

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA**

**MANEJO DEL FITONEMATODO (*Meloidogyne incognita*) EN EL CULTIVO DE  
MELÓN MEDIANTE EL USO DE HONGOS ENDOFITICOS**

**POR:**

**LETZER ENRIQUE DÁVILA HERRERA**

**TESIS**

**PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA COMO  
REQUISITO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE  
INGENIERO AGRÓNOMO**



**CATACAMAS**

**OLANCHO**

**JUNIO 2016**

MANEJO DEL FITONEMATODO (*Meloidogyne incognita*) EN EL CULTIVO DE  
MELÓN MEDIANTE EL USO DE HONGOS ENDOFITICOS

POR:

LETZER ENRIQUE DÁVILA HERRERA

ADAN RAMIRÉZ, M.Sc  
Asesor Principal

TESIS PRESENTADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE AGRICULTURA  
COMO REQUISITO PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE INGENIERO  
AGRÓNOMO

CATACAMAS

OLANCHO

JUNIO, 2016

## **ACTA SUSTENTACIÓN**

## **DEDICATORIA**

**A DIOS TODO PODEROSO**, porque él es grande y en todo momento por muy difícil que haya sido la situación él estuvo conmigo, quien me dio fuerzas para levantarme después de cada caída.

**A MIS PADRES, LUIS E. DÁVILA Y RITZA A. HERRERA**, por cada momento de apoyo y por darme el voto de confianza para poder culminar con mis estudios y poder enfrentarme a la vida pero sobre todo por su paciencia, y por cada lágrima que toco derramar.

**A MIS HERMANOS, LUIS, JOSE, NELSON, ERICK, RUTH, ÁNGEL, SELVIN, JORGE, GUSTAVO, RICCY Y JOSE ARMANDO** por ser una de mis motivaciones para superarme.

**A MI HIJA CAMILA**, mi princesa que desde que nació le dio otro rumbo a mi vida, pero llego en el momento exacto, no tengo una palabra que encierre lo que siento por ella, un te amo se queda corto.

## **AGRADECIMIENTOS**

**A DIOS QUE ES EL DUEÑO DE TODO**, y sin él no podría haber alcanzado la meta, por brindarme salud, sabiduría, fuerza para poder soportar tanto sacrificio.

**A MI CASA DE ESTUDIOS, Universidad Nacional de Agricultura**, por el aprendizaje que me brindo por estos cuatro años.

**A MIS PADRES, Luis Dávila y Ritza Herrera**, porque si no es por el gran sacrificio que ellos realizaron todo este tiempo, para que mi persona pudiera avanzar en mis estudios. ¡Gracias!.

**A MIS ASESORES DE TESIS; M.Sc. ADÁN RAMIREZ, Ph. D. ROY DONALD MENJIVAR y M.Sc. WENDY LEONELA CASTELLANO**, por haberme permitido desarrollar mi trabajo de tesis y por la ayuda que me brindaron al momento del desarrollo de la misma.

**AL ASISTENTES DE LABORATORIO, Lic., DOUGLAS IRIAS**, por estar a disposición de orientarme a lo largo de mi investigación.

**A MIS COMPAÑEROS, Luis García (keko), Jankel Díaz (Ovejo), Alex Delgado (la flaca), Alexander Díaz (Chuy) Dulce Domínguez (la peque) y Gabriel Domínguez (el tigre)** porque de una u otra forma estuvieron pendientes en cualquier situación en que necesite de su ayuda.

## ÍNDICE

|                                                                                       |             |
|---------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
|                                                                                       | Pág.        |
| <b>ACTA SUSTENTACIÓN .....</b>                                                        | <b>i</b>    |
| <b>DEDICATORIA.....</b>                                                               | <b>ii</b>   |
| <b>AGRADECIMIENTOS .....</b>                                                          | <b>iii</b>  |
| <b>LISTA DE CUADROS .....</b>                                                         | <b>vii</b>  |
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b>                                                         | <b>viii</b> |
| <b>LISTA DE ANEXOS.....</b>                                                           | <b>ix</b>   |
| <b>RESUMEN.....</b>                                                                   | <b>x</b>    |
| <b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>                                                           | <b>1</b>    |
| <b>II. OBJETIVOS.....</b>                                                             | <b>3</b>    |
| 2.1    Objetivo General.....                                                          | 3           |
| 2.2    Objetivos Específicos .....                                                    | 3           |
| <b>IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....</b>                                                | <b>4</b>    |
| 4.1    Industria local .....                                                          | 4           |
| 4.2    Cultivo de melón.....                                                          | 5           |
| 4.3    Nematodos .....                                                                | 6           |
| 4.4    Alternativas para disminuir el uso de plaguicidas .....                        | 8           |
| 4.5.    Hongos entomopatógenos.....                                                   | 8           |
| 4.6    Hongos endofíticos .....                                                       | 9           |
| 4.6.1    Relación Planta-Microorganismo mutualista (Hongos endofíticos) .....         | 11          |
| 4.6.2    Mecanismos de Biocontrol .....                                               | 12          |
| 4.6.3    Biofertilización y estimulación de los mecanismos de defensa en plantas .... | 12          |
| 4.6.4    Colonización en raíces de plantas.....                                       | 13          |
| 4.6.5    Biofertilización .....                                                       | 13          |
| 4.6.6    Estimulación de la resistencia en plantas y mecanismos de defensa.....       | 14          |
| 4.6.7    Modificación de la rizósfera .....                                           | 15          |
| 4.6.8    Antibiosis.....                                                              | 15          |

|           |                                                            |           |
|-----------|------------------------------------------------------------|-----------|
| 4.6.9     | Micoparasitismo .....                                      | 16        |
| 4.6.10    | Inducción de resistencia.....                              | 17        |
| 4.6.11    | Trichoderma spp .....                                      | 18        |
| 4.6.12    | Fusarium spp .....                                         | 19        |
| <b>V.</b> | <b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>                           | <b>21</b> |
| 5.1       | Ubicación del Lugar.....                                   | 21        |
| 5.2       | Materiales y Equipo .....                                  | 21        |
| 5.3       | Primera etapa .....                                        | 22        |
| 5.3.1     | Asepsia del Laboratorio.....                               | 22        |
| 5.3.2     | Desinfección de la Cámara de Aislamiento.....              | 23        |
| 5.3.3     | Preparación de Sustrato .....                              | 23        |
| 5.3.5     | Preparación de la Suspensión de Esporas .....              | 24        |
| 5.3.6     | Inoculación .....                                          | 24        |
| 5.3.7     | Pruebas de Colonización .....                              | 24        |
| 5.4       | Segunda etapa .....                                        | 25        |
| 5.4.1     | Desinfección de Bandejas.....                              | 25        |
| 5.4.2     | Siembra .....                                              | 25        |
| 5.4.3     | Trasplante .....                                           | 25        |
| 5.4.5     | Muestreo y toma de datos.....                              | 26        |
| 5.5       | Variables a Evaluar .....                                  | 26        |
| 5.5.3     | Penetración de nemátodos por cada 100 gramos de raíz ..... | 27        |
| 5.5.1     | Estimación del índice de agallas en las raíces .....       | 27        |
| 5.5.5     | Volumen de la raíz.....                                    | 28        |
| 5.5.6     | Peso de la raíz. ....                                      | 28        |
| 5.5.7     | Diámetro del tallo .....                                   | 28        |
| 5.6       | Diseño experimental .....                                  | 28        |
| 5.6.1     | Modelo Estadístico .....                                   | 29        |
| 5.6.2     | Análisis Estadístico .....                                 | 29        |
| <b>VI</b> | <b>DISCUSIÓN Y RESULTADOS.....</b>                         | <b>30</b> |
| 6.1       | Penetración de nematos por cada 100g de raíz .....         | 30        |
| 6.2       | Índice de agallas.....                                     | 31        |
| 6.3       | Volumen de raíz .....                                      | 32        |
| 6.4       | Peso de raíz .....                                         | 33        |

|             |                               |           |
|-------------|-------------------------------|-----------|
| 6.5         | Diámetro de tallo .....       | 34        |
| 6.6         | Incidencia de plagas .....    | 35        |
| 6.7         | Días a floración .....        | 36        |
| 6.8         | Días a fructificación .....   | 36        |
| 6.9         | Frutos por metro lineal ..... | 37        |
| <b>VII</b>  | <b>CONCLUSIONES.....</b>      | <b>39</b> |
| <b>VIII</b> | <b>RECOMENDACIONES.....</b>   | <b>40</b> |
| <b>VII.</b> | <b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>      | <b>41</b> |
| <b>VIII</b> | <b>ANEXOS.....</b>            | <b>49</b> |

## LISTA DE CUADROS

|                                                                                                                                                                     |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Cuadro 1.</b> Género y Origen de los Diferentes Hongos que se Utilizaron. ....                                                                                   | 22 |
| <b>Cuadro 2=</b> Cepas de hongos endofíticos que colonizaron raíces de melón .....                                                                                  | 30 |
| <b>Cuadro 3=</b> Promedios denotan que no hay diferencia estadística significativa entre los<br>tratamientos según prueba de Bonferroni al 5% de probabilidad. .... | 35 |

## LISTA DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Figura 1.</b> Croquis de la parcela.....                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 26 |
| <b>Figura 2.</b> Índice de agallas en las raíces .....                                                                                                                                                                                                                                                                                 | 27 |
| <b>Figura 3.</b> Efectos de hongos endofiticos sobre la penetración del fitonemátodo <i>M. incognita</i> .<br>Barras representan la media del error estándar. Columnas con letras diferentes, demuestran<br>que hay diferencias estadísticas significativas según la prueba de Tukey al 5% de<br>probabilidad.....                     | 31 |
| <b>Figura 4:</b> Efectos de hongos endofiticos sobre el índice de agallas producido por el<br>fitonemátodo <i>M. incognita</i> . Barras representan la media del error estándar. Columnas con<br>letras iguales, demuestran que no hay diferencias estadísticas significativas según la prueba<br>de Tukey al 5% de probabilidad. .... | 32 |
| <b>Figura 5:</b> Efectos de hongos endofiticos sobre el volumen de raíz. Barras representan la<br>media del error estándar. Columnas con letras iguales, demuestran que no hay diferencias<br>estadísticas significativas según la prueba de Tukey al 5% de probabilidad. ....                                                         | 33 |
| <b>Figura 6:</b> Efectos de hongos endofiticos sobre el peso de raíz. Barras representan la media<br>del error estándar. Columnas con letras iguales, demuestran que no hay diferencias<br>estadísticas significativas según la prueba de Tukey al 5% de probabilidad. ....                                                            | 34 |
| <b>Figura 7:</b> Efectos de hongos endofiticos sobre el diámetro de tallos. Barras representan la<br>media del error estándar. Columnas con letras iguales, demuestran que no hay diferencias<br>estadísticas significativas según la prueba de Tukey al 5% de probabilidad. ....                                                      | 34 |
| <b>Figura 8:</b> Efectos de hongos endofiticos sobre los días a floración. Barras representan la<br>media del error estándar. Columnas con letras iguales, demuestran que no hay diferencias<br>estadísticas significativas según la prueba de Tukey al 5% de probabilidad. ....                                                       | 36 |
| <b>Figura 9:</b> Efectos de hongos endofiticos sobre los días a fructificación. Barras representan la<br>media del error estándar. Columnas con letras iguales, demuestran que no hay diferencias<br>estadísticas significativas según la prueba de Tukey al 5% de probabilidad. ....                                                  | 37 |

## LISTA DE ANEXOS

|                                                                                             |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Anexo 1.</b> Análisis de varianza de la variable penetración de nemátodos.....           | 50 |
| <b>Anexo 2.</b> Prueba de de Kruskal Wallis para la variable de índice de agallas. ....     | 50 |
| <b>Anexo 3.</b> Análisis de varianza para la variable de volumen de raíz.....               | 51 |
| <b>Anexo 4.</b> Análisis de varianza para la variable de peso de raíz. ....                 | 51 |
| <b>Anexo 5.</b> Análisis de varianza por muestreo en la variable de diámetro de tallo. .... | 52 |
| <b>Anexo 6.</b> Análisis de varianza para la variable de días a floración.....              | 53 |
| <b>Anexo 7.</b> Análisis de varianza para la variable de días a fructificación.....         | 53 |
| <b>Anexo 8.</b> Análisis de varianza para la variable de frutos por metro lineal.....       | 53 |

**Dávila Herrera, L.E. 2016.** Manejo del fitonematodo (*Meloidogyne incognita*) en el cultivo de melón mediante el uso de hongos endofíticos. Tesis Ing. Agrónomo. Universidad Nacional de Agricultura. Catacamas, Olancho, Honduras. Pag 65.

## RESUMEN

Para determinar el efecto de hongos endofíticos sobre el manejo del fitonematodo *M. incognita* en el cultivo de melón; en la finca de Agro industrias del Pacífico, situada en Guasaule, Choluteca, Honduras. Se evaluaron diez tratamientos; cinco inoculados con *Trichoderma*, tres inoculados con *Fusarium* no patogénico, provenientes del laboratorio de entomopatógenos de la Universidad Nacional de Agricultura; un testigo relativo (Químico) con tres aplicaciones de nematicidas y un testigo absoluto. Las inoculaciones se hicieron en invernadero, con una suspensión de esporas concentradas en  $1 \times 10^6$  esporas/ml por cada gramo de sustrato, en cada tratamiento se hicieron dos inoculaciones; la primera a los seis días después de siembra y la segunda a las 24 horas previo al trasplante al campo. Después de hacer conteos en el laboratorio, los resultados obtenidos demostraron que siete de los tratamientos protegidos con endofíticos tenían densidades de *M. incognita* inferiores al tratamiento Químico y al testigo absoluto ( $P < 0.05$ ). El tratamiento Berenjena 2 (27.9 nemátodos por cada 100 gramos de raíz), presentó densidades significativamente inferiores de *M. incognita* comparado al testigo absoluto (380.7 nemátodos por cada 100 gramos de raíz). Por otra parte, la inoculación con endofíticos para la promoción de crecimiento y producción, no presentó diferencia significativa para ninguno de los tratamientos. Sin embargo, los tratamientos Tomate 2, Hogge 3, Berenjena 2 y Hogge 4, mostraron una tendencia a ser superiores que el resto de los tratamientos.

**Palabras clave:** Endofíticos, *M. incognita*, *Fusarium*, *Trichoderma*.

## I. INTRODUCCIÓN

El melón *Cucumis melo* para exportación y mercado local, es de gran importancia, debido a la cantidad de mano de obra que demanda para su producción, generando trabajos de manera directa e indirecta para las familias que habitan en lugares cercanos a los plantíos. Constituye el 11% de las exportaciones agrícolas del país (ocupando el cuarto lugar de las exportaciones). Se produce a nivel nacional sin embargo, la zona sur presenta mejores condiciones para su producción.

Es importante señalar que una de las limitantes para la producción de melón son los nemátodos; del género *Meloidogyne* spp., o nemátodo nodulador; es un microorganismo endoparásito de las raíces. Existen varias especies las más importantes son: *M. incognita*, *M. javanica*, *M. hapla*.

El control biológico generalmente tiene efectos más específicos que el control químico y solo el microorganismo patógeno o la plaga clave se ve negativamente afectada, respetando a otros microorganismos beneficiosos y fauna útil. Por otra parte es más seguro para humanos, cosechas y medio ambiente y tiene el potencial de ser más estable y durar más tiempo que otros métodos de control, siendo totalmente compatible con los conceptos y objetivos del control integrado y una agricultura sostenible (Rubio. y Fereres 2000).

La ventaja de usar productos biológicos es que no hay residualidad química en el tejido vegetal, adaptándose a un sistema de producción orgánica abriendo una ventana de exportación muy especial y lucrativa que va en un ascenso continuo (Cedeño 2005, citado por Cruz, 2007).

En muchos ensayos se ha usado materia orgánica donde se reproducen enemigos naturales. Algunos de estos enemigos son nematodos depredadores (*Mononchus* sp, *Trypila* sp, *Seinura*

sp), platelmintos, insectos (colémbolos). Entre los parásitos se encuentran algunos protozoarios, virus, bacterias y hongos (Román y Acosta, 1984).

Con el uso de hongos endofíticos no se daña ni contamina el ambiente, por lo que son una excelente alternativa para el combate contra nematodos. Es por ello recomendable tomar ventaja de esta relación endófito-planta que ha surgido hace millones de años para poder ampliar su uso en la agricultura (Santoyo 2015).

El objetivo final de esta tesis es, por tanto, inducir a la planta para que resista o tolere el ataque de *M. incognita* mediante el uso de hongos endofíticos, focalizándose en el manejo biológico, para así disminuir el exceso de nematicidas.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo General**

Búsqueda de medidas para el manejo del fitonemátodo (*Meloidogyne incognita*) en el cultivo de melón, basadas en el manejo biológico, compatible con la agricultura integrada y ecológica.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Evaluar la efectividad de hongos endofíticos con potencial para el manejo de las poblaciones de nemátodos.

Estimar la inducción a tolerancia y/o resistencia con *Trichoderma* spp; y *Fusarium* spp., no patogénico, a *M. incognita*.

Demostrar si los hongos endofíticos tienen efecto como promotores de crecimiento.

Determinar los costos para el manejo de *M. incognita* mediante el uso de hongos endofíticos.

## **IV. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **4.1 Industria local**

En Honduras el cultivo del melón inicia en la década de los ochenta y su auge se da a principios de la década de los noventa, reduciendo al final de la misma por causa del Huracán Mitch. La producción fue introducida por grandes empresas, pero rápidamente se expandió a cerca de 1000 pequeños productores, durante el auge productivo. Algunas de las empresas exportadoras de melón en Honduras son: Agropecuaria Montelibano, Corporación Dinant, Agropecuaria del Golfo, entre otras (Chavarría 2010).

El sector agrícola hondureño representa el 14% del PIB total y emplea el 39% de la fuerza laboral activa, siendo la industria de melón un rubro importante dentro de este sector, generando US\$61.676 millones en ingresos por exportaciones, siendo el principal socio comercial Estados Unidos, con una participación de 89.01% (Sánchez 2006).

En el pico máximo de la producción de melón se requiere un total de 700 personas diarias en el campo y 400 en la empacadora solamente en una de las fincas de la empresa melonera, ubicada en varios municipios de Valle y Choluteca. Solo ellos cultivan por cada ciclo alrededor de 4,000 manzanas de tierra, cuya producción es enviada al extranjero en su mayoría. Esta tierra cultivada produce alrededor de 80 millones de melones en toda la temporada solamente en las fincas de la empresa Agrolíbano y unos 40 millones más en las otras empresas. Estas frutas son exportadas a los mercados de Estados Unidos y Europa (El Heraldito 2015).

## 4.2 Cultivo de melón

*C. melo*, planta de tallo rastrero que pertenece a la familia de las Cucurbitáceas, que incluye unas 850 especies de plantas herbáceas que producen frutos generalmente de gran tamaño y protegidos por una corteza dura (Fundación Eroski 2005).

El origen del melón es muy impreciso, algunos autores afirman que el melón es oriundo de Asia Central, mientras que otros sitúan su origen en el continente africano. En el siglo III, los manuales de horticultura romanos daban instrucciones sobre su cultivo. En aquella época, se servía la fruta espolvoreada con almizcle para acentuar su delicado sabor. Los melones aparecieron en Francia a finales del siglo XV y fueron consumidos en grandes cantidades por la corte donde se servían en forma de pirámides y se acompañaban de moscatel (Fundación Eroski 2005).

En cuanto a su morfología, este produce un sistema radicular fasciculado y abundante, con capacidad de penetrar en los horizontes profundos del suelo, posee un tallo rastrero, hirsuto y ramificado, en sus nudos brotan las hojas, un zarcillo, rama o flor. Las hojas son anchas y, por lo general tienen cinco puntas o lóbulos, con bordes lisos o dentados y con una superficie pilosa. Esta planta también tiene flores unisexuales en el mismo pie, masculinas y femeninas, se tiene reportado que el número de frutos oscila entre uno a seis por planta, aunque se menciona un promedio general de tres frutos por planta. En cuanto a su semilla, es de germinación bastante rápida y alta, alcanzando 85% o más en el terreno (Vicente 1955, Quintero 1981, Enciclopedia Práctica de Agricultura y Ganadería 1999, Enciclopedia Agropecuaria Terranova 2001, Proyecto Gef-Cibiogem de Bioseguridad. Conabio 2005).

Estas frutas necesitan condiciones ambientales como ser temperaturas altas y mucho sol para que puedan germinar y fructificar, esta planta necesita para una buena producción, climas cálidos comprendidos entre 23 y 30°C y ambiente seco menor de 70% de humedad relativa, con un máximo de 75%. El desarrollo de los tejidos del ovario de la flor está estrechamente

influenciado por la temperatura y las horas de iluminación, de forma que días largos y temperaturas elevadas favorecen la formación de flores masculinas, mientras que días cortos con temperaturas bajas inducen el desarrollo de flores con ovarios (Instituto Colombiano Agropecuario 1962, Peel 2005, Infoagro 2005).

Esta planta exigente y prefiere suelos francos con buena fertilidad y buen drenaje, tanto interno como superficial. Los suelos mal drenados o muy arenosos no convienen por los riesgos de inundaciones o sequía. El pH debe estar entre 6 y 7, aunque el melón se da bien en suelos ácidos, condición que se debe corregir encalando, labor que es menester hacer previamente, uno o dos meses antes de la siembra, ya que puede presentarse toxicidad en caso de hacer ambas labores al tiempo o con poca anticipación (Enciclopedia Agropecuaria Terranova 2001).

Las plagas de mayor importancia en el cultivo del melón, son las siguientes: Tortuguilla *Diabrotica balteata*, Barrenador *Diaphania* spp, Mosca blanca *Bemisia tabaci*, Nochero *Prodenia* spp, Minador *Lyriomiza sativae*, Pulgones *Aphis gossypii*, (Castillo 1983, Godinez 1984, Sánchez 2001).

Las enfermedades fungosas diagnosticadas (según laboratorio y experiencias de campo) fueron dos, primero Mildiu velludo *Pseudoperonospora cubensis*, y segundo el Tizón o quemazón *Alternaria* sp., ambos observados tanto en campo como en el ámbito de laboratorio, cronológicamente, mildiu velludo comenzó a ocasionar daño foliar a los 28 a 30 días después de la siembra, mientras tanto *Alternaria* sp., se hizo presente a los 60 a 65 días después de la siembra y Nematodos *Meloydogine* spp (Mejicano 1987).

#### **4.3 Nematodos**

Los nemátodos noduladores de raíces (*Meloidogyne* spp.), dentro de los cuales se encuentra *M. artiellia*, son los nematodos fitopatógenos más importantes tanto por su amplia distribución a nivel mundial como por el elevado número de plantas susceptibles a su

parasitismo obligado, siendo la planta de melón huésped de algunas especies (ej., *M. arenaria*, *M. artiellia*, *M. javanica*) en diversos países (Sharma *et al.*, 1992; Castillo *et al.*, 2008).

Los nemátodos noduladores completan su ciclo vital en un periodo de tiempo de 1-2 meses, dependiendo de factores ambientales como la temperatura. El estado infectivo es el de J2 tras la eclosión, los juveniles J2 migran activamente hacia el sistema radical a través del suelo atraídos por exudados radicales, para completar su ciclo los nematodos endoparásitos sedentarios (incluyendo, *Meloidogyne* spp., *Globodera* spp., *Heterodera* spp., etc.) dependen enteramente del éxito de la inducción y mantenimiento de los sitios especializados de alimentación (Pate y Gunning 1972, Bird 1983, Ferris, *et al.*, 1984, Endo 1987, Di Vito y Greco 1988; Vanholme *et al.*, 2004, Karssen y Moens 2006).

La pared celular adyacente al xilema aumenta de grosor formando invaginaciones alineadas con la membrana plasmática, lo cual facilita el transporte de agua del xilema a la célula gigante. Estudios histopatológicos demostraron que el tamaño de los nódulos y el número de núcleos inducidos en las células gigantes dependen de la especie de nematodo, mientras que su número y tamaño parece estar relacionado con la planta huésped (Jones 1972, Gheysen y Fenoll 2002, Vovlas. *et al.*, 2005).

Cuando se presentan daños e infecciones severas se pueden formar agallas del tamaño de nueces, los síntomas de las partes aéreas de las plantas son similares a los que normalmente se ven en otras enfermedades radiculares. Estos incluyen marchites, clorosis, enanismo y reducción en cantidad y calidad de frutos; el sistema radicular se reduce y se notan varios grados de necrosis (Romero y Trabanino 2006).

Para su manejo preventivo se recomienda usar variedades tolerantes, esterilizar semilleros con agua caliente, sembrar plantas antagónicas dentro de los cultivos; entre ellas flor de muerto o marigold, higuerillo, calentar el suelo por medio de plástico transparente y el sol,

practicar el barbecho en período de sequía, limpiar herramientas y maquinarias para evitar la entrada del nematodo a otras áreas.

En el control curativo se aplica nematicidas; algunos fumigantes son biocidas que no solamente controlan nemátodos sino que plagas en general. Sin embargo a finales de los años 70, se conoció la esterilización de 1500 trabajadores bananeros costarricenses, debido a la exposición al nematicida dibromo cloro propano (DBCP), que se aplicó en las plantaciones bananeras de 1967 a 1979. Un estudio demostró una correlación positiva altamente significativa entre el número de horas de aplicación y el porcentaje de trabajadores estériles. Además, se observó una disminución de la cantidad de espermatozoides al aumentar la exposición de los trabajadores a este plaguicida (Ramírez *et. al.*1980).

#### **4.4 Alternativas para disminuir el uso de plaguicidas**

Tradicionalmente, el control de estos patógenos se ha realizada mediante el uso de fumigantes químicos del suelo, como el bromuro de metilo y el 1,3-dicloropropeno. Sin embargo debido a los riesgos ambientales y sanitarios derivados de su aplicación, su utilización se ha prohibido o restringido en los países europeos, limitando el número de alternativas visibles para la desinfección del suelo. Durante los últimos años se han realizado diversos esfuerzos de investigación hacia la búsqueda de otras alternativas para el control de nematodos, que sean aceptables desde la perspectiva ambiental. Por tanto, la investigación, experimentación e integración de diferentes métodos de control de nematodos fitoparásitos, adaptados a las condiciones agroambientales locales sigue siendo una prioridad en fitopatología (Flor 2013).

#### **4.5. Hongos entomopatógenos**

Algunos de estos hongos entomopatógenos han dado muy buenos resultados en el control de nemátodos en diferentes cultivos en el ámbito mundial. *Paecilomyces lilacinus* fue observado por primera vez en asociación con huevos de nemátodos. Luego se encontró parasitando

huevos de *M. incógnita* en Perú. Desde entonces este hongo ha sido asociado al nemátodo nodulador y al nemátodo del quiste. Se ha establecido que *P. lilacinus* controla efectivamente a *M. javanica* en la India, parasitando hembras y huevos. Además, encontró que la habilidad de *P. lilacinus* controlando el nemátodo aumenta cuando este se integra a un material orgánico (Lysek en 1976, Jatala 1986, Culbreath. *et al*, 1986, Stirling 1991, Khan y Saxena 1997, Dávila *et al*, 1999 Chen *et al.*, 2000 b).

Se reportó que al agregar un hongo entomopatógeno al suelo de forma separada como *P. lilacinus* o *Trichoderma harzianum* junto a un substrato orgánico se reduce la actividad patogénica de *M. incógnita*. Al agregar la combinación de ambos hongos al suelo junto al substrato orgánico se reduce la población del nemátodo nodulador y aumenta el vigor de la planta (Khan *et al.*, 2001).

Han sido numerosos los estudios realizados por más de 15 años que sugieren evidencia de que especies de hongos pertenecientes a los géneros de *Verticillium*, *Fusarium*, *Cylindrocarpon*, *Exophiala*, *Gliocladium*, *Paecilomyces* y *Phoma*, pero particularmente las especies de *V.chlamydosporium*, *F. solani*, *F. oxysporum* y *P. lilacinus*, regularmente colonizan quistes y huevos de nematodos (Stirling 1991).

#### **4.6 Hongos endofíticos**

A finales del siglo XIX, varios científicos europeos describieron la presencia de micelio fúngico en los carpelos y semillas de plantas sanas de *Lolium arvense*, *Lolium linicolum*, *Lolium remotum* y *Lolium temulentum*. Estudios realizados sobre el hongo endofítico de *L. temulentum* demostraron que este hongo se transmitía por semilla, ya que sus hifas penetraban en el embrión antes de que las semillas madurasen, y tras la germinación el hongo coordinaba su crecimiento con el de los tejidos de la planta, llegando a colonizar los meristemas laterales y después las inflorescencias (Matute 2013).

La mayoría de hongos endofíticos son ascomicetos y están presentes en gran parte de su ciclo de vida dentro del tejido de la planta. Estos pueden brindar dos tipos de beneficios a las plantas: pueden alterar la fisiología de las plantas llevándolas a aumentar su crecimiento y pueden además incrementar la resistencia al estrés causado por factores abióticos (Matute 2013).

Los hongos endofíticos son mutualistas si: (a) No causan síntomas de enfermedad en la planta hospedera; (b) Son transmitidos a través de la semilla. Cuando no ocurre, éstos deberán transmitirse lateralmente, de planta adulta a otra; (c). Está disperso a través de los tejidos del hospedero. Si las unidades de infección son pequeñas, estas deberán ser numerosas; (d) Colonizan y están extendidos en un hospedero definido; (e) Producen metabolitos secundarios como antibiosis o de naturaleza tóxica (Matute 2013).

Existen tres estrategias fundamentalmente distintas para que los hongos endofíticos presenten una simbiosis con las plantas: (a) Desarrollando una infección que induce algún tipo de resistencia sistémica mediante una biomasa sustancial interna; (b) Produciendo potentes toxinas que presentan un efecto detrimente hacia patógenos de las plantas. (c) Mediante un mutualismo inducido, que envuelve una simbiosis menos precisa o más difusa entre el hospedero y el endofítico. Pocasangre *et al.* 2001, sugiere que la mayoría de los hongos endofíticos son ascomicetos y están presentes la mayoría de su ciclo de vida dentro del tejido de las plantas (Matute 2013).

Con ambos efectos positivos y negativos sobre los caracteres asociados con el gimnasio, parece probable que los hongos endófitos influyen fuertemente en la ecología y la invasividad de *C. stoebe*. Los efectos de hongos endófitos fueron vistos en todas las etapas de su crecimiento, desde la germinación hasta la floración. Los aumentos en la biomasa superficial debido a hongos endófitos se han observado en otras plantas, aunque todavía no en *C. stoebe* (Menjivar 2009).

#### **4.6.1 Relación Planta-Microorganismo mutualista (Hongos endofíticos)**

En los últimos años, los inconvenientes causados por el uso de químicos en la agricultura se han incrementado, lo que ha generado un gran interés en la búsqueda de sistemas de control alternativos. Una de las estrategias presentadas es la utilización de microorganismos que puedan actuar como agentes de biocontrol donde los mecanismos empleados por estos son muchos y de variada naturaleza (Howell 2003, Benítez *et al.* 2004).

La habilidad de un hongo para existir en un hábitat particular como el suelo o la superficie del órgano de una planta, está particularmente determinado por las relaciones ecológicas con otros microorganismos. Estas interrelaciones a menudo son antagonistas naturales, donde uno o más de los organismos puede resultar perjudicado o tener una actividad reducida. Especies como: micorrizas, rizobacterias y hongos endofíticos, son los más utilizados para el control biológico de enfermedades, debido a su ubicuidad, facilidad para ser aislados y subcultivados, así como, un rápido crecimiento en un gran número de sustratos. En ese sentido, los hongos endofíticos (HE), han sido definidos como microorganismos que colonizan los tejidos u órganos internos de una planta sin causar ningún tipo de daño a la misma (Carroll 1990; Latch 1993; Rey *et al.* 2001; Pocasangre *et al.* 2006; Sikora y Pocasangre 2006).

La mayoría de estos hongos, son ascomicetos y están presentes en gran parte de su ciclo de vida dentro del tejido de la planta, donde pueden alterar la fisiología promoviendo el crecimiento e incrementando la resistencia al estrés causado por factores bióticos o abióticos (Sikora 1992, Pocasangre 2003; Pocasangre *et al.* 2006; Sikora y Pocasangre 2006;).

Los HE son también conocidos por el desarrollo de relaciones planta-microorganismo mutualista donde actúan como antagonistas contra plagas y enfermedades. El éxito de la mayoría de estos hongos se debe a su alta capacidad de reproducción, habilidad para sobrevivir bajo condiciones desfavorables, eficiencia en el uso de nutrientes, promoción de

crecimiento e inducción de los mecanismos de defensa en las plantas (Harman *et al.* 2004; Benítez *et al.* 2004, Sikora y Pocasangre 2006).

#### **4.6.2 Mecanismos de Biocontrol**

Los controladores biológicos son organismos vivos cuya actividad depende de las condiciones ambientales donde habitan y de los mecanismos complejos que actúan sinérgicamente para el control de enfermedades (Howell 2003).

Cuando el agente de biocontrol es un HE, el mecanismo se da como resultado de su habilidad para producir sustancias o metabolitos que impidan la germinación de esporas, inhibiendo la acción del patógeno o modificando la rizosfera por acidificación del suelo, lo cual interfiere el crecimiento del patógeno agresor. Asimismo, el biocontrol puede resultar de la interacción entre los patógenos y el controlador biológico, mediante un micoparasitismo que involucre un contacto físico y la producción de enzimas hidrolíticas, compuestos tóxicos y/o antibióticos que actúan sinérgicamente con las enzimas (Sharon *et al.* 2001, Howell 2003).

En el caso de cepas no patogénicas de *Trichoderma* y *Fusarium*, éstas pueden además, ejercer efectos positivos incrementando el crecimiento de la planta (biofertilización), al mismo tiempo de estimular mecanismos de defensa (Harman 2000).

#### **4.6.3 Biofertilización y estimulación de los mecanismos de defensa en plantas**

Existe un grupo importante de hongos que presentan efectos antagónicos contra otros microorganismos. Sin embargo, aún no se ha logrado determinar con precisión los mecanismos que intervienen en las interacciones entre los antagonistas y los patógenos en la planta huésped (Howell 2003).

Para *Trichoderma*, se ha considerado un complejo de mecanismos que incluye: competencia por nutrientes y espacio, antibiosis, micoparasitismo e inducción de resistencia. Hongos como *Fusarium oxysporum* no patogénico, se le adjudican como modos de acción más importantes: inducción de resistencia, competencia por nutrientes en la rizósfera y competencia por sitio de infección (Hammerschmidt y Kuc 1995, Harman *et al.* 2004, Tam 2005).

#### **4.6.4 Colonización en raíces de plantas**

Cepas de *Trichoderma* colonizan primero las raíces de las plantas, estimulan el crecimiento y confieren protección contra infecciones (Benítez *et al.* 2004).

Algunas cepas de *Trichoderma* establecen largos periodos de colonización en las raíces de las plantas, penetrando en el interior de la epidermis donde producen compuestos capaces de inducir local o sistemicamente una respuesta de defensa por parte de la planta. La síntesis y acumulación de fitoalexinas, flavonoides, terpenoides, derivados fenólicos y otros compuestos antimicrobiales, actúan contra la invasión de hongos patógenos (Harman *et al.* 2004, Chet *et al.* 2006).

#### **4.6.5 Biofertilización**

La colonización de las raíces por *Trichoderma*, además, de aumentar el crecimiento y desarrollo de las raíces, puede también aumentar la productividad del cultivo, darle resistencia al estrés abiótico y una eficiente toma y uso de nutrientes por parte de la planta. La producción en los cultivos puede incrementarse hasta un 300% después de la inoculación de *Trichoderma hamatum* o *Trichoderma koningii*. También, reportan en experimentos llevados a cabo en invernadero, un aumento considerable en la producción, con semillas de plantas previamente tratadas con esporas de *Trichoderma* (Harman *et al.* 2004).

Sin embargo, existen muy pocos reportes de cepas que producen factores de crecimiento (auxinas, citoquininas y etileno) que son detectados e identificados en el laboratorio (Benítez *et al.* 2004).

La producción controlada de estos componentes, junto con la síntesis o estimulación de fitohormonas, sumada a la adición de cepas de *Trichoderma* acidificando su ambiente circundante por secreción de ácidos orgánicos, puede mejorar la biofertilización. Estos ácidos orgánicos resultan del metabolismo de otras fuentes de carbono principalmente glucosa, con capacidad de solubilizar fosfatos, micronutrientes y minerales cationes incluyendo hierro, manganeso y magnesio (Osiewacz 2002, Howell 2003).

Por lo tanto, la adición de *Trichoderma* a suelos donde estos cationes son escasos resulta en la biofertilización por la solubización del metal, mejorando la estructura del suelo e incrementando la productividad del cultivo (Benítez *et al.* 2004).

#### **4.6.6 Estimulación de la resistencia en plantas y mecanismos de defensa**

La habilidad de cepas de *Trichoderma* para proteger plantas contra patógenos de raíces puede ser atribuida al efecto antagonista contra la invasión del patógeno. No obstante, estas asociaciones de raíz-hongo también estimulan los mecanismos de defensa de la planta, donde cepas de *Trichoderma* adicionados a la rizósfera protegen las plantas contra diferentes clases de patógenos, incluyendo virus, bacterias y hongos, mediante mecanismos de resistencia similares a la respuesta hipersensible, resistencia sistémica adquirida (SAR) e inducción de resistencia sistémica (ISR) (Howell 2003, Harman *et al.* 2004).

A nivel molecular, la resistencia resulta en el incremento en la producción de metabolitos y enzimas relacionados con los mecanismos de defensa, tales como las enzimas fenil-alanina amonio-1yase (PAL) y chalcone sintasa (CHS), involucradas en la biosíntesis de fitoalexinas y de proteínas relacionadas con la patogenicidad como: quinasas y  $\beta$ -1,3- glucanasas, entre otros (Benítez *et al.* 2004).

Investigaciones en ese sentido, han revelado que la expresión de la quitinasa (Chit42) de *Trichoderma harzianum* en plantas de tabaco y papa resulta en líneas transgénicas altamente tolerantes o completamente resistentes contra *Alternaria alternata*, *Alternaria solani*, *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani*. De esta manera, la protección de plantas parece ser un resultado exclusivamente del incremento en la actividad enzimática de estas enzimas. En otros casos, expresiones heterogéneas de pectinasas y glucanasas en plantas resultan en un refuerzo enzimático contra patógenos pero no en estimulación específica de los mecanismos de resistencia en plantas (Benítez *et al.* 2004).

#### **4.6.7 Modificación de la rizósfera**

El ambiente del suelo influye en la germinación de esporas, formación de clamidiosporas y en la producción de metabolitos secundarios, tales como sideroforos, antibióticos y enzimas, que impiden la colonización por patógenos (Eisendle *et al.* 2004).

Las condiciones de pH es uno de los factores más importantes afectando la actividad de diferentes microorganismos en el suelo. Algunos antibióticos son degradados por pH altos, aire seco, y pH bajo induciendo degradación de enzimas por ácidos proteicos inhibiendo el crecimiento de hongos patógenos por la acción de ácidos débiles, como el ácido salicílico (Delgado *et al.* 2002).

Uno de los mecanismos de *Trichoderma* para alcanzar la colonización y control de patógenos en una dinámica de ambiente de pH es responder adecuadamente para cada condición de pH. Las cepas de *Trichoderma* son capaces de modificar el pH externo y adaptar su metabolismo a las condiciones de crecimientos circundantes reduciendo consecuentemente la virulencia del fitopatógeno (Benítez *et al.* 2004).

#### **4.6.8 Antibiosis**

La producción de metabolitos inhibidores por agentes de control biológico fúngicos se ha introducido en la literatura en las últimas cinco décadas. Handelsman y Parke (1989) y Chet

*et al.*, (1997) restringen la definición de antibiosis, para las interacciones que involucran compuestos difusibles de bajo peso molecular o a un antibiótico producido por un microorganismo que inhibe el crecimiento de otro microorganismo; esta definición excluye proteínas o enzimas que puedan matar al patógeno. Beker y Griffin (1995) extienden el espacio de la definición a la inhibición o destrucción de un organismo por la producción metabólica de otro, de este modo incluyen pequeñas moléculas tóxicas, volátiles y enzimas hidrolíticas (Ochoa 2002)

Muchas cepas de *Trichoderma* producen metabolitos tóxicos volátiles y no volátiles que impiden la colonización por microorganismos antagonistas; entre estos metabolitos, la producción de ácido arcánico, alamethicina, tricholin, peptaibols, antibióticos, 6-pentyl- $\alpha$ -pyrone, massalactone, viridina, gliovirin, entre otros, son los más conocidos. Por ejemplo en plantas de tabaco, aplicaciones exógenas de peptaibols inducen una respuesta de defensa y reducen la susceptibilidad del tabaco ante el virus del mosaico (Vey *et al.* 2001; Wiest *et al.* 2002).

#### **4.6.9 Micoparasitismo**

El ataque directo de un hongo sobre otro, es un proceso que involucra eventos secuenciales, incluyendo el reconocimiento, ataque y la subsecuente penetración y muerte del huésped. En el caso de *Trichoderma*, el primer paso consiste en detectar al hongo y colonizarlo rápidamente. Posteriormente, une al patógeno con las paredes de células carbohidratadas y forma la estructura apresoria con bajos niveles de una endoquitinasa extracelular que provee liberación de oligomerasas del hongo, lo que induce la expresión de endoquitinasas fungitoxicas que se difunden antes de que el contacto sea realmente logrado (Viterbo *et al.* 2002, Harman *et al.* 2004; Benítez *et al.* 2004).

#### **4.6.10 Inducción de resistencia**

La inducción de resistencia consiste en la estimulación, por parte de moléculas activadoras, de los mecanismos de defensa en el hospedante (Riveros 2001).

En ciertos casos, la inducción de resistencia inicia con una respuesta local por parte de la planta alrededor del punto de necrosis y es asociada con un incremento rápido de la síntesis de ácido salicílico (AS) y la posterior activación de un gran número de genes que codifica para la producción de proteínas (PR) relacionadas con la patogenicidad. Subsecuentemente, la resistencia se expresa sistemicamente y se desarrolla en todas las partes de la planta, fenómeno conocido como: Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) (Durrant y Dong 2004).

En la actualidad, se han sugerido una serie de inductores sintéticos de resistencia que involucran el ácido salicílico (AS) como señal intermediaria que conduce a SAR inhibiendo la acción de la catalasa; convirtiendo el  $H_2O_2$  en  $H_2O$  y  $O_2$ . La inhibición resulta en una acumulación de especies reactivas de oxígeno que puede actuar como mensajeros secundarios para inducir la expresión de los genes responsables de SAR (Chen *et al.* 1993).

No obstante, algunos autores consideran que la inhibición de la catalasa no solo se logra por acción del AS. La inducción de ciertas proteínas no es producto de la acumulación del  $H_2O_2$  sino del AS directamente, además, la actividad de la enzima no decrece con el tratamiento de AS. Así mismo, los niveles de AS dentro del tejido son muy bajos como para inhibir la catalasa, y el  $H_2O_2$  en altos niveles también puede inducir la producción de AS (Hammerschmidt y Smith 2000).

Diferentes inductores bióticos como proteínas, glicoproteínas, péptidos, quitina, glucano, polisacaridos y lípidos, han sido encontrados en fluidos de esporas en germinación, filtrados de cultivos de hongos y bacterias, paredes celulares o membranas de hongos fitopatógenos, al igual que en el espacio apoplástico de las plantas donde se encontraba el hongo en proceso de colonización intercelular (Darvill y Albersheim 1984, Riveros 2002).

De otro lado, se ha desarrollado resistencia sistémica inducida a partir de la colonización de las raíces de la planta por microorganismos de la rizosfera, particularmente rizobacterias. Esta resistencia se caracteriza por estar mediada de vías metabólicas sensibles al ácido jasmónico y etileno, además de ser independiente de la expresión de los genes PR y del ácido salicílico (Tuzun y Bent 2000, Madriz 2002).

La doble inoculación del hongo *Fusarium oxysporum*, cepa 162 (Fo162) aplicado a 16106 unidades formadoras de colonias/g de suelo, primero en la siembra y luego a trasplantar, reduce la penetración de *Meloidogyne incognita* en raíces de 3 razas de squash y melón hasta el 69 y 73%, respectivamente, en comparación con el control sin tratar que había más de 250 nematodos por sistema radicular. Re-aislamiento de Fo162 desde las raíces de squash fue del 28% y el 27% del melón. La colonización en melón fue mayor en la zona de raíz superior que en las otras dos porciones de raíz (zonas medias y bajas). En melón no hubo efectos significativos en el crecimiento de la planta. En conclusión, los resultados mostraron que la actividad biocontroladora de Fo162 contra nematodos parásitos de plantas no se limita a las plantas de ciertas familias, y que tiene el potencial para ser utilizado en cucurbitáceas cultivos tales como la calabaza y melón (R. D. Menjivar *et. al.* 2011)

#### **4.6.11 Trichoderma spp**

*Trichoderma* spp., es un hongo anaerobio facultativo que se encuentra naturalmente en un número importante de suelos agrícolas y otros tipos de medios. Pertenecen a la subdivisión Deuteromycete, que se caracterizan por no poseer o no presentar un estado sexual determinado, se presenta naturalmente en diferentes rangos de zonas de vida y hábitat, especialmente en aquellos que contienen materia orgánica o desechos vegetales en descomposición, así mismo en residuos de cultivos, especialmente en aquellos que son atacados por otros hongos, su desarrollo se ve favorecido por la presencia de altas densidades de raíces, las cuales son colonizadas rápidamente por estos microorganismos (Matute 2013).

El género *Trichoderma* es uno de los hongos ampliamente utilizado, debido a sus múltiples beneficios, es el fungicida biológico más estudiado y empleado, de igual forma es estimulador de crecimiento en plantas y utilizado como agente de bioremediación ya que degrada algunos grupos de pesticidas de alta persistencia en el ambiente (Matute 2013).

Mecanismos demostrados recientemente, con los cuales *Trichoderma* actúa como biocontrolador y como colonizador de las raíces son: Micoparasitismo, antibiosis, competición por nutrientes y espacio, desactivación de las enzimas de los patógenos, tolerancia al estrés por parte de la planta al ayudar al desarrollo del sistema radical, solubilización y absorción de nutrientes inorgánicos y resistencia inducida (Matute 2013).

Hidalgo (1999) describe el comportamiento de *Trichoderma* con respecto al biocontrol de fitonematodos, mediante la capacidad de envolver en micelio al nematodo, además produce metabolitos como Trichodermin, Suzukacilina, Alameticina, Dermadina, penicilina, Trichotecenosa y Tricorzinianos sintetizados por *T. Harzianum* y Glitoxina producido por *T. atroviridae*, actuando como nematocidas (Matute 2013).

#### **4.6.12 *Fusarium* spp**

Se han realizados estudios de control biológico desarrollados a partir del descubrimiento de la existencia de suelos supresores de las vasculariosis producidas por *Fusarium*. En donde se ha comprobado la existencia en esos suelos de cepas no patogénicas de *F. oxysporum* y cepas de *Pseudomonas fluorescens* cuya presencia e interacción producen un efecto supresor. La eficacia de un control biológico de este tipo está en función de la densidad de la población de este microorganismo antagónico y de las cepas, debido a que no todas tienen la misma eficacia (Matute 2013).

Se ha demostrado que las cepas no patogénicas de *F. oxysporum* tiene tres modos de acción: competencia por nutrientes en la rizósfera, competencia por la infección de sitios en la rizósfera y la inducción de resistencia (Matute 2013).

Otros estudios han documentado que aislados de *F. oxysporum* tienen efecto en el crecimiento de banano con la presencia del nemátodo barrenador *R. similis*, aunque sí reducen la capacidad reproductiva de los nemátodos en el sistema radical (Matute 2013).

## **V. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Ubicación del Lugar**

Esta investigación se realizó en dos etapas, (en laboratorio y campo) comprendida entre los meses de agosto a septiembre y octubre de 2015 a enero de 2016 respectivamente. La fase uno se hizo en el laboratorio de entomopatógenos de la Universidad Nacional de Agricultura, ubicada en el kilómetro seis, carretera que conduce hacia Dulce Nombre de Culmí, y la fase dos se desarrolló en la empresa AgriPac (Agroindustrias del Pacífico) del Ingeniero Reynaldo Chavarría, la cual está situada en la aldea de Guasaule, municipio del triunfo, departamento de Choluteca, Honduras CA. Con una altitud de 104 msnm (google earth 2016).

### **5.2 Materiales y Equipo**

Se utilizaron placas Petri de 9mmx15mm, papel toalla, papel filtro, bolsas de polipropileno, espátulas, bandejas, agua destilada, papel parafilm (sellar), balanza, bisturí, cubre y porta objetos, beaker, cámara de Neubauer, Erlenmeyer, jeringas, alcohol 70%, alcohol de quemar, baldes, marcador permanente, maskin tape, grapadora, cedazo, pinzas, cámara de flujo Laminar (biosafetyclass 2 labconco), auto claves (All américa model 25x), micropipeta 5µl a 50 µl (Transferpette), horno (Gallenkank), plato caliente (fisherScientific.), refrigeradora, microscopio (Meiji), estereoscopio (Meiji), libreta de campo, lápices, cepas de hongos endofíticos *Trichoderma* sp y *Fusarium* sp, embudo Baermann, tamices, cámara fotográfica, machete, estacas y cinta métrica.

**Cuadro 1.** Género y Origen de los Diferentes Hongos que se Utilizaron.

| Aislado<br>Código | Género             | Origen    |                            |             |
|-------------------|--------------------|-----------|----------------------------|-------------|
|                   |                    | Cultivo   | Lugar                      | Nombre      |
| SV – 1            | <i>Trichoderma</i> | Banano    | Vernon, San Luis Olanchito | Vernon 2    |
| SV – 6            | <i>Trichoderma</i> | Banano    | Hogge, San Luis Olanchito  | Hogge 1     |
| SV – 8            | <i>Trichoderma</i> | Banano    | Hogge, San Luis Olanchito  | Hogge 3     |
| SV – 9            | <i>Trichoderma</i> | Banano    | Hogge, San Luis Olanchito  | Hogge 4     |
| SV – 10           | <i>Trichoderma</i> | Banano    | Hogge, San Luis Olanchito  | Hogge 5     |
| SV – 13           | <i>Fusarium</i>    | Chile     | Sabana Larga, Comayagua    | Tabaco R    |
| SV – 14           | <i>Fusarium</i>    | Berenjena | Cacahuapa, Comayagua       | Berenjena 2 |
| SV – 15           | <i>Fusarium</i>    | Tomate    | Ajuterique, Comayagua      | Tomate 2    |

**Fuente:** Zabulón 2016.

### 5.3 Primera etapa

#### 5.3.1 Asepsia del Laboratorio

El laboratorio de entomopatógenos fue sometido a procesos de limpieza general y desinfección, desde equipo e infraestructura; para el cual se utilizó como agente desinfectante el hipoclorito de sodio al 3.62 % concentración comercial, y este se disolvió hasta una concentración del 2 %. Se lavaron todos los materiales con agua destilada y detergente para remover cualquier residuo de materia orgánica, y luego se sometieron a abundante agua para remover partículas del detergente. Después de lavado y secado se sometieron a esterilización bajo dos métodos: La esterilización húmeda (Auto –clave 121.6 C° a 124 C°, 20 minutos con una presión de 2 atmosferas) y esterilización con aire caliente (horno), la utilización de cada método dependió de los materiales a esterilizar.

La esterilización de los materiales y cristalería por calor húmedo o a presión de vapor de agua, se hizo en el autoclave, el cual se manejara a una presión de 2 atmosferas o 15 libras

de presión hasta alcanzar a una temperatura de 121.6 C° a 124 C°, la cual se debe mantener durante un tiempo de 30 minutos; se esterilizaron los medios de cultivo, platos petri, tubos de ensayo, papel toalla, probetas.

La esterilización con aire seco se llevó a cabo en el horno y consistirá en la entrada de aire y calentamiento del mismo, a una temperatura de 121°C por un tiempo de 15 a 20 minutos, este método se utilizó para equipo como ser beakers, elenmeyer, pipetas, y materiales como el suelo y substrato.

### **5.3.2 Desinfección de la Cámara de Aislamiento**

La cámara de aislamiento se desinfecto antes de cada aislamiento con alcohol al 70%, por dentro y afuera de la misma, se encendió el mechero y se mantuvo la cámara cerrada por termino de un minuto, el mechero estuvo encendido en todo el proceso de siembra, luego se procedió a realizar los aislamientos; la desinfección personal se llevó a cabo siempre antes de realizar aislamientos y después de los mismos, y consistió con la aplicación por aspersión a la manos con alcohol al 70%. Como último paso para la desinfección fue utilizada la luz ultravioleta tipo C durante 10 o 15 segundos, con el objetivo de eliminar cualquier contaminante que haya ingresado al momento de realizar el aislamiento.

### **5.3.3 Preparación de Sustrato**

Este fue sometido a un proceso de desinfección, el cual se hizo a través del autoclave a 127°C a 20 psi, posteriormente se dejó a temperatura ambiente durante tres días para que sufriera un proceso de enfriamiento.

#### **5.3.4 Siembra**

La siembra se realizó en bandejas de 200 celdas de 61 mm profundidad, a una semilla por postura, sembrando 5 plantas para cada tratamiento, las cuales se llevaron al invernadero dos días después de emergidas.

#### **5.3.5 Preparación de la Suspensión de Esporas**

Bajo condiciones asépticas, se procedió a remover las esporas con la aplicación de 10 ml de agua estéril. Se efectuó un rayado con una espátula de aluminio, que facilita el raspado del micelio del hongo. La solución resultante se filtró por medio de una gasa y decantada en un beaker de 250 ml.; esto se hizo para obtener una solución de esporas. De cada solución resultante se hicieron conteos para medir la concentración de esporas mediante la cámara de Neubauer. La suspensión de esporas se ajustó a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/ml para cada tratamiento.

#### **5.3.6 Inoculación**

Esta se realizó en el invernadero de la sección de hortaliza, con una suspensión de esporas concentradas en  $1 \times 10^6$  esporas/ml por cada gramo de sustrato, en cada tratamiento se hicieron dos inoculaciones, la primera inoculación se realizó a los seis días después de siembra y la segunda a las 24 o 48 horas antes del trasplante, esta metodología se realizó en las dos etapas, donde se aplicaron a 2.5 ml/planta de solución.

#### **5.3.7 Pruebas de Colonización**

Utilizando la metodología de Cañizares (2003), el aislamiento de los hongos endofíticos se efectuó a partir de las raíces colectadas. Las raíces se cortaron en secciones de un cm, se introdujeron y se agitaron por cinco minutos en hipoclorito de sodio al 3% y se lavaron con

agua esterilizada por tres veces. Para remover el exceso de agua, las secciones de las raíces se colocaron sobre papel toalla esterilizado en autoclave.

Posteriormente estas raíces se llevaron a la cámara de aislamiento, donde fueron cortadas en pequeños pedazos de aproximadamente 1 cm de largo. La parte radicular se dividió en tres zonas; zona 1 la parte inferior, zona 2 la parte central, la zona 3 la parte cercana al tallo, con el objetivo de encontrar la parte de la raíz donde el hongo coloniza, estos pedazos se colocaron en medio de cultivo (PDA 100%), una semana después éstos aislados se pasaron a un medio de cultivo para su purificación.

## **5.4 Segunda etapa**

### **5.4.1 Desinfección de Bandejas**

Se utilizó una bandeja con 200 celdas, la cual se lavó con detergente y abundante agua para eliminar residuos de materia orgánica, posteriormente se sumergió en hipoclorito de sodio al 3% durante 15 minutos después se procedió a atomizarla con alcohol al 70% para erradicar la presencia de cualquier organismo.

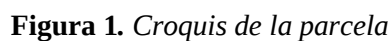
### **5.4.2 Siembra**

Se humedeció el sustrato antes de la siembra, esta se realizó en bandejas germinativas de 200 celdas de 61 mm profundidad, a una semilla por postura, sembrando 25 plantas para cada tratamiento, las cuales se llevaron al invernadero en cuanto emergieron.

### **5.4.3 Trasplante**

Antes de establecer los tratamientos, se hizo un análisis de suelo para determinar la población de nematodos. Las plantas se trasladaron al campo presentaron una hoja verdadera, donde se les dio el manejo agronómico establecido por la empresa.

Se hicieron dos muestreos de raíces para cada tratamiento, con un rango de tiempo de 30 días entre cada uno. Por cada muestreo se tomaron tres plantas, las cuales fueron envueltas en papel periódico mojado, empacadas en bolsas plásticas con sus respectivas etiquetas para que posteriormente llevarlas hasta el laboratorio, en una hielera a una temperatura de 10°C.



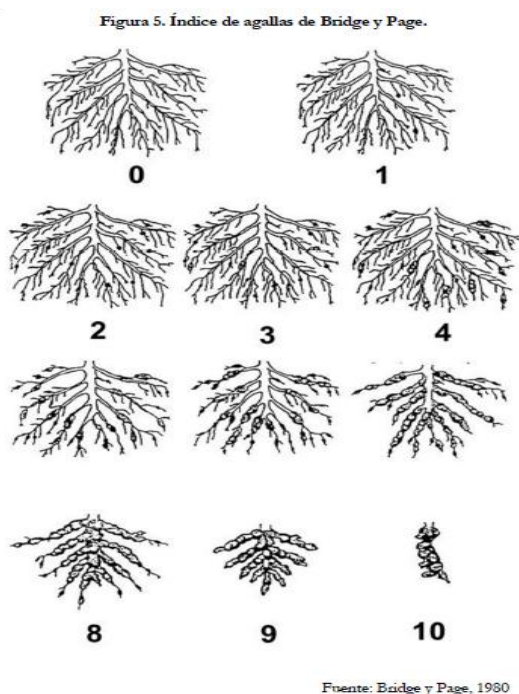
- Penetración de nemátodos por cada 100 gramos de raíz.
- Estimación del índice de agallas en las raíces.
- Volumen de la raíz.
- Peso de la raíz.
- Diámetro del tallo.
- Incidencia de plagas.
- Días a floración.
- Días a fructificación.
- Frutos por metro lineal.

### 5.5.3 Penetración de nemátodos por cada 100 gramos de raíz

Para esta variable se utilizó el método de maceración, en el cual se cortaron las raíces en trozos de un centímetro, luego estos se introdujeron en la licuadora aforada con 200 ml, se macero durante 10 segundos a velocidad baja y 10 a velocidad alta. Este contenido fue tamizado en un juego de cribas de 0.23 mmy 0.15, los nemátodos colectados en el último tamíz se traspasaron a un beaker de 250 ml. Posteriormente se tomaron alícuotas de 1 ml, para ser depositadas en la cámara de conteos. Los resultados fueron promediados y expresados en base a 100 gramos de raíz.

### 5.5.1 Estimación del índice de agallas en las raíces

La severidad de los síntomas causados por *M. incognita* en el sistema radicular se estimó mediante la observación del índice de agallas en las raíces infestadas y en una escala de 0 a 10 (0: Ninguna agalla, 7: 100% de las raíces presentan agallas; 10: No existe sistema radicular y la planta está muerta) (Bridge y Page 1980).



**Figura 2.** Índice de agallas en las raíces.

#### **5.5.5 Volumen de la raíz**

El volumen de la raíz se obtuvo en base al principio de Arquímedes, el cual dice que todo cuerpo sumergido desplaza su volumen, para el cual sumergimos las raíces en una probeta con agua del grifo.

#### **5.5.6 Peso de la raíz.**

Las raíces se lavaron para separarlas de partículas de suelo, teniendo el cuidado de no perder parte del sistema radicular, una vez hecho esto, se colocó sobre papel toalla por un periodo de 15 minutos para eliminar la humedad de estas. Transcurrido este tiempo las raíces se separaron del resto de la planta y se pesaron con ayuda de una balanza de precisión.

#### **5.5.7 Diámetro del tallo**

Se tomaron con un calibrador o pie de rey, las medidas se tomaron a 10 mm del suelo hacia arriba.

### **5.6 Diseño experimental**

Para las evaluaciones de inducción a resistencia y/o tolerancia a nemátodos, se utilizó un diseño completamente al azar (DCA), con 10 tratamientos (cinco de *Trichoderma*, tres de *Fusarium* no patogénicos, un tratamiento químico y un testigo absoluto) con una repetición por tratamiento, siendo cada parcela la unidad experimental. Cada tratamiento tenía un área de 22.5 m<sup>2</sup> con una densidad de veinticinco plantas, con una parcela útil de 8.1 m<sup>2</sup> y una densidad de nueve plantas. Para la toma de datos de cada repetición, se seleccionaron las plantas de la parcela útil en forma aleatoria.

### 5.6.1 Modelo Estadístico

El modelo estadístico usado es:

$$Y_{ij}: \mu + T_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

$\mu$ : El verdadero efecto de la media

$T_i$ : Efecto del i-ésimo tratamiento.

$\epsilon_{ij}$ : Error experimental.

### 5.6.2 Análisis Estadístico

Con los datos obtenidos se realizó un Análisis de varianza (ANAVA), con el software Info

## VI DISCUSIÓN Y RESULTADOS

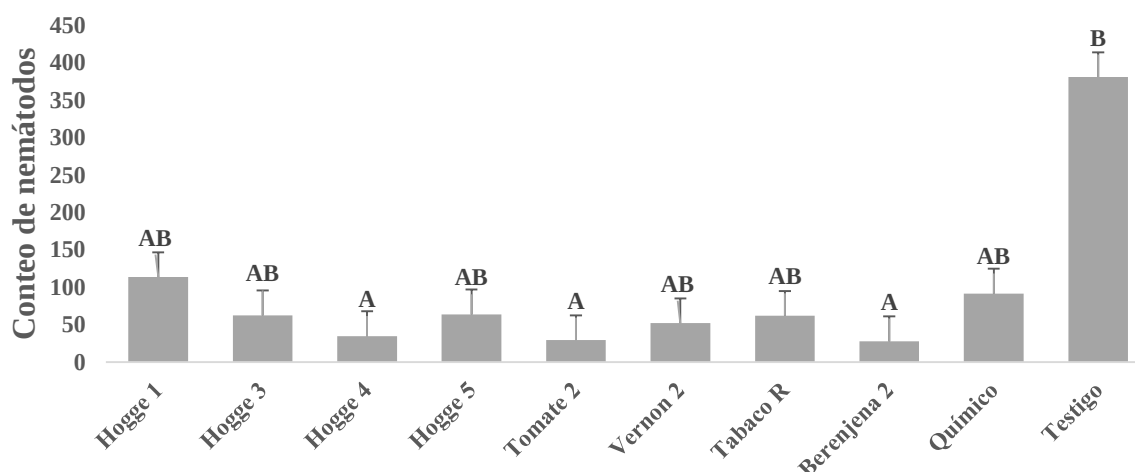
Antes de evaluar los tratamientos en campo, se inocularon 15 cepas de endofíticos (10 *Trichoderma* y 5 *Fusarium*) en plantas de melón para hacer pruebas de colonización, de las cuales colonizaron 8 cepas (cuadro 2).

**Cuadro 2=** Cepas de hongos endofíticos que colonizaron raíces de melón

| Nº | Tratamiento | Género                 |
|----|-------------|------------------------|
| 1  | Hogge 1     | <i>Trichoderma</i> spp |
| 2  | Hogge 3     | <i>Trichoderma</i> spp |
| 3  | Hogge       | <i>Trichoderma</i> spp |
| 4  | Hogge 5     | <i>Trichoderma</i> spp |
| 5  | Vernon 2    | <i>Trichoderma</i> spp |
| 6  | Tomate 2    | <i>Fusarium</i> spp    |
| 7  | Berenjena 2 | <i>Fusarium</i> spp    |
| 8  | Tabaco R    | <i>Fusarium</i> spp    |

### 6.1 Penetración de nematos por cada 100g de raíz

Los resultados encontrados para la variable penetración de nemátodos en la raíz del cultivo de melón, reflejan que los tratamientos de Hogge 4, Tomate 2 y Berenjena 2 a base de *Trichoderma* para el primero y *Fusarium* para los restantes, presentan cantidades significativas de *M. incognita* por debajo del testigo. El resto de los tratamientos incluyendo el Químico no mostraron una penetración del fitonematodo diferente estadísticamente al Testigo, aunque los endofíticos que superaron al Testigo, no lo hicieron con el tratamiento Químico (figura 3)



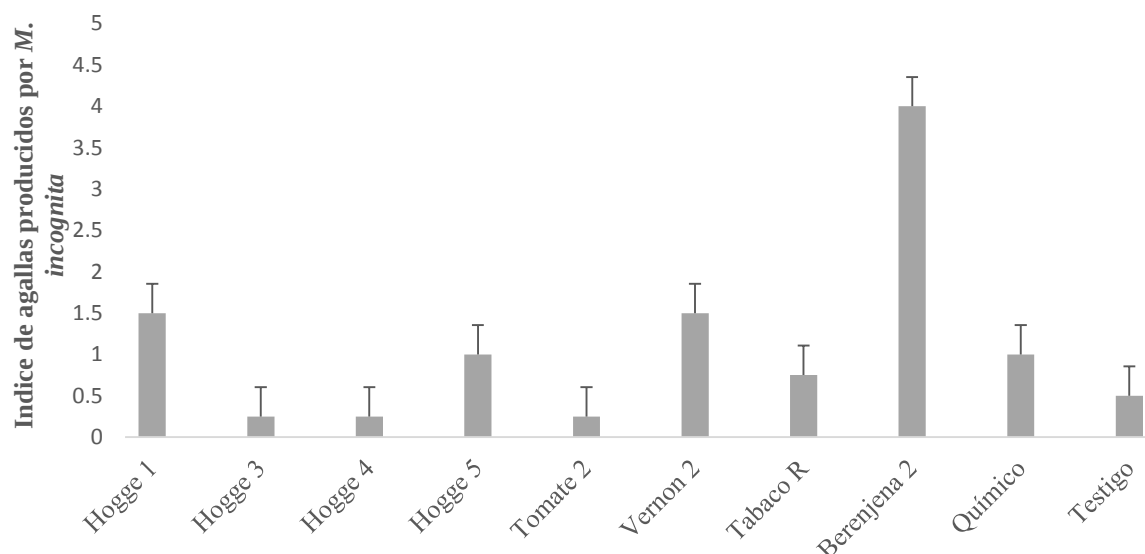
**Figura 3.** Efectos de hongos endofíticos sobre la penetración del fitonemátodo *M. incognita* Barras representan la media del error estándar. Columnas con letras diferentes, demuestran que hay diferencias estadísticas significativas según la prueba de Tukey al 5% de probabilidad.

Trabajos de biocontrol realizados por otros investigadores como Zum Felde (2002), Meneses (2003), Cañizares (2003) y Menjivar (2005), demostraron que aislados endofíticos de *Trichoderma* y *Fusarium* no patogénico son capaces de reducir la tasa de reproducción de *R. similis* hasta un 85% en raíces de banano. Menjivar (2010), Encontró que la penetración de nematodos en calabaza, melón y pimiento se redujo significativamente en un 83, 70 y 73% en plantas tratadas con endofíticos cuando se compara con el control no tratado, respectivamente. Estos resultados muestran claramente el impacto de estos hongos como un agente de biocontrol hacia *M. incognita*.

## 6.2 Índice de agallas

De acuerdo con el análisis de varianza realizado para esta variable, se encontró que los promedios para cada tratamiento no presentaron diferencias significativas entre sí ( $p=0.6175$ ) (Anexo 2). Sin embargo, los tratamientos Hogge 3, Hogge 4 y Tomate 2 (figura 4), aunque no presentaron diferencias estadísticas, mostraron una tendencia a reducir el índice de agallas en la raíz posterior a la penetración de los fitonemátodos. Sin embargo, Menjivar

(2005), encontró que plantas de banano protegidas con hongos endofíticos, presentaron una mejor sanidad radical que testigo absoluto.

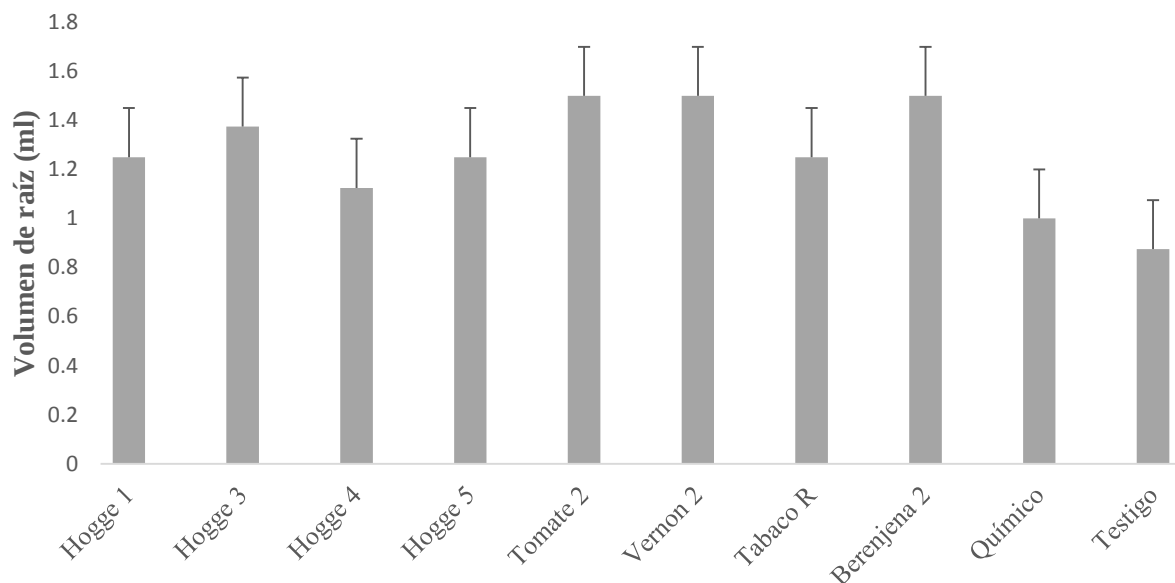


**Figura 4:** Efectos de hongos endofíticos sobre el índice de agallas producido por el fitonemátodo *M. incognita*. Barras representan la media del error estándar.

### 6.3 Volumen de raíz

Para esta variable, se refleja un comportamiento similar para todos los tratamientos evaluados al no encontrarse en los datos obtenidos una diferencia significativa según el ANOVA; Sin embargo, los tratamientos Berenjena 2, Tomate 2 y Vernon 2, presentaron una tendencia similar en general, superior al resto de los tratamientos (figura 5).

Jaizme (2005), Encontró un efecto en el desarrollo del sistema radical del banano, mejorando la nutrición y salud de la planta. Resultados similares fueron encontrados por Reissinger (1995), quien uso hongos endofíticos en banano encontrando promoción de crecimiento en el sistema radical. Recientemente, se encontró que una cepa de *Trichoderma* contribuye al crecimiento en cuanto a profundidad de las raíces del maíz y algunos pastos, haciendo que estos cultivos sean más resistentes a la sequía. (Hannan, 2001).

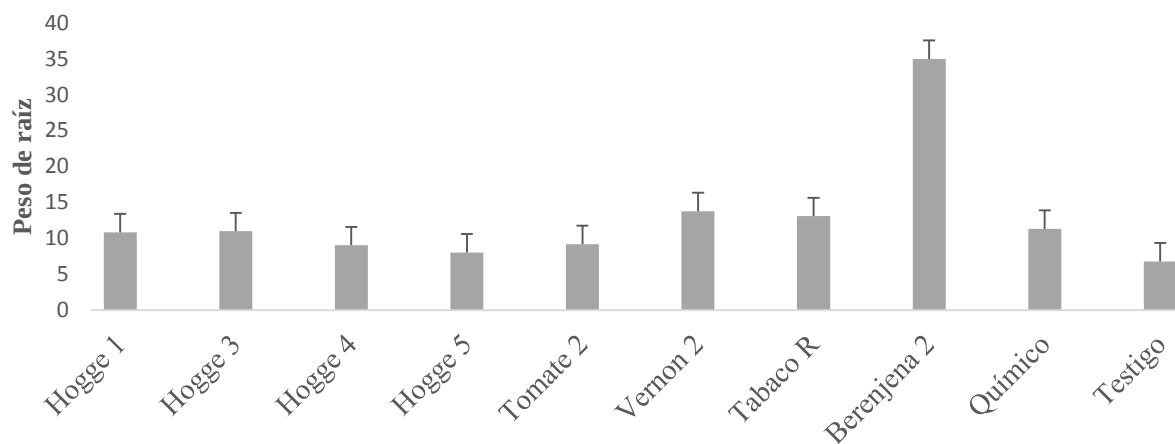


**Figura 5:** Efectos de hongos endofíticos sobre el volumen de raíz. Barras representan la media del error estándar.

#### 6.4 Peso de raíz

En la evaluación de esta variable, según los datos obtenidos no se encontró diferencia estadística significativa entre tratamientos ( $\alpha=0.05$ ). Sin embargo, aunque los tratamientos estadísticamente se comportaron de manera similar, Vernon 2 con 13.775 g (*Trichoderma*) y Berenjena 2 con 35 g (*Fusarium*) mostraron una tendencia de posible efecto positivo al presentar valores más altos que los demás tratamientos (figura 6).

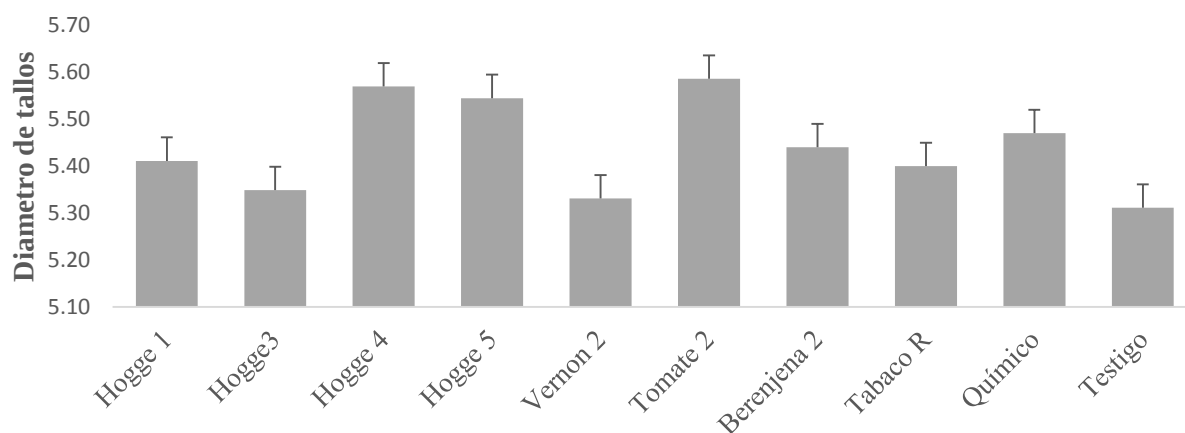
Zum Felde (2002), encontró que plantas inoculadas con los aislados del género *Trichoderma* y *Fusarium*, incrementan el peso de raíces y del sistema foliar en plantas de banano. Tanto en la promoción de crecimiento, como el cambio de la morfología de las raíces en plantas protegidas con hongos endofíticos, fue demostrado por Pocasangre (2002) quien encontró que el peso de las plantas y las raíces, así como el largo total de las raíces fue incrementado significativamente en estas plantas inoculadas, en distintos cultivares de banano (Gran enano, Gros michel, Bloggoe y FHIA-23).



**Figura 6:** Efectos de hongos endofíticos sobre el peso de raíz. Barras representan la media del error estándar.

## 6.5 Diámetro de tallo

Al final de la evaluación de los promedios para los diámetros de tallos en melón, el ANOVA muestra que no hay diferencia estadística significativa entre los diferentes tratamientos ( $\alpha=0.05$ ). Sin embargo los tratamientos Hogge 4 (*Trichoderma*) y Tomate 2 (*Fusarium*) a pesar de mostrar un comportamiento estadísticamente igual, tienden a presentar los valores más altos con respecto a los demás tratamientos (figura 7). No obstante Sosa (2005), reportó que plantas protegidas con hongos endofíticos mostraron un crecimiento significativo de 11% para la variable de altura de planta, 9% para circunferencia de pseudotallo, 6% para la emisión foliar y un 14% en raíz funcional, comparada a las plantas del testigo absoluto.



**Figura 7:** Efectos de hongos endofíticos sobre el diámetro de tallos. Barras representan la media del error estándar.

## 6.6 Incidencia de plagas

La incidencia de plagas se empezó a registrar a partir de los cinco días después del trasplante. Se hicieron muestreos para *Bemisia tabaci*, *Trips* sp, *Aphis gosssypii*, *Diaphania hyalinata* y *Diaphania nitidalis*. Durante todo el ciclo del cultivo se hicieron cuatro muestreos, en todo ese tiempo hubo incidencia de *B. tabaci*, *A. gosssypii*, y *D. hyalinata*. Sin embargo, los datos obtenidos demuestran que no existe diferencia estadística significativa para cada tratamiento ( $\alpha=0.05$ ) y se presenta una tabla (Tabla 1) que resume los promedios de los cuatro muestreos para cada plaga.

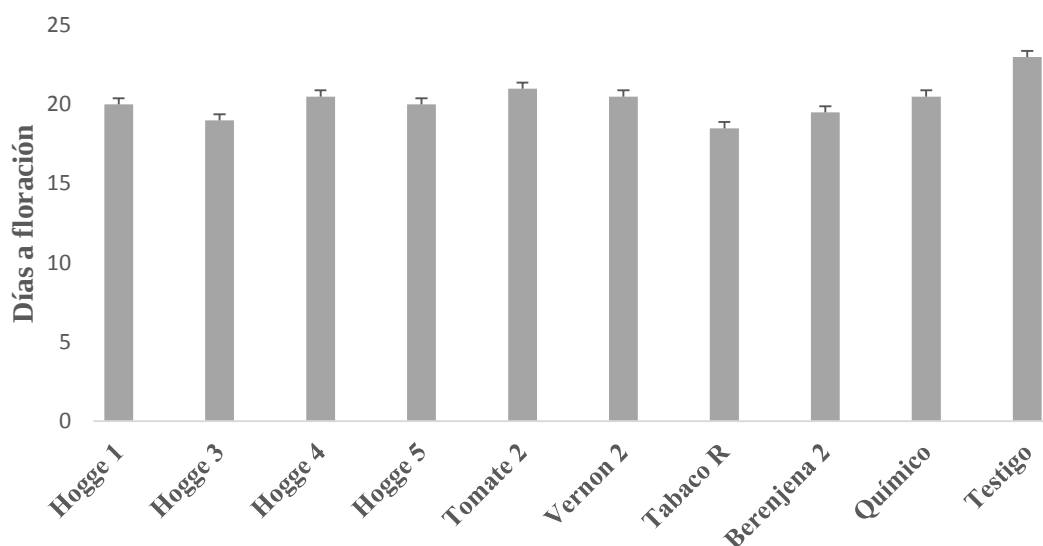
**Cuadro 3=** Promedios denotan que no hay diferencia estadística significativa entre los tratamientos según prueba de Bonferroni al 5% de probabilidad.

| Tratamientos | Variables        |                     |                     |
|--------------|------------------|---------------------|---------------------|
|              | <i>B. tabaci</i> | <i>D. hyalinata</i> | <i>A. gosssypii</i> |
|              | Promedios        | Promedios           | Promedios           |
| Hogge 1      | 1.13             | 0.11                | 0.11                |
| Hogge3       | 0.68             | 0.11                | 0.11                |
| Hogge 4      | 0.79             | 0.14                | 0.14                |
| Hogge 5      | 0.61             | 0.07                | 0.07                |
| Vernon 2     | 0.90             | 0.03                | 0.03                |
| Tomate 2     | 0.72             | 0.03                | 0.08                |
| Berenjena 2  | 0.89             | 0.07                | 0.07                |
| Tabaco R     | 0.65             | 0.33                | 0.33                |
| Químico      | 0.60             | 0.60                | 0.18                |
| Testigo      | 0.69             | 0.69                | 0.33                |

No obstante Menjivar (2010) encontró que al inocular plantas con estos endofíticos, estas son inducidas a resistencia a *B. tabaci* y afectan negativamente al insecto huésped.

## 6.7 Días a floración

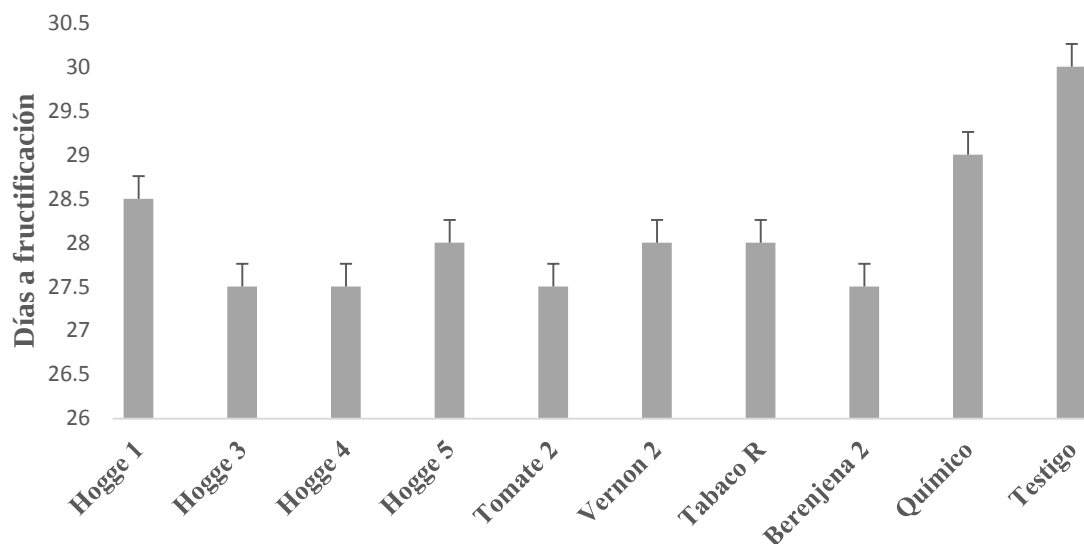
En días a floración, dos de los ocho endofíticos (Tabaco R (*Fusarium*), con 18.5 días y Hogge 3 (*Trichoderma*), con 19 días) alcanzaron esta variable en menor tiempo que el testigo absoluto; sin embargo, ninguno se diferenció estadísticamente, aunque estos mostraron una tendencia a ser numéricamente mejores que los demás tratamientos (Figura 8). No obstante, Menjivar (2005), encontró que plantas de banano protegidas con hongos endofíticos muestran mayor precocidad en días a floración que el testigo absoluto.



**Figura 8:** Efectos de hongos endofíticos sobre los días a floración. Barras representan la media del error estándar.

## 6.8 Días a fructificación

En base a los resultados obtenidos con respecto a la variable de días a fructificación, se encontró que los tratamientos no mostraron diferencia estadística significativa entre ellos ( $\alpha=0.05$ ). Sin embargo, al comparar los tratamientos inoculados con el tratamiento químico y el testigo absoluto, se observa que Hogge 3 (*Trichoderma*) y Tomate 2 (*Fusarium*) a pesar de no diferir estadísticamente, manifiestan menor cantidad de tiempo para llegar a producción (Figura 9). Sin embargo, estudios realizados por Menjivar (2005), demuestran que plantas de banano protegidas con hongos endofíticos presentaron menos días a cosecha.



**Figura 9:** Efectos de hongos endofíticos sobre los días a fructificación. Barras representan la media del error estándar.

## 6.9 Frutos por metro lineal

Esta variable permite conocer si el efecto de los endofíticos como biocontroladores del fitonemátodo *M. incognita* y promotores de crecimiento en el cultivo de melón, influyeron en forma positiva sobre el rendimiento obtenido al final del ciclo. Estos valores de producción se analizaron mediante el ANOVA, el cual mostró que no existe diferencia estadística significativa entre los tratamientos ( $\alpha=0.05$ ). Aunque dentro de estos tratamientos protegidos con endofíticos, Hogge 3 (*Trichoderma*) y Tabaco R (*Fusarium*), tienden a sobresalir numéricamente con una cantidad de 3.3 frutos por metro lineal en comparación al testigo, quien mostró una producción de 2 frutos por metro lineal (Figura 10).

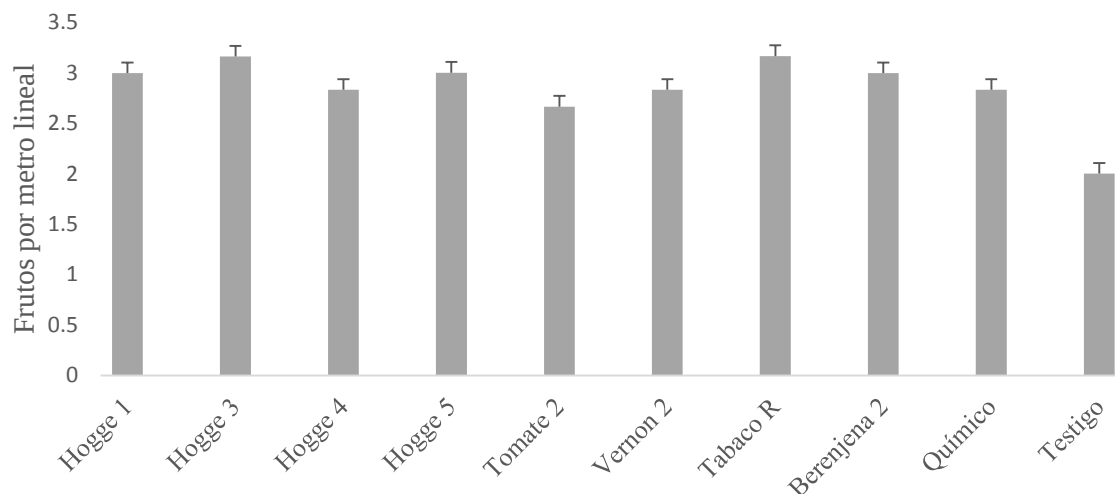


Figura 10: Efectos de hongos endofiticos sobre producción de frutos por metro lineal. Barras representan la media del error estándar.

Estudios realizados por Serrano (2005), muestran que un buen desarrollo radical conlleva a mejorar la productividad. También Speijer *et al.*, (1994) y Fogain (1997), mencionan que existe una correlación positiva entre la densidad de los fitonemátodos y la necrosis radical. Menjivar (2005), mediante estudios realizados, encontró que al inocular plantas de banano con hongos endofíticos, estas presentaron una mayor producción, con mejor peso de racimos y número de manos.

## VII CONCLUSIONES

Estos resultados sugieren que dos inoculaciones con estos hongos endofíticos, protegen la planta contra el ataque de *M. incognita* por un periodo de 70 días y puede sustituir aplicaciones de nematicidas que normalmente se hacen en esta empresa.

Los resultados encontrados evidencian que una de las razones que explican las bajas densidades de nemátodos en los tratamientos protegidos con hongos endofíticos en comparación al testigo, se debe a la presencia de estos, los cuales están ejerciendo su actividad antagonista en forma de biocontrol natural.

Las plantas tratadas con endofíticos presentaron una tendencia a ser mejor en promoción de crecimiento; en cuanto a diámetro de tallo, el mejor tratamiento fue Tomate 2 (*Fusarium*), peso y volumen de raíz el mejor tratamiento fue Berenjena 2 (*Fusarium*), en comparación al testigo.

Los tratamientos inoculados con hongos endofíticos que presentaron mayor tendencia a producción en comparación al testigo fueron: en días a floración, el mejor fue Tabaco R (*Fusarium*), y en cuanto a días a fructificación y frutos por metro lineal, quien obtuvo mejores resultados fue Hogge 3 (*Trichoderma*).

Para el manejo del fitonemátodo *M. incognita* en el cultivo de melón, son necesarias cuatro placas con endofíticos por hectárea, las cuales generan un costo de HNL. 67.6.

## **VIII RECOMENDACIONES**

Seleccionar los tratamientos que tuvieron mejores resultados sobre el manejo de *M. incognita* e incorporarlos en programas de manejo integrado de nemátodos.

Determinar el modo de acción de los hongos endofíticos con respecto al desarrollo fisiológico de las plantas.

Realizar nuevamente esta investigación y aumentar el número de repeticiones.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

**Blanco, J; Ramírez, O. 1993.** La contaminación por plaguicidas percibida por los inspectores de saneamiento ambiental. Escuela de Ciencias Ambientales, Universidad Nacional; 9:59-68 p.

**Benítez; T; Rincón, AM; Limón; MC; Codón; AC. 2004.** Biocontrol mechanisms of *Trichoderma strains*. International Microbiology, Vol. 7, 249-260 p.

**Bird, A. 1983.** Changes in the dimensions of the oesophageal glands in root-knot nematodes during the onset of parasitism. International Journal of Parasitology, 13: 343-348.

**Castillo, P. 1983.** Identificación y control químico de nematodos fitoparásitos, asociados al cultivo del melón *Cucumis L.* Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 62 p.

**Castillo, P. 2008.** Plant parasitic nematodes attack chickpea and their in planta interactions with Rhizobia and phytopathogenic fungi. *Plant Disease*, **92**: 840-853.

**Chavarría S; Lourdes M. 2010.** Programa Desarrollo Económico Sostenible en Centroamérica (DESCA). 1º Edición (Abril 2010).

**Chen; SY; DW; Dickson; DJ. Mitchell. 2000.** Viability of *Heterodera glycines* exposed to fungal filtrates. Journal of Nematology 32(2):190-197.

**Chen; Z; Silva; H; Klessig. 1993.** Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science*, Vol. 262, 1883-1886.

**Chet; I; Viterbo; A; Brotman; Y; Lousky. 2006.** Enhancement of plant disease resistance by the biocontrol agent *Trichoderma*. *Life Sciences*. Weizmann Institute of Science. p. 1-2.

**CONABIO, 2005.** GEF-CIBIOGEM de Bioseguridad. “Melón *Cucumis melo*”.

**Culbreath. 1986.** Chitin and *Paecilomyces lilacinus* for control of *Meloidogyne arenaria*. *Nematropica* 16(1):153-166.

**Darvill; AG; Albersheim. 1984.** Phytoalexins and their elicitors- A defense against microbial infection in plants. *Annual Review Plant Physiological*, Vol. 35, 243-275.

**Dávila, M, et al, 1999.** Capacidad quitinolítica de hongos aislados de suelos agrícolas infestados con el nemátodo nodulador (*Meloidogyne* spp.) en Puerto Rico. *J. Agric. Univ. P.R.* 83(3-4): 189-199.

**Delgado; Jarana, J; Rincón; AM, Benítez, T. 2002.** Aspartyl protease from *Trichoderma harzianum* CECT 2413: cloning and characterization. *Microbiology*, Vol. 148, 1305-1315.

**Di Vito; M., Greco, N. 1988.** Investigation on the biology of *Meloidogyne artiellia*. *Revue Nematol.*, 11: 223-237.

**Durrant, WE; Dong. 2004.** Systemic acquired resistance. *Annual Review*, No.42, 185-209.

**EDITORIAL OCÉANO, 1999.** “Enciclopedia Práctica de Agricultura y Ganadería”, Barcelona-España, 1032 pp.

**Eisendle, M; Oberegger, H; Buttinger, R; Illmer, P; Hass, H. 2004.** Biosynthesis and uptake of siderophores is controlled by the PacC-mediated ambient-pH regulatory system in *Aspergillus nidulans*. Euk Cell, Vol. 3, 561-563.

**Endo, BY. 1987.** Ultrastructure of esophageal gland secretory granules in juveniles of *Heterodera glycines*. Journal of Nematology, 19: 469-483.

**Espinal, Alexis. 2015.** Diez mil empleos generan en el sur temporada de producción de melón. El Herald, Chol, Hnd, ene. 5.

**FUNDACIÓN EROSKI 2005** “Frutas”. Consultado 15 de agosto del 2015 disponible en <http://frutas.consumer.es/index.php>

**George Newcombe; R. Menjivar; et. al 2009.** Endophytes influence protection and growth of an invasive plant. Communicative & Integrative Biology 2(19):1-2.

**Gheysen, G; Fenoll, C. 2002.** Gene expression in nematode feeding sites. Annual Review of Phytopathology, 40: 191-219.

**Giaconi Vicente, M. 1955.** “Cultivo de Hortalizas”, Segunda Edición, Santiago de Chile, 246 pp.

**Godinez, B. 1984.** Biología, dinámica y comportamiento del barrenador *Diaphania* spp. En melón *Cucumis melo* L. en el valle de La Fragua, Zacapa. Tesis ing. Agr. Guatemala, USAC. 68 p.

**Hammerschmidt, R; Smith, R. 2000.** A survey of plant defense responses to pathogens. In: Induced plant defenses against pathogens. 55-71 p.

**Harman, GE. 2000.** Myths and dogmas of biocontrol. Changes in perceptions derived from research on *Trichoderma harzianum* T22. Plant Diseases, Vol. 84, 377-393.

**Harman, GE; Howell, RH; Viterbo, A; Chet, I; Lorito, M. 2004.** *Trichoderma* species opportunistic, avirulent plant simbiotes. Nature Reviews Microbiology, Vol. 2, 43-56.

**Heredia N. y Vieira M, 2002.** “El Cultivo del Melón” [En línea]. Consultado 25 de julio del 2015 disponible en [http://www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/Ing%20Rizzo/perfiles\\_productos/melon.pdf](http://www.sica.gov.ec/agronegocios/biblioteca/Ing%20Rizzo/perfiles_productos/melon.pdf)

**Howell, CR. 2003.** Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Disease, Vol. 87, No.1, 4-10.

**INFOAGRO, 2005.** “El Cultivo del Melón” [En línea]. Consultado el 14 de julio del 2015. Instituto Colombiano Agropecuario, (1962) Hortalizas Manual de Asistencia Técnica N° 28, Bogotá, Colombia, 421 pp.

**Jatala, P. 1986.** Biological control of plant-parasitic nematodes. Ann. Rev. Phytopathol 24(4):453-89.

**Jones, MGK; North cote, DH. 1972.** Nematode-Induced Syncytium--A Multinucleate Transfer Cell Journal Cell Science, 10: 789-809.

**Karssen, G; Moens, M. 2006.** Root-knot nematodes. En Plant Nematology (R.N. Perry, M. Moens, eds). Plant Nematology. CABI publishing, Wallingford, U.K., pp. 59-90.

**Khan. 2001.** Evaluation of the combine deffect of *Paecilomyces lilacinus* and *Trichoderma harzianum* agains troot-knotdisease of tomato. *Journal of Biological Sciences* 1(3):139-142.

**Khan, TA; SK, Saxena. 1997.** Integrated management of root-knot nematode *Meloidogyne javanica* infected tomatousing organic materials and *Paecilomyces lilacinus*. *Bioresource Technology* 61:247-250.

**Latch, GC. 1993.** Physiological interactions of endophytic fungi and their hosts. Biotic stress tolerance imparted to grasses by endophytes. *Agriculture, Ecosystems and Environments*, Vol. 44, 143-156.

**Matute. 2013.** Hongos endofíticos como indicadores de promoción de crecimiento en cultivos agrícolas. Tesis Lic. Ing. Agr. Catacamas Olancho Honduras. Universidad Nacional de Agricultura. Pag. 4-7.

**Mejicano, Q. 1987.** Diagnóstico de enfermedades fungosas y su efecto en el rendimiento, en cuatro cultivares de melón *Cucumis melo* L. En siembra de Octubre en el valle de la fragua, Zacapa, Guatemala. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 52p.

**Ochoa, María. 2002.** Antibiosis y micoparasitismo de cepas nativas de *Trichoderma spp.*, sobre *Mycosphaerella fijiensis* Tesis. MSc en ciencias: Area de biotecnologia. Mexico, Universidad de Colima. 102 p.

**Osiewacz, HD. (ed.). 2002.** Molecular biology of fungal development. Marcel Dekker, New York.

**Pate, JS; Gunning, BES; 1972.** Transfer Cells. *Annual Review of Plant Physiology*, 23: 173-196.

**Peel, L. 2005.** “Jardinería Práctica, Hortalizas, Frutas y Plantas Comestibles”, Editorial Blume, Barcelona – España, 176 pp.

**Pocasangre, LE; Menjivar, RD; Zum Felde, A; Riveros, AS, Rosales, FE; Sikora, RA. 2006.** Hongos endofíticos como agentes biológicos de control de fitonemátodos en banano. En: Memorias XVII. Reunión Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil. Vol. 1. Bananicultura: un negocio sostenible. Soprano, E; Tcacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds) Editorial, Epagri, Estación experimental de Itajaí, SC, Brasil. p. 249-254.

**Pocasangre, LE. 2003.** Nuevas estrategias para el manejo de nematodos en musáceas. En: Taller convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas. (eds) Musalac/Inibap/Fontagro. Guayaquil, Ecuador. 38p.

**Quintero, JJ. 1981** “Cultivo de Melón y Sandía”, Editorial Neografis, Madrid – España, 4 pp.

**Ramírez, A; Ramírez, C. 1980.** Esterilidad masculina causada por la exposición laboral al nematicida 1,2-dibromo-3-cloropropano. Act. Méd. Cost. 23 (3):219-222.

**RD. Menjivar; MH. Hagemann; J. Kranz; JA. Cabrera; AA. Dababat; R.A. Sikora. 2011.** Control Biológico de *Meloidogyne incognita* en cultivos cucurbitáceas por la no-patógeno cepa de hongos endofitos, *Fusarium oxysporum* (en ingles). Revista Internacional de la lucha contra las plagas. 57:3, 249-253.

**Riveros, AS. 2001.** Moléculas activadoras de la inducción de resistencia, incorporadas en programas de agricultura sostenible. Rev. Manejo Integrado de Plagas, No. 61, 4-11.

**Riveros, AS. 2002.** Bases bioquímicas de la resistencia en plantas. En: Memoria Taller Internacional Inducción de Resistencia y uso de tecnologías limpias para el manejo de plagas en plantas. Riveros, AS; Pocasangre, LE; Rosales, F. (eds.). CATIE, Turrialba. CR. 13-23 p.

**Sánchez, V. 2001.** Evaluación de cinco insecticidas biológicos para el control de larvas de *Spodoptera* spp., en el cultivo del melón *Cucumis melo* L. Tesis Ing. Agr. Guatemala, USAC. 44 p.

**Sánchez, Déborah. 2006.** Diagnóstico de la situación actual y perspectivas futuras de la industria de melón (*Cucumis melo* L.) en Honduras. Tesis. Ingeniero en Administración de Agronegocios en el Grado Académico de Licenciatura. Zamorano, Honduras. 81 p.

**Sharma, SB; Smith, DH; McDonald, D. 1992.** Nematode constraints of chickpea and pigeonpea production in the semiarid tropics. *Plant Disease*, 76: 868-874.

**Sharon, E; Bar-Eyal, M; Chet, I; Herra-Estrella, A; Kleifield, O; Spiegel, Y. 2001.** Biological control of the root-knot nematode *Meloidogyne javanica* by *Trichoderma harzianum*. *Phytopathology*, Vol. 91, 687- 693.

**Sikora, RA; Pocasangre, LE. 2006.** The concept of a suppressive banana plant: root health management with a biological approach. En: Memorias XVII Reunión Internacional Acorbat. Joinville, SC, Brasil. Bananicultura: un negocio sostenible. Soprano, E; Tcacenco, FA; Lichtemberg, LA; Silva, MC. (eds.) Editorial, Epagri, Estación experimental de Itajaí, SC, Brasil. p.241-248.

**Stirling, GR. 1991.** Biological Control of plant parasitic nematodes progress, problems and prospect. C.A.B. International, Wallingford UK. 1-282 pp.

**Terranova Enciclopedia Agropecuaria 2001.** “Producción Agrícola 1”, Panamericana Formas e Impresos S.A., Bogotá – Colombia, 520 pp.

**Thrupp, L. 1991.** Sterilization of workers from pesticide exposure: the causes and consequences of DBCP- induce damage in Costa Rica and beyond. *Int J Health Services*; 4: 731-57.

**Vanholme, B. 2004.** Secretions of plant-parasitic nematodes: a molecular update. *Gene*, 332: 13-27.

**Vovlas, N; Rapoport, HF; Jiménez Díaz, RM; Castillo, P. 2005.** Differences in feeding sites induced by root-knot nematodes, *Meloidogyne* spp., in chickpea. *Phytopathology*, 95: 368-375.

# **VIII ANEXOS**

## Anexo 1. Análisis de varianza de la variable penetración de nemátodos.

| Variable                     | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|------------------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| LN Penetración de nemátodo.. | 20 | 0.77           | 0.56              | 13.87 |

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V.         | SC    | gl | CM   | F    | p-valor |
|--------------|-------|----|------|------|---------|
| Modelo.      | 10.89 | 9  | 1.21 | 3.74 | 0.0259  |
| Tratamientos | 10.89 | 9  | 1.21 | 3.74 | 0.0259  |
| Error        | 3.24  | 10 | 0.32 |      |         |
| Total        | 14.13 | 19 |      |      |         |

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=2.25318

Error: 0.3240 gl: 10

| Tratamientos | Medias | n | E.E.     |
|--------------|--------|---|----------|
| Berenjena 2  | 3.15   | 2 | 0.40 A   |
| Tomate 2     | 3.36   | 2 | 0.40 A   |
| Hogge 4      | 3.44   | 2 | 0.40 A   |
| Hogge 5      | 3.88   | 2 | 0.40 A B |
| Vernon 2     | 3.93   | 2 | 0.40 A B |
| Tabaco R     | 4.08   | 2 | 0.40 A B |
| Hogge 3      | 4.13   | 2 | 0.40 A B |
| Químico      | 4.51   | 2 | 0.40 A B |
| Hogge 1      | 4.72   | 2 | 0.40 A B |
| Testigo      | 5.81   | 2 | 0.40 B   |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p \leq 0.05$ )

## Anexo 2. Prueba de de Kruskal Wallis para la variable de índice de agallas.

### Prueba de Kruskal Wallis

| Variable          | Tratamientos | N | Medias | D.E. | Medianas | gl | H    | p      |
|-------------------|--------------|---|--------|------|----------|----|------|--------|
| Indice de agallas | Berenjena 2  | 2 | 4.00   | 0.71 | 4.00     | 9  | 6.69 | 0.6175 |
| Indice de agallas | Hogge 1      | 2 | 1.50   | 2.12 | 1.50     |    |      |        |
| Indice de agallas | Hogge 3      | 2 | 0.25   | 0.35 | 0.25     |    |      |        |
| Indice de agallas | Hogge 4      | 2 | 0.25   | 0.35 | 0.25     |    |      |        |
| Indice de agallas | Hogge 5      | 2 | 1.00   | 1.41 | 1.00     |    |      |        |
| Indice de agallas | Químico      | 2 | 1.00   | 1.41 | 1.00     |    |      |        |
| Indice de agallas | Tabaco R     | 2 | 0.75   | 0.35 | 0.75     |    |      |        |
| Indice de agallas | Testigo      | 2 | 0.50   | 0.00 | 0.50     |    |      |        |
| Indice de agallas | Tomate 2     | 2 | 0.25   | 0.35 | 0.25     |    |      |        |
| Indice de agallas | Vernon 2     | 2 | 1.50   | 2.12 | 1.50     |    |      |        |

**Anexo 3.** Análisis de varianza para la variable de volumen de raíz.

| Variable             | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> | Aj    | CV |
|----------------------|----|----------------|----------------|-------|----|
| Volumen de raíz (ml) | 20 | 0.30           | 0.00           | 35.15 |    |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.         | SC   | gl | CM   | F    | p-valor |
|--------------|------|----|------|------|---------|
| Modelo.      | 0.84 | 9  | 0.09 | 0.47 | 0.8615  |
| Tratamientos | 0.84 | 9  | 0.09 | 0.47 | 0.8615  |
| Error        | 1.97 | 10 | 0.20 |      |         |
| Total        | 2.81 | 19 |      |      |         |

**Anexo 4.** Análisis de varianza para la variable de peso de raíz.

| Variable               | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> | Aj    | CV |
|------------------------|----|----------------|----------------|-------|----|
| LOG10 Peso de raíz (g) | 20 | 0.70           | 0.42           | 15.76 |    |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.         | SC   | gl | CM   | F    | p-valor |
|--------------|------|----|------|------|---------|
| Modelo.      | 0.62 | 9  | 0.07 | 2.55 | 0.0806  |
| Tratamientos | 0.62 | 9  | 0.07 | 2.55 | 0.0806  |
| Error        | 0.27 | 10 | 0.03 |      |         |
| Total        | 0.89 | 19 |      |      |         |

Test:Tukey Alfa=0.05 DMS=0.65065

Error: 0.0270 gl: 10

Tratamientos Medias n E.E.

|             |      |   |      |   |   |
|-------------|------|---|------|---|---|
| Testigo     | 0.78 | 2 | 0.12 | A |   |
| Hogge 5     | 0.90 | 2 | 0.12 | A | B |
| Hogge 4     | 0.95 | 2 | 0.12 | A | B |
| Tomate 2    | 0.96 | 2 | 0.12 | A | B |
| Hogge 1     | 1.03 | 2 | 0.12 | A | B |
| Hogge 3     | 1.04 | 2 | 0.12 | A | B |
| Químico     | 1.05 | 2 | 0.12 | A | B |
| Tabaco R    | 1.10 | 2 | 0.12 | A | B |
| Vernon 2    | 1.14 | 2 | 0.12 | A | B |
| Berenjena 2 | 1.48 | 2 | 0.12 |   | B |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p<= 0.05)

**Anexo 5.** Análisis de varianza por muestreo en la variable de diámetro de tallo.

| Muestreo | Variable          | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|----------|-------------------|----|----------------|-------------------|------|
| 1.00     | Diametro de tallo | 20 | 0.57           | 0.18              | 4.11 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.        | SC   | gl | CM   | F    | p-valor |
|-------------|------|----|------|------|---------|
| Modelo.     | 0.13 | 9  | 0.01 | 1.47 | 0.2794  |
| Tratamiento | 0.13 | 9  | 0.01 | 1.47 | 0.2794  |
| Error       | 0.10 | 10 | 0.01 |      |         |
| Total       | 0.24 | 19 |      |      |         |

| Muestreo | Variable          | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|----------|-------------------|----|----------------|-------------------|------|
| 2.00     | Diametro de tallo | 20 | 0.26           | 0.00              | 5.66 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.        | SC   | gl | CM   | F    | p-valor |
|-------------|------|----|------|------|---------|
| Modelo.     | 0.15 | 9  | 0.02 | 0.38 | 0.9170  |
| Tratamiento | 0.15 | 9  | 0.02 | 0.38 | 0.9170  |
| Error       | 0.43 | 10 | 0.04 |      |         |
| Total       | 0.57 | 19 |      |      |         |

| Muestreo | Variable          | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|----------|-------------------|----|----------------|-------------------|------|
| 3.00     | Diametro de tallo | 20 | 0.48           | 0.02              | 5.37 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.        | SC   | gl | CM   | F    | p-valor |
|-------------|------|----|------|------|---------|
| Modelo.     | 0.79 | 9  | 0.09 | 1.03 | 0.4763  |
| Tratamiento | 0.79 | 9  | 0.09 | 1.03 | 0.4763  |
| Error       | 0.86 | 10 | 0.09 |      |         |
| Total       | 1.65 | 19 |      |      |         |

| Muestreo | Variable          | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|----------|-------------------|----|----------------|-------------------|------|
| 4.00     | Diametro de tallo | 20 | 0.28           | 0.00              | 5.47 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.        | SC   | gl | CM   | F    | p-valor |
|-------------|------|----|------|------|---------|
| Modelo.     | 1.23 | 9  | 0.14 | 0.44 | 0.8823  |
| Tratamiento | 1.23 | 9  | 0.14 | 0.44 | 0.8823  |
| Error       | 3.08 | 10 | 0.31 |      |         |
| Total       | 4.31 | 19 |      |      |         |

**Anexo 6.** Análisis de varianza para la variable de días a floración.

| Variable         | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|------------------|----|----------------|-------------------|------|
| Días a floración | 20 | 0.49           | 0.03              | 8.34 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.         | SC    | gl | CM   | F    | p-valor |
|--------------|-------|----|------|------|---------|
| Modelo.      | 27.25 | 9  | 3.03 | 1.06 | 0.4593  |
| Tratamientos | 27.25 | 9  | 3.03 | 1.06 | 0.4593  |
| Error        | 28.50 | 10 | 2.85 |      |         |
| Total        | 55.75 | 19 |      |      |         |

**Anexo 7.** Análisis de varianza para la variable de días a fructificación.

| Variable              | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV   |
|-----------------------|----|----------------|-------------------|------|
| Días a fructificación | 20 | 0.45           | 0.00              | 4.28 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.         | SC    | gl | CM   | F    | p-valor |
|--------------|-------|----|------|------|---------|
| Modelo.      | 12.05 | 9  | 1.34 | 0.92 | 0.5429  |
| Tratamientos | 12.05 | 9  | 1.34 | 0.92 | 0.5429  |
| Error        | 14.50 | 10 | 1.45 |      |         |
| Total        | 26.55 | 19 |      |      |         |

**Anexo 8.** Análisis de varianza para la variable de frutos por metro lineal.

| Variable                | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|-------------------------|----|----------------|-------------------|-------|
| Frutos por metro lineal | 20 | 0.59           | 0.23              | 13.15 |

**Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)**

| F.V.         | SC   | gl | CM   | F    | p-valor |
|--------------|------|----|------|------|---------|
| Modelo.      | 2.04 | 9  | 0.23 | 1.61 | 0.2330  |
| Tratamientos | 2.04 | 9  | 0.23 | 1.61 | 0.2330  |
| Error        | 1.40 | 10 | 0.14 |      |         |
| Total        | 3.44 | 19 |      |      |         |