *T. asperellum*, *F. oxysporum*, *F. solani* y *P. lilacinum* como HN.

**Cuadro 2.** Identificación molecular de hongos nematófagos aislados de plantaciones comerciales y no comerciales de banano en la Región Hueta Atlántica. (Universidad Nacional, 2023).

**Table 2.** Molecular identification of nematophagous fungi isolated from commercial and non-commercial banana plantations in the Hueta Atlantic Region. (Universidad Nacional, 2023).

Cantón	Código	Identificación*	Región del genoma amplificada	Accesión	País de referencia	Referencia
Limón	Fox1	<i>Fusarium oxysporum</i>	TEF1- $\alpha$ ITS	MN386726	Malasia	Kee et al. (2020)
				MT560381	China	Wang, 2020
	Trich1	<i>Trichoderma asperellum</i>	TEF1- $\alpha$	MZ442656	Paraguay	Florentin, 2022
Siquirres	Fox2	<i>Fusarium oxysporum</i>	TEF1- $\alpha$ ITS	MZ442656	Paraguay	Florentin, 2022
				GU198293	Perú	Samuels et al. (2015)
				MN386726	Malasia	Kee et al. (2020)
Talamanca	Fox4	<i>Fusarium oxysporum</i>	TEF1- $\alpha$ ITS	OR388100	México	Valencia-Yah et al. (2023)
				DQ016213	Estados Unidos	Stewart et al. (2006)
Pococí	Pli	<i>Purpureocillium lilacinum</i>	$\beta$ -tubulina ITS	KY488512	Brasil	Amatuzzi et al. (2017)
				GU980035	Tailandia	Ridkaew et al. (2012)
	Fps	<i>Fusarium pseudocircinatum</i>	TEF1- $\alpha$	MT011003	Países Bajos	Yang et al. (2020)
Guácimo	Trich3	<i>Trichoderma asperellum</i>	TEF1- $\alpha$	MZ442656	Paraguay	Florentin, 2022
	Fox3	<i>Fusarium oxysporum</i>	TEF1- $\alpha$ ITS	KU939031	China	Wang et al. (2018)
Guácimo	Pst	<i>Penicillium steckii</i>	rpb2 $\beta$ -tubulina	KX650039	Brasil	Cardoso et al. (2021)
				KY469196	Canadá	Visagie et al. (2020)
	Tal	<i>Talaromyces</i> sp.	rpb2	KX657522	Estados Unidos	Peterson y Jurjević, 2017
Guácimo	Fsol	<i>Fusarium solani</i>	TEF1- $\alpha$ ITS	MK951834	Sudáfrica	Visagie y Houbraken, 2020
				KF255484	Países Bajos	Van Diepeningen et al. (2014)
				FJ224382	Puerto Rico	Estévez, 2009

\*Identificación obtenida utilizando la herramienta en línea BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (Centro Nacional de Información Biotecnológica).

\*Identification obtained using the NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) online tool.

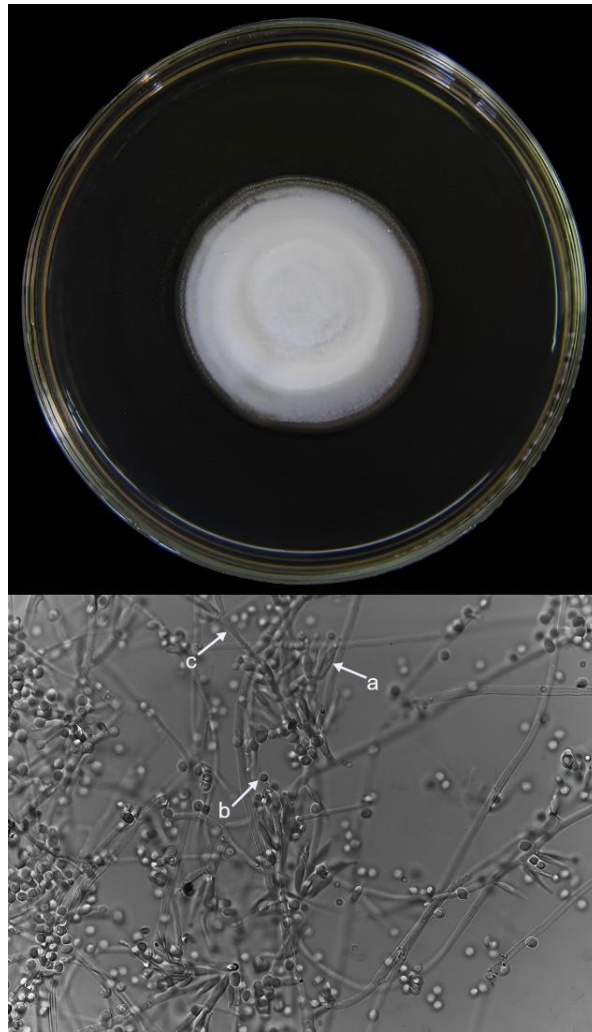
Se logró amplificar con éxito mediante la reacción de la cadena de la polimerasa, (PCR en inglés) las distintas regiones del genoma seleccionadas para el análisis molecular (ITS, TEF1- $\alpha$ , rpb2 y  $\beta$ -tubulina) que permitieron la correcta identificación a nivel de especie de los hongos aislados. El único aislamiento que no se pudo identificar molecularmente a nivel de especie fue *Talaromyces* sp. (Tal).

A continuación, se realiza una descripción morfológica y molecular de cada uno de los hongos aislados e identificados.



## ***Purpureocillium lilacinum***

Se identificó el hongo *P. lilacinum* (Pli) en la muestra de suelo recolectada en el cantón de Talamanca. A partir del quinto día de incubación, el hongo presentó la formación de micelio en la placa Petri. Dos días después, se observó un desarrollo micelial de 4 cm de diámetro, de color blanco, de apariencia algodonosa y rápida esporulación (Figura 1).



**Figura 1.** Estructuras de caracterización morfológica y microscópica del hongo *Purpureocillium lilacinum* en medio PDA. a. Fiálides. b. Conidios. c. Conidióforos de *P. lilacinum* (Pli) de Talamanca. (Universidad Nacional, 2023).

**Figure 1.** Morphological and microscopic characterization structures of the fungus *Purpureocillium lilacinum* in PDA medium. a. Phialides. b. Conidia. c. Conidiophores of *P. lilacinum* (Pli) from Talamanca. (Universidad Nacional, 2023).

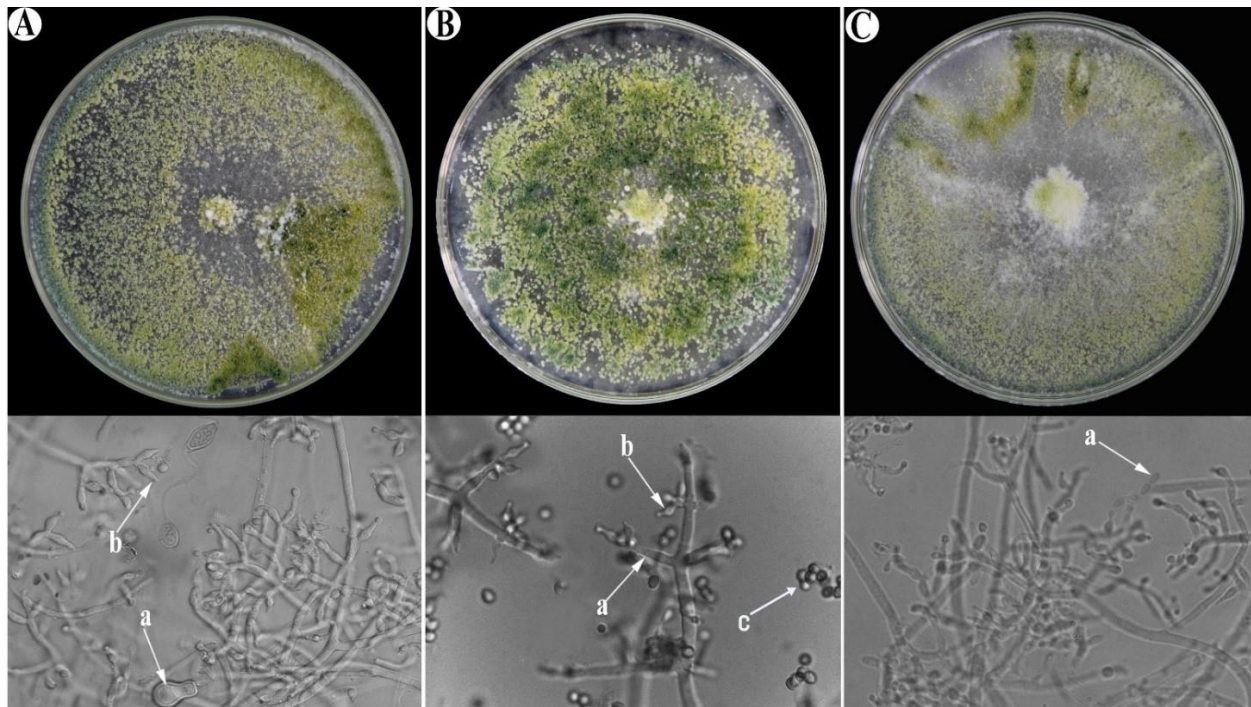
En los días siguientes a la esporulación, el hongo adquirió una tonalidad lilácea con un crecimiento expandido.

Morfológicamente, se observó la presencia de fiálides hinchadas en la base, las cuales se estrechaban hacia las puntas (Figura 1a). En estas estructuras, se observó la presencia de conidios unicelulares con forma globosa (Figura 1b). Los conidióforos de *P. lilacinum* eran erectos y agrupados formando ramificaciones. Estos conidióforos libres son llamados también verticilados debido a su disposición en verticilos (Figura 1c) que constan de ramas y fiálides.

Con base a las secuencias de ADN, *P. lilacinum* (Pli) presentó un nivel de homología del 99,7 % (303pb/304pb) de la secuencia parcial del gen de la  $\beta$ -tubulina y una cobertura de 100 % con respecto a *P. lilacinum* (KY488512) reportado en Brasil. Además, este mismo aislamiento presentó 100 % de homología (560pb/560pb) y cobertura de la región ITS de su ADN ribosomal con *P. lilacinum* (GU980035) reportado en Tailandia.

### ***Trichoderma asperellum***

Los aislamientos de *T. asperellum*, Trich1 y Trich2 se obtuvieron a partir de muestras de suelo del cantón de Limón, mientras que el aislamiento Trich3 se aisló de muestras de suelo del cantón de Pococí. Las Figuras 2A, 2B, y 2C ilustran los aislamientos de *T. asperellum* obtenidos en las distintas localidades que se caracterizaron por presentar colonias con micelio plano y compacto.



**Figura 2.** Estructuras de caracterización morfológica y microscópica de especies del hongo *Trichoderma asperellum* en medio PDA. A. a. Clamidosporas y A. b. Fiálides de *T. asperellum* (Trich3) de Pococí. B. a. Ramificaciones de conidióforos. B. b. Fiálides y B. c. Conidios of *T. asperellum* (Trich2) de Limón. C. a. Conidios de *T. asperellum* (Trich1) de Limón. (Universidad Nacional, 2023).

**Figure 2.** Morphological and microscopic characterization structures of *Trichoderma asperellum* fungus species in PDA medium. A. a. Chlamydospores and A. b. Phialides of *T. asperellum* (Trich3) from Pococí. B. a. Conidiophores branches. B. b. Phialides and B. c. Conidia of *T. asperellum* (Trich2) from Limon. C. a. Conidia of *T. asperellum* (Trich1) from Limón. (Universidad Nacional, 2023).

Estas colonias exhibieron un crecimiento rápido, alcanzando diámetros de 6 a 8 cm en tan solo cinco días, y posteriormente cubrieron por completo la superficie de los medios de cultivo de 9 cm de diámetro.

Inicialmente, el hongo en el plato Petri mostró un color blanco que posteriormente fue adquiriendo una tonalidad verde con una esporulación generalizada. Las colonias presentaron de dos a tres anillos concéntricos bien definidos: uno blanco que correspondió al micelio y otros verdes que representaban los conidios. La pigmentación de los aislamientos varió de una tonalidad verde claro a verde oscuro típico de este género.

Los resultados de las observaciones microscópicas de los aislamientos Trich1, Trich2 y Trich3 revelaron varios rasgos distintivos. Se observaron clamidosporas (Figura 2.A.a) en

abundancia con una forma globosa. También fiálides dispuestas en grupos de tres (Figura 2.B.b) a lo largo del conidióforo el cual presentaba ramificaciones no muy abundantes (Figura 2.B.a). Estas fiálides se caracterizaron por ser más anchas en el centro que en la base (Figura 2.A.b) y su ápice presentaba forma curva. Además, estas estructuras presentaban conidios de forma elipsoidal (Figura 2.B.c) de coloración verde, dispuestos en grupos de 6.

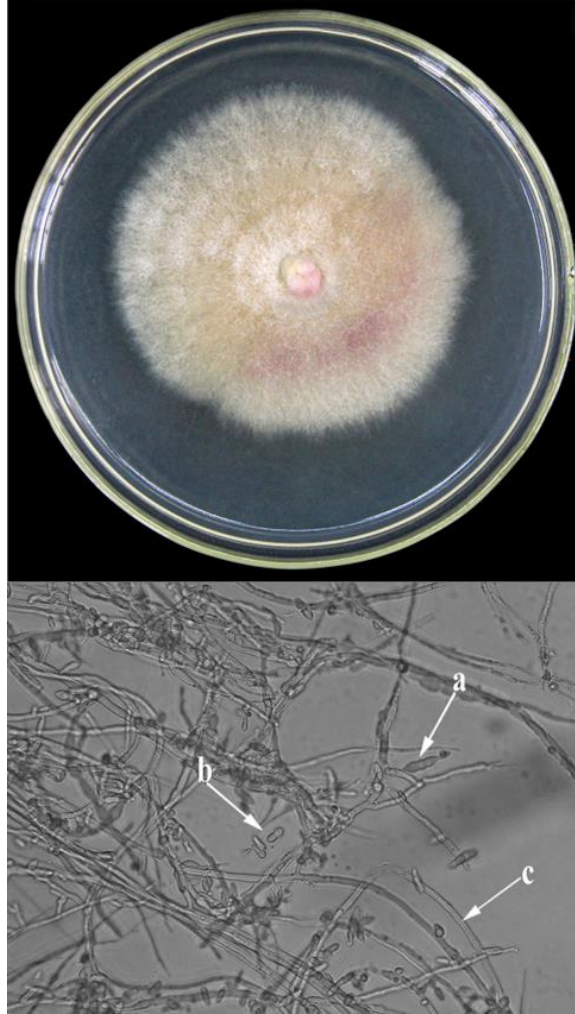
La secuencia de nucleótidos de los productos amplificados de la región TEF1- $\alpha$  de los aislamientos Trich1 y Trich3 presentaron 100 % de cobertura y homología de secuencia, 550pb/550pb y 551pb/551pb respectivamente, con *T. asperellum* (MZ442656) reportado en Paraguay, mientras que Trich2 mostró sólo 98,2 % (546pb/556pb) de similitud con esa misma accesión. Adicionalmente, Trich2 también mostró 100 % de similitud (532pb/532pb) con *T. asperellum* (GU198293) reportado en Perú.

### ***Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Fusarium pseudocircinatum***

Los aislamientos de *F. oxysporum* (Fox1, Fox2, Fox3 y Fox4) se recolectaron de muestras de suelo provenientes de los cantones de Limón, Siquirres, Guácimo y Talamanca. De las muestras obtenidas de Pococí y Guácimo, se identificaron las especies *F. pseudocircinatum* (Fps) y *F. solani* (Fsol) respectivamente.

La especie *F. oxysporum* tuvo un desarrollo micelial algodonoso abundante, de coloración blanquecina los primeros días de crecimiento. Debido al desarrollo de los conidios, cambió a un tono morado (Figura 3).

Este hongo produjo muchos macroconidios y microconidios. Los macroconidios eran hialinos y curvos (Figura 3a). En el caso de los microconidios, la mayoría carecían de septos y presentaban una forma ovalada (Figura 3b).



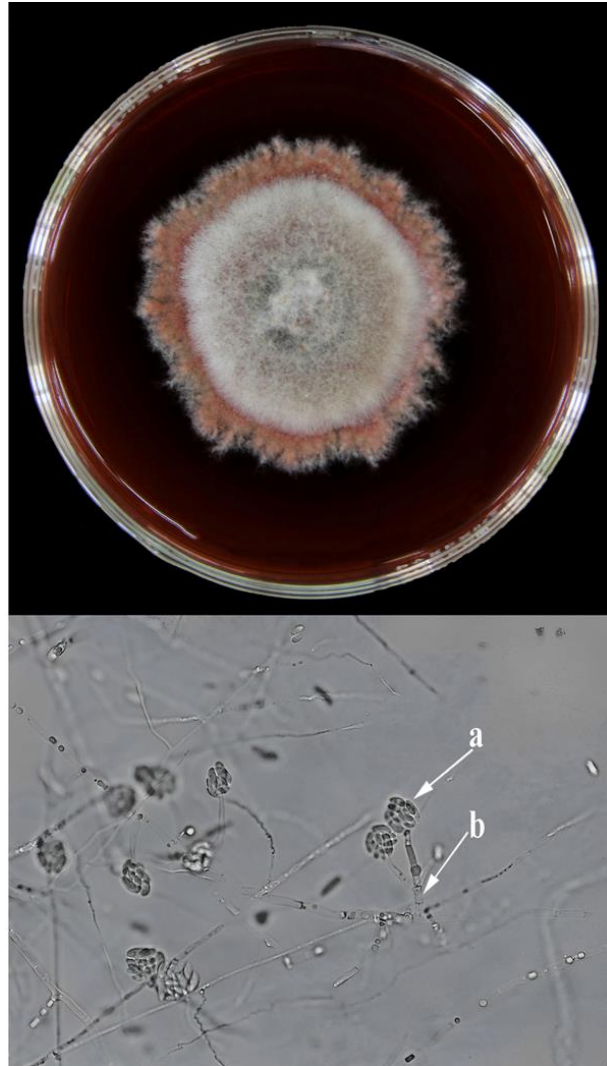
**Figura 3.** Estructuras de caracterización morfológica y microscópica del hongo *F. oxysporum* (Fox2) de Squirres en medio PDA. a. Macroconidios. b. Microconidios y c. Red de hifas. (Universidad Nacional, 2023).

**Figure 3.** Morphological and microscopic characterization structures of the fungus *F. oxysporum* (Fox2) from Squirres in PDA medium. a. Macroconidia. b. Microconidia and c. Hyphal network. (Universidad Nacional, 2023).

La secuencia de nucleótidos de la región TEF1- $\alpha$  de los aislamientos Fox1, Fox2, Fox3 y Fox4 presentaron 100 % de homología de secuencia (500pb/500pb, 654pb/654pb, 654pb/654pb y 661pb/661pb, respectivamente) y cobertura de 100 % con *F. oxysporum* (MN386726) reportado en Malasia. Adicionalmente, el aislamiento Fox1 presentó 100 % de cobertura y similitud (499pb/499pb) de la región ITS, con un aislamiento de *F. oxysporum* (MT560381) reportado en China, así como con otras accesiones del GenBank. El aislamiento Fox2 presentó 100 % de cobertura y similitud (503pb/503pb) de la región ITS con *F. oxysporum*

(OR388100) reportado en México mientras que la región ITS del aislamiento Fox3 presentó 99,81 % de homología (539pb/545pb) con un aislamiento de *F. oxysporum* (KU939031) reportado en China. Además, el aislamiento Fox4 presentó 100 % de homología de la región ITS con un aislamiento de *F. oxysporum* (DQ016213) reportado en Estados Unidos.

En el caso de *F. solani* (Fsol) procedente de muestras de suelo del cantón de Guácimo, mostró a partir del quinto día de incubación, abundante micelio aéreo, algodonoso y blanco con pigmentación en la base color rojizo (Figura 4).

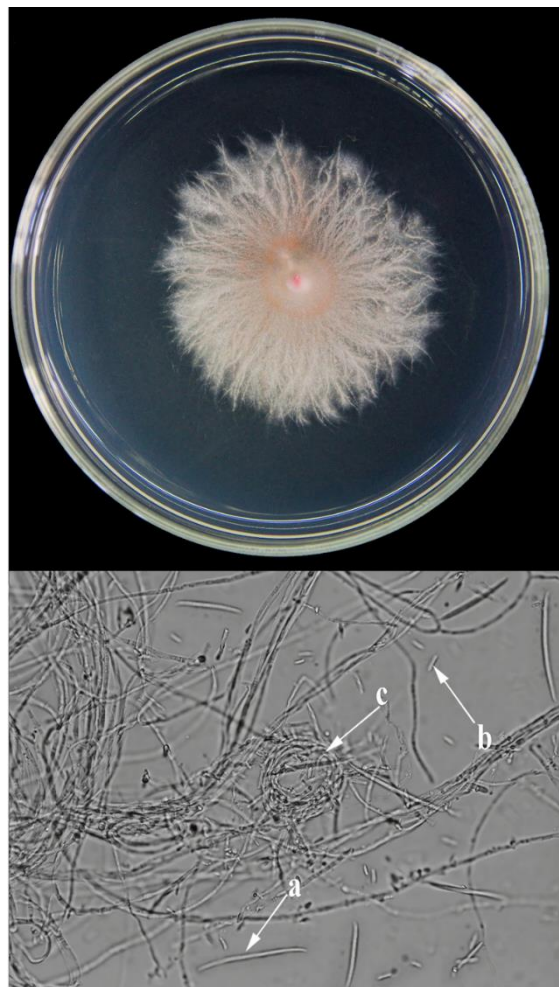


**Figura 4.** Estructuras de caracterización morfológica y microscópica del hongo *F. solani* (Fsol) de Guácimo en medio PDA. a. Microconidios y b. Conidióforos. (Universidad Nacional, 2023).

**Figure 4.** Morphological and microscopic characterization structures of the fungus *F. solani* (Fsol) from Guácimo in PDA medium. a. Microconidia and b. Conidiophores (Universidad Nacional, 2023).

Presentó abundantes microconidios, unicelulares los cuales estaban ubicados en falsas cabezas (Figura 4a) a partir de monofiálides alargadas sobre conidióforos (Figura 4b) no ramificados. Este aislamiento presentó homología de secuencia y cobertura del 100 % (688pb/688pb) de la región TEF1- $\alpha$  con *F. solani* (KF255484) reportado en Los Países Bajos y 100 % de homología de la región ITS con *F. solani* (FJ224382) reportado en Puerto Rico.

Las colonias de *F. pseudocircinatum* (Fps) provenientes de muestras de suelo de Pococí presentaron micelio algodonoso de color rosado que posteriormente se tornó de color morado principalmente en el centro de la colonia (Figura 5).



**Figura 5.** Estructuras de caracterización morfológica y microscópica de especies del hongo *F. pseudocircinatum* (Fps) de Pococí en medio PDA. a. Macroconidios. b. Microconidios y c. Hifas enrolladas. (Universidad Nacional, 2023).

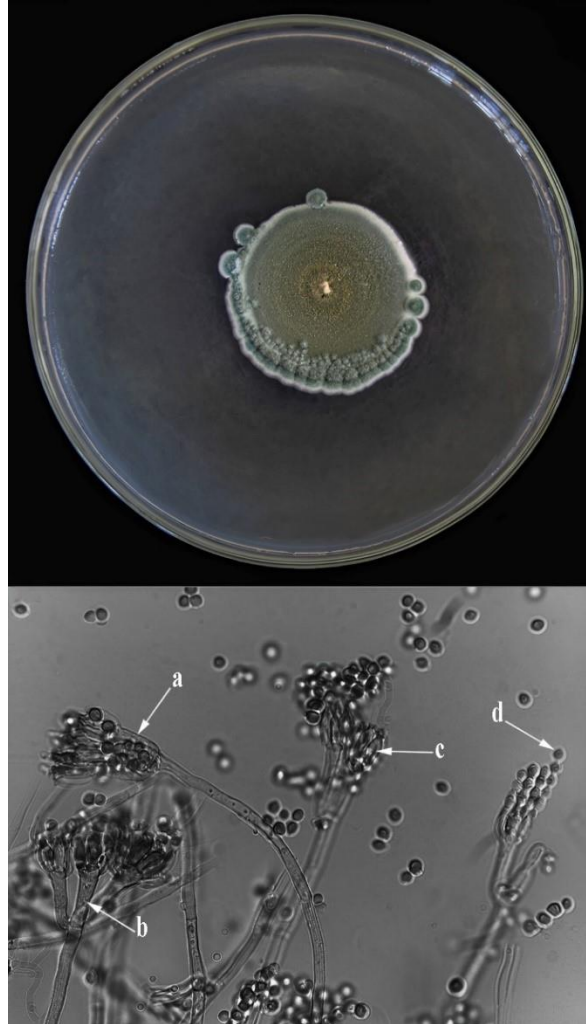
**Figure 5.** Morphological and microscopic characterization structures of the fungus *F. pseudocircinatum* (Fps) from Pococí in PDA medium. a. Macroconidia. b. Microconidia and c. Coiled hyphae. (Universidad Nacional, 2023).

Adicionalmente, presentó escasos macroconidios, alargados y delgados (Figura 5a) con célula apical puntiaguda, ligeramente curvados. También mostró microconidios ovoides y sin septos (Figura 5b), con hifas en forma espiral enrolladas (Figura 5c), característica de gran relevancia taxonómica para la identificación de esta especie. El análisis de secuencias de la región TEF1- $\alpha$  de Fps mostró homología del 99,7 % y 100 % de cobertura (664pb/666pb) con diferentes secuencias de *F. pseudocircinatum*, entre ellas MT011003 y MN386745 reportadas en Los Países Bajos y Malasia respectivamente.

### ***Penicillium steckii***

*P. steckii* (Pst) se aisló de muestras de suelo procedentes del cantón de Guácimo. Este hongo presentó un crecimiento circular de 4 cm y un micelio de color verde a turquesa con bordes blancos. En el lado inferior, la tonalidad fue de color crema. También se caracterizó por presentar conidióforos monoverticilados (Figura 6b) que formaban conidios esféricos en cadena en una estructura ramificada similar a un pincel (Figura 6d). Además, se observaron tres estructuras llamadas métulas (Figura 6a), con células terminales llamadas fiálides (Figura 6c).





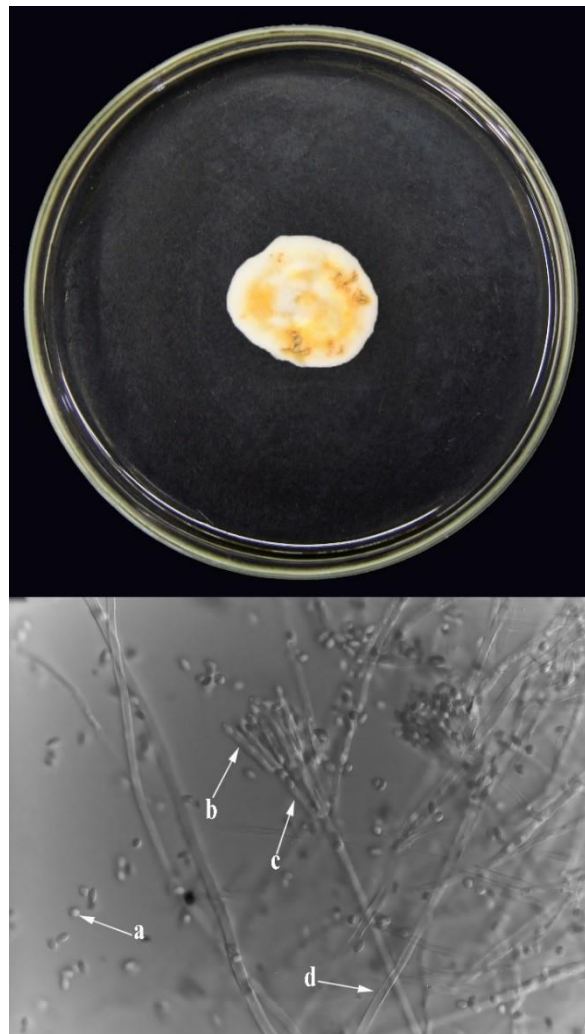
**Figura 6.** Estructuras de caracterización morfológica y microscópica del hongo *Penicillium steckii* (Pst) de Guácimo en medio PDA. a. y b. Métulas. c. Fiálides y d. Conidios. (Universidad Nacional, 2023).

**Figure 6.** Morphological and microscopic characterization structures of the fungus *Penicillium steckii* from Guacimo in PDA medium. a. y b. Metulas. b. Conidiophores. c. Phialides and d. Conidia. (Universidad Nacional, 2023).

Este hongo presentó homología de secuencia del 99,9 % (911pb/912pb) de la región *rpb2* con *P. steckii* (KX650039) reportado en Brasil, mientras que la secuencia parcial del gen de la  $\beta$ -tubulina de este mismo aislamiento, presentó 100 % de homología (442pb/442pb) con *P. steckii* (KY469196) reportado en Canadá.

## ***Talaromyces* sp.**

*Talaromyces* sp. (Tal) se aisló de muestras de suelo procedentes del cantón de Guácimo. Este hongo mostró un diámetro de 3 cm a partir del quinto día de incubación, presentó un micelio de color blanco que posteriormente cambió a color amarillo (Figura 7) con una rápida esporulación en pocos días. Sus conidióforos eran largos y cilíndricos, relativamente estrechos (Figura 7. c). Además, presentó fiálides unicelulares dispuestas en verticilos no ramificados (Figura 7. b) a partir de las cuales se producen conidios de forma elipsoidal (Figura 7.a).



**Figura 7.** Estructuras de caracterización morfológica y microscópica del hongo *Talaromyces* sp. (Tal) de Guácimo en medio PDA. a. Conidios. b. Fiálides. c. Métulas y d. Red de hifas de *Talaromyces* sp. (Universidad Nacional, 2023).

**Figure 7.** Morphological and microscopic characterization structures of the fungus *Talaromyces* (Ta1) from Guácimo sp. in PDA medium. a. Conidia. b. Phialides, c. Metulas and d. *Talaromyces* sp. hyphal network (Universidad Nacional, 2023).

La secuencia parcial del gen de la  $\beta$ -tubulina de *Talaromyces* sp. (Tal) mostró baja cobertura lo que resultó en una homología reducida, donde alcanzó un 96,74 % (356pb/368pb) con valores similares a los reportados en Sudáfrica (MK951834) para este mismo hongo. Asimismo, la secuencia parcial del gen de la rpb2 de este mismo aislamiento presentó baja cobertura y homología del 93,97 % (950 pb/1011pb), con *Talaromyces delawarensis* (KX657522) reportado en Estados Unidos, así como con otras especies de *Talaromyces*.

### Relación de pH y textura con la presencia de los hongos nematófagos

Se analizaron seis muestras de suelo provenientes de cinco cantones de la región Huetar Atlántica de Costa Rica, donde se determinó la textura del suelo y los niveles de pH los cuales pueden tener alguna relación con la ocurrencia de HN. Todas las localidades compartieron características similares en cuanto a la textura del suelo franco, con una mezcla equilibrada entre partículas de arena, limo y arcillas.

Se observó que tanto la localidad de Bajo Coen en el Cantón de Talamanca, como Lomas en el Cantón de Pococí, tienen texturas franco-arenosas, es decir, existe presencia significativa de partículas de arena en la textura del suelo. Las demás localidades y cantones mostraron textura franco-limosa (Cerere, Limón), franco-arcillosa (Tortuguero, Pococí), franco-arcillolimosa (El Carmen, Siquirres) y franca (Duacaré N°2, Guácimo). Con respecto a los valores de pH, estuvieron en el rango de 7,0 a 7,3 por lo que se consideran ligeramente alcalinos o básicos, pero se encuentran muy cerca del punto neutral en la escala de pH (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Valores de pH y textura de los suelos a partir de las muestras analizadas. (Región Huetar Atlántica, Costa Rica. 2021).

**Table 3.** pH values and soil texture from the samples analyzed. (Huetar Atlantic Region, Costa Rica. 2021).

Cantón	Localización	Textura	pH
Limón	Cerere	Franco-limosa	7,2
	Tortuguero	Franco-arcillosa	7,0
Pococí	Lomas	Franco-arenosa	7,2
	El Carmen	Franco-arcillolimosa	7,3
Guácimo	Duacaré N°2	Franca	7,3
Talamanca	Bajo Coen	Franco-arenosa	7,0

## Discusión

En el proceso de identificación molecular no se logró identificar *Talaromyces* a nivel de especie, ya que, se obtuvo bajo porcentaje de cobertura y homología de las secuencias obtenidas ( $\beta$ -tubulina y rpb2) con las de las especies reportadas en el GenBank. Este inconveniente puede atribuirse a la escasa información disponible en la base de datos analizada respecto a este aislamiento. Además, es probable que las regiones amplificadas en este estudio no proporcionaran información específica de este hongo.

En lo que respecta a factores antagonistas utilizados por las especies de hongos identificadas en este estudio para el control biológico, se destaca la producción de metabolitos con capacidad nematocida, como se ha demostrado en otros estudios (Gezgin et al., 2020; Maheshwary et al., 2022; Lyubenova et al., 2023). Además, se ha observado que estos metabolitos pueden inducir deformaciones y limitar la movilidad de los nematodos (Carranza-González, 2014).

El hongo *Trichoderma* spp. sobresale como uno de los agentes de control biológico más efectivos y utilizados, principalmente por su habilidad micoparasítica (Chaves, 2006). Esta capacidad radica en que logra adherirse al hospedero y envolver sus hifas alrededor de él, así como formar estructuras similares a apresorios que logran penetrar las células hospederas y finalmente provocan colapso del hospedero (Todd, 2019). También presentan capacidad antagonista contra nematodos (Rojas-Villacorta et al., 2017; Moo-Koh, 2018) debido a la producción de metabolitos secundarios (Rivera-Méndez et al., 2018).

Dentro del género *Fusarium* existen especies saprófitas que actúan como biocontroladores, como *F. solani* el cual ha sido probado contra huevos y juveniles de *Nacobbus aberrans*, parasitándolos en un 86 y 90 % respectivamente, sin mostrar patogenicidad en plantas de Chile (*Capsicum annuum*) (Cortez-Hernández et al., 2019) y *F. oxysporum*, que puede inducir en la planta hospedera resistencia sistémica contra diferentes nematodos (Manobanda-Duche 2022) o también estimular la producción de metabolitos, al igual que *Trichoderma*, que inhiben el desarrollo de nematodos fitoparásitos y estimulan la producción de compuestos de defensa en las plantas contra patógenos (Morales-García, 2014; Cortez-Hernández, 2019).

Algunos hongos como *Trichoderma* y *Fusarium* tienen la capacidad de crear “biofilms” o biopelículas en las raíces, las cuales son complejas comunidades creadas por una variedad de microorganismos, entre los cuales se incluyen hongos (Triveni, 2012). Estos hongos poseen la capacidad de establecer interacciones simbióticas con las plantas y de formar colonias

microbianas. Estas interacciones beneficiosas pueden contribuir al control de patógenos y estimular el crecimiento de las plantas (Aguilar-Marcelino et al., 2021).

Las cinco localidades muestreadas en este estudio mostraron suelos de textura franco, lo cual promueve la retención y disponibilidad de nutrientes para diversos organismos edáficos, incluidos los hongos (Capcha-Ospina, 2017; Jiménez-Zappa, 2013). Además, el tipo de suelo influye en la composición y función de las especies de hongos, ya que la mayoría se desarrollan mejor en ambientes ácidos (Ferreri, 2020). Sin embargo, algunos hongos como *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp. y *Penicillium* sp., se pueden encontrar en suelos de textura franco-arenosa, franco arcillosa y arenosa, con pH alcalino (Macías-Echeverri et al., 2019) lo cual podría estar asociado principalmente a su función antagónica en el suelo. Las condiciones edáficas y de pH, están estrechamente relacionados con factores ambientales y la cantidad de materia orgánica, los cuales desempeñan un papel fundamental en la distribución y ocurrencia de HN (Gortari et al., 2007).

La ocurrencia de HN en este estudio, podría estar relacionada con la notable capacidad de adaptación de estos organismos a diferentes rangos de pH. Un ejemplo destacado es *Trichoderma* spp., que demuestra la habilidad de crecer en suelos con un amplio rango de pH, desde 5,5 hasta 8,5. Aunque no son estrictos en cuanto al pH del suelo, sus valores óptimos se sitúan entre 5,5-6,5, lo que sugiere una preferencia por ambientes ligeramente ácidos (Martínez et al., 2013). Esta flexibilidad ambiental podría explicar la presencia de HN en condiciones de variabilidad de pH del suelo como lo encontrados en este estudio.

En esta investigación, los valores de pH obtenidos difieren del rango óptimo recomendado para el desarrollo de *Fusarium* spp., el cual se encuentra entre 3,8 a 5,0 (Pérez-Rivera, 2014) a pesar de que los resultados de textura del suelo si se relacionan con los requeridos para la ocurrencia de estos hongos, en suelos de textura fina, franco y arenosa. No obstante, la mayoría de las especies de *Fusarium*, tienen la capacidad adaptarse a diversas condiciones agroambientales como un amplio rango de pH entre 2,0 a 9,0 y en ocasiones pH superiores, debido a que este factor no incide en su desarrollo micelial (López-Courrau et al., 2018). Esta situación podría también explicar la presencia de este hongo en las muestras de suelo con pH alcalino en los cantones Limón, Siquirres, Guácimo y Talamanca.

Con respecto al hongo *P. lilacinum* el cual fue aislado de muestras de suelo del cantón de Talamanca el análisis de pH fue de 7,0. Este hongo presenta una gran tolerancia al pH, debido a que el pH óptimo para su desarrollo es de 2,0 a 10,0 (Manobanda-Duche, 2022), por lo que puede adaptarse a diferentes condiciones de suelo.

Finalmente, los hallazgos de este estudio proporcionan información valiosa sobre la diversidad y potencial de los HN en el control de plagas y enfermedades en cultivos de banano. Además, destaca la importancia de realizar análisis relacionados al desarrollando estrategias efectivas para su identificación como las utilizadas en esta investigación y a la implementación y aplicación en programas de manejo integrado de plagas.

## **Conclusiones**

En esta investigación, se lograron identificar hongos nematófagos en plantaciones de banano de la región Huetar Atlántica de Costa Rica. La diversidad de microorganismos hallados en el suelo, indica la existencia de efectos beneficiosos para el cultivo asociados a estos hongos.

La identificación precisa de estos antagonistas mediante diversos criterios establece la base para que investigaciones futuras puedan explorar su potencial como agentes de control de nematodos fitoparásitos, no solo en cultivos de musáceas, sino también en otros sistemas productivos especialmente en países en desarrollo.

Se recomienda según los resultados, amplificar y secuenciar otras regiones del genoma para este hongo y así obtener un estudio genético más completo y detallado que permita la identificación a nivel de especie ya que en las bases de datos de secuencias genéticas no existe suficiente información sobre este aislamiento.

Este estudio resalta la necesidad de realizar investigaciones adicionales sobre los HN en plantaciones de banano y otros cultivos en la región. Las perspectivas futuras del uso de HN como agentes de control biológico son muy prometedoras, ya que cada vez se utilizan más en programas de manejo integrado de plagas, debido a la preocupación que existe por los efectos negativos que provocan los pesticidas sintéticos al medio ambiente y a la salud humana.

La investigación en este campo avanza rápidamente y se descubren nuevos antagonistas de nematodos fitoparásitos, así como su mecanismo de acción. Además, se están desarrollando nuevas tecnologías para producir y aplicar estos agentes de manera más eficiente y rentable.

## **Agradecimientos**

Los autores desean agradecer toda la ayuda brindada al ingeniero agrónomo Jefferson Aráuz Badilla de la Escuela de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener algún conflicto de interés.

## Referencias

- Acuña-Segura, R. y Brenes-Madriz, J. (2020). Evaluación en casa malla del efecto de cuatro productos biológicos para el combate de jobotos (*Phyllophaga* sp.). *Revista Tecnología en Marcha*, 33(4), 140-154. <https://doi.org/10.18845/tm.v33i4.4376>
- Aguilar-Marcelino, L., Al-Ani, L.K.T., Soares, F.E.F., Moreira, A.L.E., Téllez-Téllez, M., Castañeda-Ramírez, G.S., Acosta-Urdapilleta, M.L., Díaz-Godínez, G., & Pineda-Alegría, J.A. (2021). "Formation, resistance, and pathogenicity of fungal biofilms: current trends and future challenges," *In: Recent Trends in Mycological Research*, Volume 1: Agricultural and Medical Perspective, Fungal Biology, 411-438. [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-60659-6\\_18](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-030-60659-6_18)
- Ali, A., Eldeeb, A., Ramadan, M., & El-Ashry, R. (2022). Nematicidal Effect of Three *Trichoderma* spp. on the Suitability of Tomato Plants for *Meloidogyne incognita* Reproduction. *Egyptian Journal of Agronomy*, 21(2), 59-78. Doi: [10.21608/EJAJ.2022.257669](https://doi.org/10.21608/EJAJ.2022.257669)
- Almaraz-Sánchez, A., Alvarado-Rosales, D., Tlapal-Bolaños, B. & David-Espinoza, V. (2012). Identificación de hongos antagonistas a *Phytophthora cinnamomi* Rands en bosques de encino del Arrayanal, Colima y Tecoaapa, Guerrero. *Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente*, 18(3), 341-355. <https://doi.org/10.5154/r.rchscfa.2011.09.061>
- Álvarez-Ortega, V. & Gutiérrez-Miranda, C. (2022) *Uso de Purpureocillium lilacinum, Trichoderma harzianum y Pimenta dioica* (L.) Merrill para control de nematodos en plátano (*Musa paradisiaca* L.), en el centro experimental El Plantel. [Tesis Licenciatura, Universidad Nacional Agraria]. Repositorio de la Universidad Nacional Agraria de Nicaragua. <https://repositorio.una.edu.ni/id/eprint/4510>
- Amatuzzi, R.F., Poitevin, C.G., Poltronieri, A.S., Zawadneak, M.A.C. & Pimentel, I.C. (2017). Potencial de hongos endofíticos como agentes de biocontrol de *Duponchelia fovealis* Zeller (Lepidoptera: Crambidae). *Brazilian Journal of Biology*, 10(1), 18. <https://doi.org/10.1590/1519-6984.166681>
- Anama, Y., Díaz, R., Duarte, D., & Lagos, T. (2021). Morphological and pathogenic characterization of *Fusarium oxysporum* in Lulo (*Solanum* spp.). *Revista de Ciencias Agrícolas*, 38(1), 20-37. <https://doi.org/10.22267/rcia.213801.142>

- 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. 218p.
- Barrón, G. L. (1977). *The nematode destroying fungi*. Lancaster, Pennsylvania. USA. Lancaster Press, Inc. 140 p.
- Cañedo, V., y T. Ames. (2004). *Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos*. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, 62 p. <http://www.cipotato.org/library/pdfdocs/AN65216.pdf>.
- Cañizares-Monteros, C. (2003). *Estudio sobre poblaciones de hongos endofíticos provenientes de suelos supresivos al nematodo barrenador *R. similis* (Cobb) Thorne en plantaciones comerciales de plátano en la zona de Talamanca, Costa Rica*. [Tesis de Maestría, CATIE]. Repositorio del CATIE. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/5562>
- Capcha-Ospina, E. (2017). *Eficiencia de hongos nematófagos en el control de *Meloidogyne exigua* Goeldi, en vivero de *Coffea arabica* L. variedad catimor*. [Tesis Licenciatura, Universidad Nacional del Centro del Perú]. Repositorio Institucional UNCP. <http://hdl.handle.net/20.500.12894/4027>
- Cardoso, E., Ferreira, D., Moreira, G., Pfenning, L., Rodrigues-Filho, E. & Abreu, Lucas. (2021). MALDI-TOF mass spectrometry–based identification of Eurotiales from different substrates and locations in Brazil. *Mycological Progress*, 20. 539-548. [10.1007/s11557-021-01691-y](https://doi.org/10.1007/s11557-021-01691-y)
- Carranza-González, G. A. (2014). *Evaluación in vitro de la patogenicidad del hongo *Paecilomyces lilacinus* sobre el nemátodo *Pratylenchus* sp.* [Tesis Licenciatura, Universidad Rafael Landívar]. Repositorio Digital Landivariano. <http://biblio3.url.edu.gt/Tesario/2014/06/14/Carranza-Gustavo.pdf>
- Cedeño-Franco, M. J. (2017). *Determinación de los costos del uso de nematicidas en el cultivo de banano en la hacienda Adriana Carolina, del cantón Valencia, provincia de Los Ríos*. [Tesis de Bachillerato, Universidad Técnica Estatal de Quevedo]. Repositorio UTEQ. <http://repositorio.uteq.edu.ec/handle/43000/3351>
- Chaves-Méndez, N. P. (2007). *Utilización de bacterias y hongos endofíticos para el control biológico del nemátodo barrenador *Radopholus similis* (Cobb) Thorne*. [Tesis de Maestría, Catie, Costa Rica]. Repositorio del CATIE. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/5635>
- Chaves-García, M. O. (2006). *Producción de *Trichoderma* sp. y evaluación de su efecto en cultivo de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*)*. [Tesis de Licenciatura, Pontificia Universidad



- Javeriana, Colombia]. Repositorio Universidad Javeriana.  
<https://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8312>
- Chinchilla-Salazar, G., Blanco-Meneses, M., & Castro-Zúñiga, Ó. (2020). Identificación molecular y morfológica de las especies de *Fusarium* spp., asociadas al cultivo de pimienta negra (*Piper nigrum*) en Sarapiquí y Guatuso en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 44(2), 1-30. <http://dx.doi.org/10.15517/rac.v44i2.43087>
- Cole, G. & Kendrick, B. (1981). *Biology of Conidial Fungi* (en línea). Academia Press. EUA. 660 p. Disponible en <https://books.google.es>.
- Cooke, R. & Godfrey, B. (1964). A key to the nematode-destroying fungi. *Transactions of the British Mycological Society*, 47(1), 61-74. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(64\)80081-4](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(64)80081-4)
- Cortez-Hernández, M. A., Rojas-Martínez, R., Pérez-Moreno, J., Ayala-Escobar, V., Silva-Valenzuela, M. & Zavaleta-Mejía, E. (2019). *Control biológico de Nacobbus aberrans mediante hongos antagonistas*. [Tesis de Maestría, Institución de enseñanza e investigación en Ciencias Agrícolas] *Nematropica*, 49, 140-151. Repositorio del Colegio de Postgraduados. <http://colposdigital.colpos.mx:8080/xmlui/handle/10521/3189>
- Deshmukh, S. (2003). The Maintenance and Preservation of Keratinophilic Fungi and Related Dermatophytes. *Mycoses*, 46, 203-207. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0507.2003.00860.x>
- Espinel-Correal, C., Torres-Torres, L., Villamizar-Rivero, L., Bustillo-Pardey, A., Zuluaga-Mogollón, I. & Cotes-Prado, A. (2018). Hongos entomopatógenos en el control biológico de insectos plaga. *Agrosavia*, 1, 594-599. <https://www.researchgate.net/publication/329247684>
- Estévez, C., & Abad, G. (2009). *Fusarium solani* species complex newly identified to cause root rot in hydroponically grown lettuce and cilantro in Puerto Rico. *Plant Pathology*, 58(4), 801-801.
- 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. [https://revistas.uptc.edu.co/index.php/pensamiento\\_accion/article/view/10201](https://revistas.uptc.edu.co/index.php/pensamiento_accion/article/view/10201)
- Ferreri, N. (2020). *Caracterización de la microbiota de suelos salino-sódicos de cangrejales de la Reserva Campos del Tuyú Prov. de Buenos Aires: Su potencial como fuente de enzimas de interés biotecnológico*. [Tesis Doctorado, Universidad Nacional de La Plata]. Repositorio Institucional de la Universidad Nacional de La Plata. <https://doi.org/10.35537/10915/121954>

- Florentin, M. (2022). FLOR Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Mcal. López, San Lorenzo, Paraguay. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MZ442656.1>
- Gezgin Y., Gül D., Şenşatar S., Kara C., Sargın S., & Sukan F. (2020). Evaluation of *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma citrinoviride* growth profiles and their potentials as biocontrol agent and biofertilizer. *Turkish Journal of Biochemistry*, 45(2),163-175. <https://doi.org/10.1515/tjb-2018-0378>
- Gómez, M., Mario, J., & Rojas, M. (2008). Efecto de dos especies de hongos simbioses en el crecimiento de plátano (*Musa AAB*) cv “Curraré” y el control del nematodo barrenador *R. similis* Cobb. *Revista Tumbaga*, 3, 30-42. <http://repository.ut.edu.co/handle/001/1353>.
- Gortari, C., Cazau, C., & Hours, R. (2007). Hongos nematófagos de huevos de *Toxocara canis* en un paseo público de La Plata, Argentina. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24(1), 24-28. [https://doi.org/10.1016/S1130-1406\(07\)70005-0](https://doi.org/10.1016/S1130-1406(07)70005-0)
- Hernández-Medina, C., Velasco Belalcázar, M., Gómez-López, E., & Henao-Henao, E. (2015). Caracterización morfológica y molecular de aislados de *Fusarium* asociadas aguacate (*Persea americana* Mill), en el Valle del Cauca. *Fitopatología Colombiana*, 39(2), 51.
- 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. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/agrocol/article/view/11477>
- Jiménez-Saa, H. (1982). Anatomía del sistema de clasificación Holdridge (zonas de vida, utilización de la tierra, formaciones vegetales). *Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza*. Turrialba Costa Rica. Repositorio CATIE. <https://repositorio.catie.ac.cr/handle/11554/401>
- Jiménez-Zappa, R. (2013). *Diversidad de géneros de hongos formadores de micorrizas arbusculares asociados a pasto colosuana (Bothriochloa pertusa (L) A. Camus) en suelos compactados y no compactados del municipio de San Marcos departamento de Sucre*. [Tesis de Licenciatura, Universidad de Sucre]. Repositorio Universidad de Sucre. <http://repositorio.unisucre.edu.co/handle/001/570>
- 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. <https://doi.org/10.1111/ppa.13138>
- López-Aguilar, R., Murillo-Amador, B., Benson-Rosas M., López-Arce, E., & Valle-Meza, G. (2002). Manual de análisis químicos de suelos. Editorial. Centro de Investigaciones

- Biológicas del Noroeste, S.C. La Paz, B.C.S. México.  
<http://cibnor.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1001/2065>
- López-Courrau, K., Rivera-Méndez, W., Brenes-Madriz, J., & Zúñiga-Vega, C. (2018). Establecimiento de un protocolo para el crecimiento y multiplicación de *Setophoma terrestris* y *Fusarium* spp. provenientes de un cultivo de cebolla (*Allium cepa* L). *Tecnología en Marcha*, 31(4), 37-48. <https://doi.org/10.18845/tm.v31i4.3958>
- Little, G., & Gordon, M. (1967). «Survival of Fungal Cultures Maintained Under Mineral Oils for Twelve Years. *Mycologia*, 59 (4), 733-736. <https://doi.org/10.2307/3757105>
- Liu, Y., Whelen, S., & Hall, B. (1999). Phylogenetic relationships among ascomycetes: evidence from an RNA polymerase II subunit. *Molecular biology and evolution*, 16(12), 1799-1808. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026092>
- Lyubenova A., Rusanova M., Nikolova M., & Slavov, S. (2023). Plant extracts and *Trichoderma* spp: possibilities for implementation in agriculture as biopesticides. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 37(1),159-166. <https://doi.org/10.1080/13102818.2023.2166869>
- Macías-Echeverri, E., Marín-Pavas, A., Osorio-Vega, W., & Hoyos-Carvajal, L. (2019). Suelos y microorganismos rizosféricos asociados en la reserva de biosfera" Seaflower". *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 7(2), 73-87. [http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S2308-38592019000200002](http://www.scielo.org.bo/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2308-38592019000200002)
- Maheshwary, N., Naik, B., & Chittaragi, A. (2022). Morpho-molecular characterization, diversity analysis and antagonistic activity of *Trichoderma* isolates against predominant soil born pathogens. *Indian Phytopathology*, 75(4),1009-1020. <https://doi.org/10.1007/s42360-022-00528-2>
- Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG). (2022). Nama Musáceas. Biblioteca virtual. Asuntos internacionales. Costa Rica. CATIE. <https://www.mag.go.cr/asuntos-internacionales/Inf-final-NAMA-Musaceas-2022.pdf>
- Manobanda-Duche, N. (2022). *Evaluación de la eficiencia de nematocidas biológicos sobre poblaciones de Meloidogyne incognita, en el cultivo de pitahaya amarilla (Selenicereus megalanthus), a nivel de invernadero, en el cantón Joya de Los Sachas*. [Tesis Licenciatura, Escuela Superior Politécnica de Chimborazo]. El Coca, Ecuador. Repositorio INIAP. <http://repositorio.iniap.gob.ec/handle/41000/5968>
- Maldonado-Paucar, D. (2016). *Evaluación de diferentes dosis de hexametáfosfato de sodio (NaPO<sub>3</sub>)<sub>6</sub>, en la determinación de tres tipos texturales de suelo, mediante el método de*

- Bouyoucos. [Tesis Licenciatura, Universidad Central del Ecuador]. Repositorio de Universidad Central del Ecuador. <http://www.dspace.uce.edu.ec/handle/25000/8135>
- Maldonado-Haro, M. (2019). *Caracterización molecular de cepas de Penicillium expansum de manzanas provenientes de España y Argentina*. [Tesis de Maestría. Universidad de Buenos Aires]. Repositorio de la Universidad de Buenos Aires. [https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis\\_n6672\\_MaldonadoHaro](https://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6672_MaldonadoHaro)
- Martínez, B., Infante, D., & Reyes, Y. (2013). *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 1-11. [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1010-27522013000100001&lng=es&tling=es](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1010-27522013000100001&lng=es&tling=es).
- Mendes, L. Q., Ferraz, C. M., Perim, C. M., Araújo, J. V., Ferrari, E. S., Rodrigues, J., & Braga, F. R. (2022). Asociación in vitro de *Duddingtonia flagrans* con ivermectina en el control de nematodos gastrointestinales de búfalos. *Revista MVZ Córdoba*, 27(3), e2398-e2398. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2398>
- 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]. Repositorio del Tecnológico de Costa Rica. <https://hdl.handle.net/2238/5797>
- Moo-Koh, F. (2018). *Contribución al estudio de especies de Trichoderma con aplicación agrícola*. [Tesis doctoral, Tecnológico Nacional de México]. Repositorio del Instituto Tecnológico de Conkal. <https://conkal.tecnm.mx/index.php/es/13-posgrado/307-repositorio-de-tesis-doctorado-en-agricultura-tropical-sustentable>
- Nesta-Silva & Rodrigues-Nunes, J. (2014). O Tecnógeno na cidade de Presidente Prudente-SP / The Technogene in the city of Presidente Prudente, São Paulo, Brazil. *Sociedade & Natureza*, 26, 483. <https://doi.org/10.1590/1982-451320140307>
- Núñez-Solis, J. (1996). *Manual de Laboratorio de Edafología*. 1.ed. EUNED. Costa Rica. 160p.
- O'Donnell, K., Sutton, D., Fothergill, A., McCarthy, D., Rinaldi, M., Brandt, M., & Geiser, D. M. (2008). Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and in vitro antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(8), 2477-2490. <https://doi.org/10.1128/jcm.02371-07>
- Peraza-Padilla, W., Orozco-Aveces, M., Esquivel-Hernández, A., Rivera-Coto, G. & Chaverri-Fonseca, F. (2011). Aislamiento e identificación de hongos nematófagos nativos de zonas arroceras de Costa Rica. *Agronomía mesoamericana*, 22(2), 233-243. <https://doi.org/10.15517/am.v22i2.11797>

- Pérez-Rivera, (2014). *Evaluación de diferentes tratamientos químicos y biológicos para el control preventivo de Fusarium spp. en el cultivo de arveja, diagnóstico y servicios en las fincas y planta de empaque de grupo hortícola de exportación Ghortex municipio de Sumpango, Chimaltenango, Guatemala, c.a.* [Tesis Licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala]. Repositorio de Universidad de San Carlos de Guatemala. [http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01\\_2917.pdf](http://biblioteca.usac.edu.gt/tesis/01/01_2917.pdf)
- Peterson, S., & Jurjević, Ž. (2017). New species of *Talaromyces* isolated from maize, indoor air, and other substrates. *Mycologia*, 109(4), 537-556. [10.1080/00275514.2017.1369339](https://doi.org/10.1080/00275514.2017.1369339)
- Promotora de Comercio Exterior de Costa Rica (PROCOMER). (2020). Anuario Estadístico 2019.
- Quevedo, A., Magdama, F., Castro, J., & Vera-Morales, M. (2022). Interacciones ecológicas de los hongos nematófagos y su potencial uso en cultivos tropicales. *Scientia Agropecuaria*, 13(1), 97-108. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2022.009>
- Reyes-Guerrero, D., Olmedo-Juárez, A., & Mendoza de Gives, P. (2021). Control y prevención de nematodosis en pequeños rumiantes: antecedentes, retos y perspectivas en México. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, 12 (3), 186-204. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v12s3.5840>
- Ridkaew, R., Luangsa, J., Hywel, N. & Samson, R. (2012). A phylogeny including the medically important *Paecilomyces lilacinus*. Phylogenetics Laboratory, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. Thailand. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/GU980035.1>
- Rivera-Méndez, W., Brenes-Madriz, J., & Zúñiga-Vega, C. (2018). Efectos de la aplicación de *Trichoderma asperellum* y su filtrado en el crecimiento de almácigos de cebolla (*Allium cepa*). *Tecnología en Marcha*. 31(2), 98-105. <http://dx.doi.org/10.18845/tm.v31i2.3627>
- Robinson, J.C., Daneel, M., & Schoeman, P.S. (1999). Cultural practices in relation to integrated pest management in bananas. 283-289. [www.musalit.org/seeMore.php?id=5517](http://www.musalit.org/seeMore.php?id=5517)
- Rodríguez-Andrade, E. (2020). *Caracterización fenotípica y filogenia molecular de hongos extremófilos* [Tesis Doctorado, Universitat Rovira i Virgili] Unitat de Micologia i Microbiologia Ambiental. Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. <http://hdl.handle.net/10803/670209>
- Rodríguez-Labastida, M. (2019). *Evaluación nematocida in vitro de filtrados obtenidos a partir de hongos nematofagos cultivados en medios elicitados con extracto larval del parasito Haemonchus contortus*. [Tesis Maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán]. Mexico. Repositorio del Centro de Investigación Científica de Yucatán. <https://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/1626>

- Rojas-Contreras, L. (2021). *Estrategia de mercadeo para el lanzamiento del fungicida Belanty® para el combate de Pseudocercospora fijiensis en el cultivo de banano en Costa Rica*. [Tesis de Maestría, Universidad de Costa Rica]. Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica. <https://hdl.handle.net/10669/85156>
- Rojas-Villacorta, W., Cox-Trigoso, G., Burgos Wilson, N., Morey-León, G., & Wilson-Krugg, J. (2017). Aislamiento, selección e identificación de especies nativas de *Trichoderma* spp. con efecto biocontrolador sobre nematodos noduladores que afectan al cultivo de *Asparagus officinalis* de la empresa Agroindustrial Camposol S.A. *Veritas*, 15(1), 80-91. <https://revistas.ucsm.edu.pe>
- Samuels, G. J., Ismaiel, A., Bon, M. C., De Respini, S., & Petrini, O. (2015). *Trichoderma asperellum* sensu lato consists of two cryptic species. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, USDA. *Mycologia*, 102(4), 944-966. <https://doi.org/10.3852/09-243>
- 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. <https://doi.org/10.5377/elhigo.v11i1.11715>
- Silva, S. D., Carneiro, R. M. D. G., Faria, M., Souza, D. A., Monnerat, R. G., & Lopes, R. B. (2017). Evaluation of *Pochonia chlamydosporia* and *Purpureocillium lilacinum* for Suppression of *Meloidogyne enterolobii* on Tomato and Banana. *Journal of Nematology*, 49(1), 77-85. <https://doi.org/10.21307/jofnem-2017-047>
- Silva-Valenzuela, M., Rojas-Martínez, R. I., Manzanilla-López, R. H., Macías-Rubalcava, M. L., Aranda-Ocampo, S., & Zavaleta-Mejía, E. (2020). Hongos endófitos: una alternativa biológica para el manejo de nematodos fitoparásitos. *Nematropica*, 50(1), 101-117. <https://www.researchgate.net/publication/344889020>
- Stewart, J. E., Kim, M. S., James, R. L., Dumroese, R. K., & Klopfenstein, N. B. (2006). Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* and *Fusarium commune* isolates from a conifer nursery. *Phytopathology*, 96(10), 1124-1133. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-96-1124>
- Todd, J., Islas, I., & Canché, B. (2019). *Análisis bioquímico-molecular de la interacción de Pseudocercospora fijiensis y Trichoderma harzianum*. [Tesis de Maestría, Centro de Investigación Científica de Yucatán]. Repositorio de Centro de Investigación Científica de Yucatán. <http://cicy.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1003/1635>

- Triveni, S., Prasanna, R., Saxena, A. K. (2012). Optimization of conditions for *in vitro* development of *Trichoderma viride*-based biofilms as potential inoculants. *Folia Microbiologica*, 57:431–437. <https://doi.org/10.1007/s12223-012-0154-1>
- Umaña-Castro, J., Orozco-Cayasso, S., Umaña-Castro, R., & Molina-Bravo, R. (2018). Identificación molecular y características fisiológicas de aislamientos de *Trichoderma* para el biocontrol de dos patógenos en la piña. *Revista de Ciencias Ambientales*, 53(1), 125-142. <https://doi.org/10.15359/rca.53-1.7>
- Valencia-Serna, R., Guzmán- Piedrahita, O., Villegas- Estrada, B., & Castaño- Zapata, J. (2014). Manejo integrado de nematodos fitoparásitos en almacigos de plátano Dominico Hartón (*Musa* AAB Simmonds). *Revista Luna Azul*, 39, 165-185. [http://190.15.17.25/lunazul/downloads/Lunazul39\\_11.pdf](http://190.15.17.25/lunazul/downloads/Lunazul39_11.pdf)
- Valencia-Yah, T., Martin-Mex, R., Cruz-López, J.R., Pérez-Brito, D., Magana-Álvarez, A., Cortes-Velázquez, A., & Nexticapán-Garcéz, A. (2023). Identification and molecular characterization phytopathogenic fungi in Agave tequilana in Mexico.
- Van Diepeningen, A.D., Feng, P., Ahmed, S., Sudhadham, M., Bunyaratavej, S. & Hoog, G.S. (2014). *Fusarium* infections in a tropical dermatologic clinic: a MLST and evidence-based evaluation. *Ecology of Clinical Fungi*. The Netherlands.
- 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. <https://doi.org/10.18845/tm.v30i1.3062>
- Vargas, A., Watler, W., Morales, M., & Vignola, R. (2017). Prácticas efectivas para la reducción de impactos por eventos climáticos en el cultivo de banano en Costa Rica. (CATIE). <https://www.mag.go.cr/bibliotecavirtual/F01-8205.pdf>
- Visagie, C., & Houbraken, J. (2020). Updating the taxonomy of *Aspergillus* in South Africa. *Studies in mycology*, 95(1), 253-292. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.02.003>
- Visagie, C., Yilmaz, N. & Seifert, K. (2020). New fungi isolated from house dust. *Mycology, Agriculture and Agri-Food*, Canada.
- Wang, L., Wang, J.M., Li, X.F., & Xu, Y.M. (2018). The evaluation of DNA barcode for *Fusarium*. College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, China.
- Wang, X. (2020). Identification and pathogenic *Fusarium* of potato root rot Ningxia Hui Autonomous Region. China. Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Institute of Plant Protection, Yellow River Road, ying chuan, ning xia 750002.

Yang, M., Zhang, H., Van der Lee, T., Waalwijk, C., Van, A., Feng, J., & Chen, W. (2020). Population genomic analysis reveals a highly conserved mitochondrial genome in *Fusarium asiaticum*.





**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**

Berlioth Ugalde-Monge<sup>1</sup>, Roy Artavia-Carmona<sup>2</sup>, Alejandro Vargas-Martínez<sup>3</sup>, Walter Peraza-Padilla<sup>4</sup>.

Berlioth Ugalde Monge  
Bachiller

[berlioth.ugalde.monge@est.una.ac.cr](mailto:berlioth.ugalde.monge@est.una.ac.cr)

Servicio Fitosanitario del Estado (SFE). San José,  
Costa Rica. Apartado Postal 1521-1200.

<https://orcid.org/0000-0002-7481-7561>

Roy Artavia-Carmona  
Licenciado

[roy.artavia.carmona@una.cr](mailto:roy.artavia.carmona@una.cr)

Universidad Nacional, Escuela de Ciencias Agrarias. Laboratorio de Nematología, Heredia,  
Costa Rica. Apartado Postal 86-3000

<https://orcid.org/0000-0003-0906-5444>

Alejandro Vargas Martínez  
Máster

[alejandro.vargas.martinez@una.ac.cr](mailto:alejandro.vargas.martinez@una.ac.cr),

Universidad Nacional. Escuela de Ciencias Agrarias. Heredia,  
Costa Rica. Apartado Postal 86-3000

<http://orcid.org/0000-0001-8039-8984>

Walter Peraza-Padilla  
Máster

[walter.peraza.padilla@una.cr](mailto:walter.peraza.padilla@una.cr)

Universidad Nacional. Escuela de Ciencias Agrarias. Laboratorio de Nematología, Heredia,  
Costa Rica. Apartado Postal 86-3000

<https://orcid.org/0000-0003-4651-5555>

## 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 dos aislamientos de *Fusarium oxysporum* (Fox2 y Fox3), dos aislamientos de *Trichoderma asperellum* (Trich1 y Trich3) y un aislamiento de *Purpureocillium lilacinum* (Pli) para evaluar *in vitro* su patogenicidad contra *R. similis*. Se realizó una suspensión y conteo de esporas de cada hongo para determinar la concentración de conidios (UFC/ml) a depositar por plato Petri. Posteriormente se depositó por plato 0,5 ml de una suspensión que contenía 60 adultos y juveniles de la especie *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 el nematodo barrenador *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 the HNs had been previously identified, two isolates of *Fusarium oxysporum* (Fox2 and Fox3), two isolates of *Trichoderma asperellum* (Trich1 and Trich3) and one isolate of *Purpureocillium lilacinum* (Pli) were used to evaluate their pathogenicity against *R. similis* *in vitro*. A suspension and spore count of each fungus was carried out to determine the concentration of conidia (CFU/ml) to be deposited in a Petri dish. Subsequently, 0.5 ml of a suspension containing 60 adults and juveniles of the species *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 borer nematode *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 cultivo de banano de exportación en Costa Rica abarca alrededor de 42,066 hectáreas. Estas áreas se concentran en varios cantones, siendo los principales: Limón centro con 10 fincas, Talamanca con 5, Matina con 41, Guácimo con 15, en Sarapiquí con 22, Siquirres con 30 y finalmente, Pococí con 26 fincas. Estos cantones representan más del 97% del total de hectáreas cultivadas de banano 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 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 puede 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 recolección de muestras de suelo. El muestreo se realizó de manera aleatoria tomando alrededor de 25 submuestras por hectárea en seis fincas bananeras en los cantones de Limón, Pococí, Siquirres y Talamanca todas pertenecientes a la región Huetar Atlántica.

Para la recolección de las muestras de suelo, se utilizó una pala con el objetivo de tomar el suelo sin remover la materia orgánica presente y luego se cuarteó hasta obtener aproximadamente 1 kg de muestra. Las muestras se guardaron en bolsas de polietileno y se etiquetaron con la fecha, el lugar de recolección y las coordenadas geográficas correspondientes. Posteriormente, cada muestra se trasladó en una hielera al Laboratorio de Nematología de la Universidad Nacional para su procesamiento y análisis.

### **Aislamiento, purificación e identificación de hongos antagonistas**

El proceso de 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 antibiótico [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 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 mediante claves propuestas por 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 propuesta por Hoyos-Carvajal et al. (2008) con algunas modificaciones y se efectuaron pruebas de PCR para la amplificación de distintas regiones del genoma (ITS, TEF1 $\alpha$ , 1- $\alpha$ , rpb2 y  $\beta$ -tubulina) mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Los productos de PCR se evaluaron por medio de electroforesis en geles de agarosa TopVision al 1% teñidos con GelRed 1X y sometidos a luz UV. Posteriormente, se enviaron los productos de PCR obtenidos de todos los hongos aislados a la empresa Macrogen Inc. (Corea del Sur) para su purificación y secuenciación en ambas direcciones mediante el método Sanger.

Una vez obtenidas las secuencias 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. En la cámara de flujo laminar, se flamearon en alcohol al 95% y en seguida, 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 realizaron 10 discos que fueron transferidos con pinzas estériles a platos Petri de 6 cm de diámetro y sellados con papel Parafilm®. Durante tres días se observó cada plato Petri para descartar alguna contaminación. Posteriormente, se procedió a la inoculación 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 bajo condiciones de oscuridad a una temperatura de 27 °C. Luego de 2 meses posteriores a 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 estaban 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 hematocitómetro y se determinó la concentración de conidios (UFC/ml) a depositar 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 22 ml de AA (20g/L), además se adicionó una cantidad anteriormente definida de UFC ( $1 \times 10^6$ ) para cada aislamiento. Los platos Petri se incubaron a temperatura ambiente (17-27°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 de nematodos posibles.

Luego se llevaron a cabo los conteos para saber la cantidad obtenida y posteriormente 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 y 0.5 ml de la suspensión de nematodos. En cuanto a 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 en cuanto a la estructura de la parcela al ser homogénea, 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).

### **Resultados 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 realizar las asignaciones de las especies correspondientes a cada uno de los cinco hongos. La secuencia de nucleótidos de la región TEF1- $\alpha$  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- $\alpha$  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% del gen de la  $\beta$ -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 acceso 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*

<b>Procedencia</b>	<b>Nombre científico</b>	<b>Código</b>	<b>Identidad (%*)</b>	<b>Accesión**</b>
<b>Pococí</b>	<i>Trichoderma asperellum</i>	Trich3	100	OR418173
<b>Siquirres</b>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Fox2	100	OR828460
<b>Limón</b>	<i>Trichoderma asperellum</i>	Trich1	100	OR418174
<b>Pococí</b>	<i>Fusarium oxysporum</i>	Fox3	100	OR828461
<b>Talamanca</b>	<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 acceso de cada uno de los hongos identificados en este estudio. Elaboración propia.

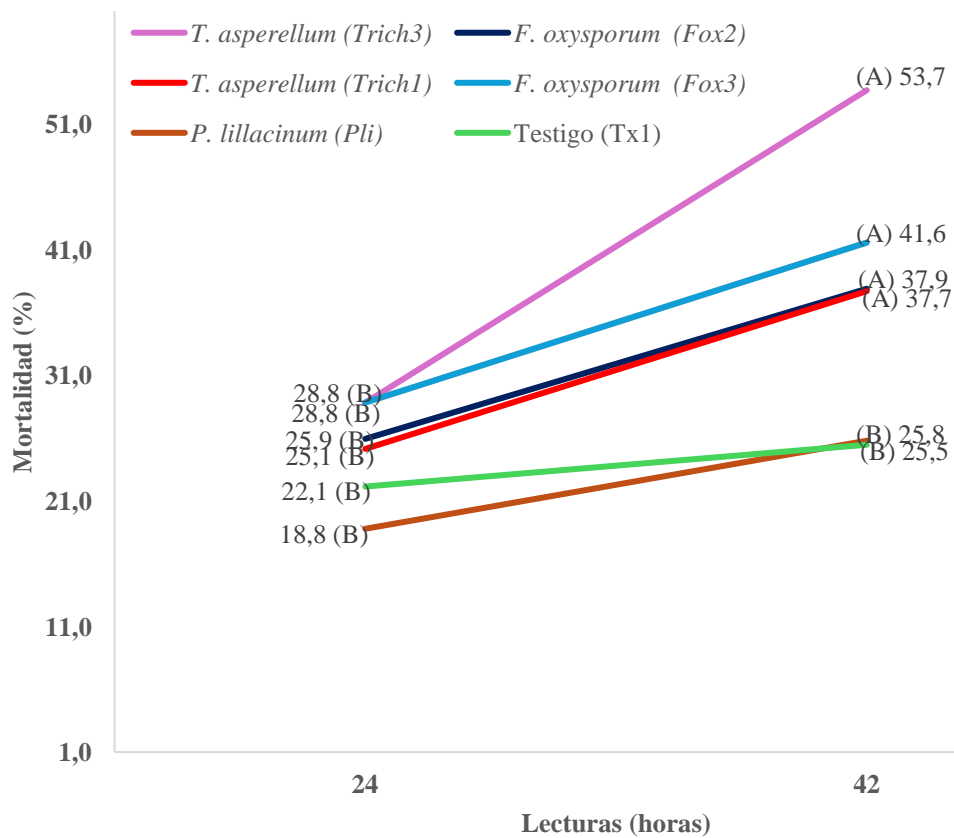
### **Evaluación del antagonismo *in vitro* de hongos nematófagos**

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, no mostró diferencias significativas en términos del porcentaje de mortalidad en comparación a los otros tratamientos en los dos tiempos de lectura. El tratamiento control (Tx1) presentó 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, el tratamiento 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 Candelero *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.** Líneas de las medias de mortalidad (%) en función de los aislamientos para cada lectura [Medias con letra común no son diferentes estadísticamente ( $p > 0.05$ )]. Elaboración propia.

En las cajas Petri inoculadas con *T. asperellum* (Trich1 y Trich3), se logró observar la presencia de una gran cantidad de esporas y micelio alrededor de la cutícula de los nematodos (Figura 2 A y B). Este efecto se podría relacionar 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, las cuales 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, provocaran 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.

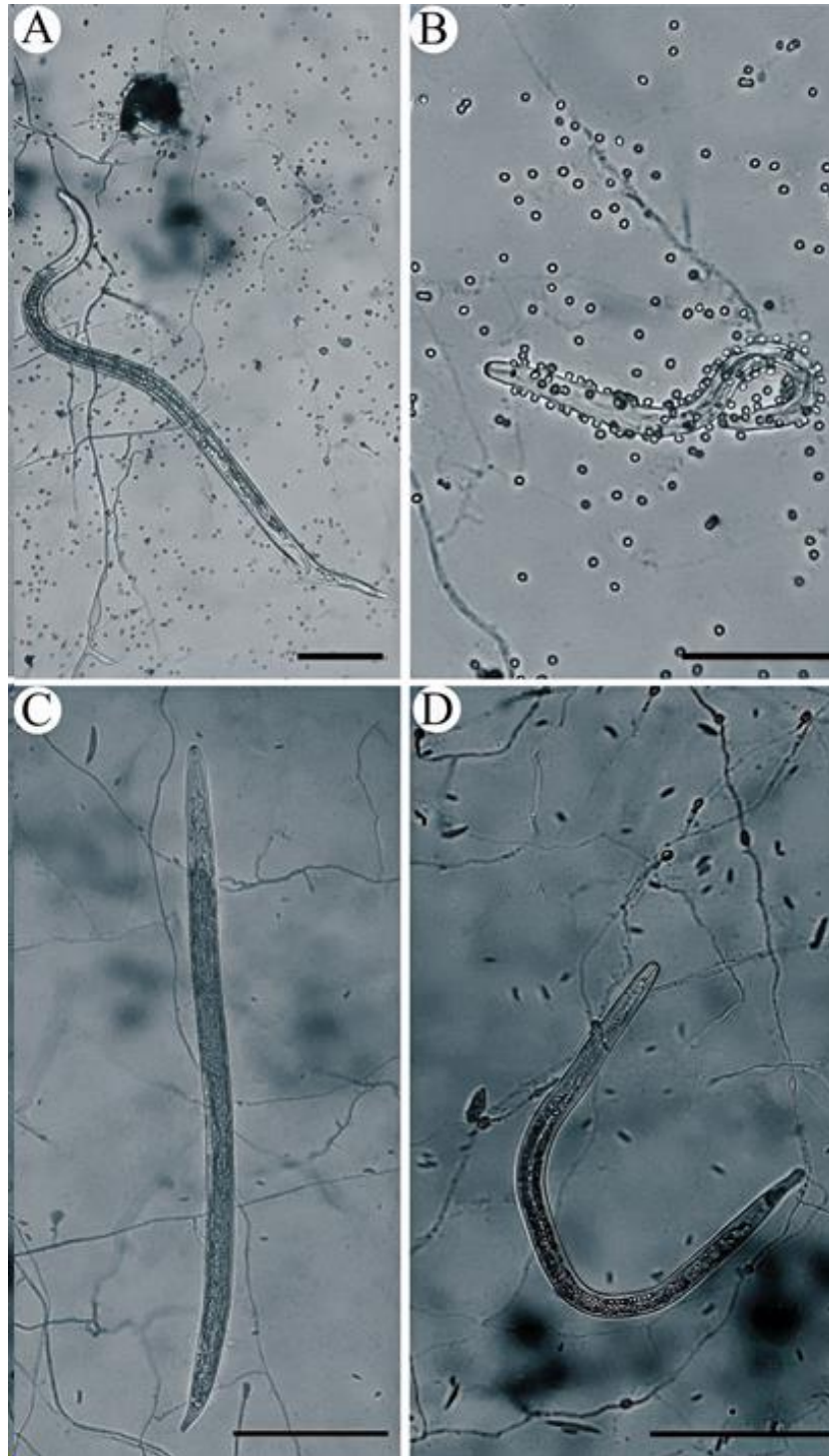
En el caso de los dos aislamientos de *F. oxysporum* (Fox2 y Fox3), ambas presentaron porcentajes de mortalidad del 25.9% y 28.8% respectivamente, a las 24 horas después de la inoculación, similares al tratamiento control (Tx1) que fue de 25,5 %. Ambos aislamientos, no mostraron diferencias estadísticamente 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. Sobre este tema, Seong et al. (2021), reportaron resultados similares con el uso de compuestos como la bikaverina y el ácido fusárico aislados del hongo endófito *F. oxysporum* con mortalidades del 50 y 43% del nematodo *Bursaphelenchus xylophilus*. En este estudio la observación de nematodos juveniles y adultos inmóviles en los platos Petri inoculados con este hongo, podrían indicar la presencia de este compuesto (Figura 2 C y D). Adicionalmente, en un estudio realizado por Morales-García, (2014) en el cual evaluó el potencial de biocontrol de dos aislamientos de *F. oxysporum* contra *R. similis* en vitroplantas de banano, se obtuvieron resultados similares a los de este estudio con una reducción de las poblaciones en raíz de un 39,2% y 54,1%.

De los cinco aislamientos utilizadas en esta investigación, *P. lilacinum* (Pli) fue el que mostró el menor porcentaje de parasitismo en términos de su potencial como 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 un estudio realizado por Varela-Benavides et al. (2017), evaluaron el potencial antagonista in vitro de *P. lilacinum* a las 96 horas contra *R. similis*. En ese estudio, 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, utilizando un aislamiento de la misma especie. La diferencia en el porcentaje de mortalidad podría estar relacionada con 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 de los 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  $\mu\text{m}$ . B: 120  $\mu\text{m}$ . C: 170  $\mu\text{m}$  y D: 145  $\mu\text{m}$ . Elaboración propia.

## **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 los factores de tipo de hongo y tiempo de exposición, lo que 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 proporciona información valiosa 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 en cultivos de importancia agrícola en Costa Rica.

## **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. <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. <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. <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. <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. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5933-9\\_22](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5933-9_22)
- Candeleró, 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. <https://doi.org/10.32604/phyton.2015.84.113>
- Cañedo, V., y T. Ames. 2004. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Centro Internacional de la Papa (CIP), Lima, Perú, 62 p. <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. [https://repositorio.catie.ac.cr/bitstream/handle/11554/10579/Desarrollo\\_de\\_una\\_propuesta\\_metodol%c3%b3gica.pdf?sequence=5&isAllowed=y](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. <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. <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. <http://www.infostat.com.ar>
- FAO. (2020). Análisis del mercado del banano: resultados preliminares 2019. Roma. <https://www.fao.org/publications/card/es/c/CA7567ES/>
- Fernández-Jiménez, M., Bulla-Castañeda, D., Sanabria-Villate, A., y Pulido-Medellín, M. (2019). Implementación de hongos nematófagos para el control de parásitos gastrointestinales. *Pensamiento y Acción*, 27, 7-20. [https://revistas.uptc.edu.co/index.php/pensamiento\\_accion/article/view/10201](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. Repositorio Universidad La Salle [https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina\\_veterinaria/4/](https://ciencia.lasalle.edu.co/medicina_veterinaria/4/)
- Florentin, M. (2022). Isolation and characterization of *Trichoderma* species with biocontrol potential from Paraguay. Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Mcal. Lopez, San Lorenzo, Paraguay. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/MZ442656.1>
- Gowen, S. R., Quénéhervé, P. and 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]. Repositorio Universidad Nacional de Piura. <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. [http://www.cicy.mx/sitios/desde\\_herbario/](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. <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. Repositorio Universidad de Caldas. <https://revistasojs.ucaldas.edu.co/index.php/lunazul/article/view/1210>
- 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. <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. <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. <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. <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. <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. <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. <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. <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. <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. <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. <https://doi.org/10.5377/elhigo.v11i1.11715>
- 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. [https://www.sfe.go.cr/DocsStatusRegistro/Listado\\_de\\_Restringidos.pdf](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. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.06.006>
- UNCTAD. (2013). Mercado de productos básicos en los países en desarrollo: Banano. Ginebra, Suiza. [https://unctad.org/es/system/files/official-document/INFOCOMM\\_cp01\\_Banana\\_es.pdf](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. [https://revistas.tec.ac.cr/index.php/tec\\_marcha/article/view/3062](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. <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. <https://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA/article/view/327/350>.