

Universidad de Costa Rica
Facultad de Ciencias
Escuela de Biología

Tesis presentada para optar al grado de Licenciatura en Biología con énfasis
en Botánica

**Endófitos de Zingiberales nativas como controladores
biológicos contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*
(Mal de Panamá), Costa Rica**

Andrea Paola Orellana Mondol

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio
San José, Costa Rica, 2019

Miembros del Tribunal

Priscila Chaverri Echandi

Ph.D.

Directora de tesis

Javier Zelaya Trejos

Ph.D

Presidente del Tribunal Examinador

Ana Tapia Fernández

M.Sc.

Lectora de tesis

Mario Blanco Coto

Ph.D

Tribunal Examinador

Dr. Gerardo Ávalos Rodríguez

Ph.D.

Lector de tesis

Andrea Paola Orellana Mondol

B.Sc

Postulante.

Agradecimientos:

A mi familia, amigos y mascotas. Pero en especial a mi papá Cesar Orellana Rosal y Verónica Chávez Chávez que siempre me han acompañado y ayudado incondicionalmente, a mi tío Tito o mejor conocido como Miguel Mondol Velásquez por sus consejos, a Angela de Boer Urbina e Isaac Solano Rodríguez por su amor y paciencia, a Cachito, Oso, Canillas y Pato que se dormían en mis pies mientras escribía. Gracias por todos los momentos de motivación que me dieron. Gracias a mi mamá Jalima Mondol Velásquez quien siempre me ha acompañado en cada paso de mi vida.

Muchas gracias a mi tutora Priscila Chaverri Echandi por sus enseñanzas, pude aprender mucho sobre todo sobre gestión y ejecución de proyectos y trabajo interdisciplinario. Le agradezco por toda su paciencia, por permitirme trabajar en sus laboratorios.

A la Estación Biológica La Selva, OET, por su financiamiento y su cálida acogida. Les agradezco muchísimo a su personal, quienes siempre estuvieron anuentes ayudar y facilitar el trabajo, en especial a Danilo Brenes Madrigal y Bernal Matarrita Carranza.

Estoy profundamente agradecida con el CIPRONA y su personal, por abrirme las puertas y permitirme trabajar ahí con tanta libertad y con tantas facilidades, por esas tardes de café. Aprendí mucho en este centro y cada persona que trabaja ahí. Gracias en especial a Rosaura Romero Chacón, Fanny Durán Villalobos, Elida Ruballos Cuellar, Max Chavarría, Guy Lamoureux, Alicia Hernández Peñaranda, Víctor Vásquez, Godofredo Solano Arias, Karol Acuña Araya, Alejandra Agüero Ovares, Juan Carlos Brenes.

Gracias a mis compañeros y compañeras del laboratorio Laura Campos Esquivel, Humberto Castillo, Xaviera Amador, Efraín Escudero Leiva, quienes me alegraban las mañanas, las tardes y las noches; con quienes compartí tantos momentos de alegría y angustia. Me ayudaron mucho con el proyecto. A mis amigos Allison Taylor, Sebastián Aguilar por ayudarme tanto en el laboratorio y llenarme de tanta vitalidad y alegría, por acompañarme a soñar.

Gracias a la Escuela de Biología por la excelente formación que me ha dado, permitirme en un inicio hacer los experimentos en sus laboratorios y sus profesores y profesoras por sus consejos. Agradezco en especial a Viviana Lang dos Santos, Gustavo

Gutiérrez Espeleta y Gerardo Ávalos Rodríguez quienes siempre me apoyaron en la Escuela de Biología.

Muchas gracias a Ana Tapia Fernández de la escuela de Agronomía de la UCR, a sus estudiantes y personal por permitirme trabajar en su laboratorio en Turrialba y enseñarme con *Fusarium*. A Lidieth Uribe Lorío del CIA por prestarme el shaker. Gracias al CIBCM por prestarme sus instalaciones para realizar la identificación de mis muestras, pero en especial quiero agradecer a Federico Albertazzi Castro, a Ronald Arias Vindas, Fernando Esteban Flores Mora y Carolina Muñoz Flores quienes pacientemente me orientaron.

A Eric Calvo, Juan Pablo Chaverri, Steven Zamora con quienes me aventuré por las selvas de Sarapiquí en búsqueda de las plantas. Aún con el calor, la humedad, la tempestad, los mosquitos, el barro, el cansancio, siempre se mantuvieron conmigo en el bosque y en las noches y madrugadas aislando los endófitos.

Les agradezco por la ayuda con medios y consejos a Don Marvin Aguilar Vargas, Erick Guerrero (Micro). A Esteban Jiménez, Christian Trejos Hernández, Mario Blanco Coto por todo su apoyo con la identificación de las plantas. A José David Sigüenza y Efraín Escudero por las fotos. A Jesse Obando, Marvin Barbosa por el montón de horas que me ayudaron con las fotos y todo el cariño durante el proceso. A Ricardo Alvarado por su asesoría en estadística. A Carolina Seas, la familia Salas Jiménez, por hospedarme en Turrialba cuando lo necesitaba.

A todos y todas los que estuvieron caminando conmigo en este proceso, con mucho cariño les doy las gracias, porque sin ustedes la experiencia de construir esta tesis no hubiera sido igual.

Índice General

| | |
|--|----|
| Índice General | 5 |
| Índice de Figuras | 7 |
| Resumen: | 9 |
| Revisión de literatura. | 11 |
| Origen y distribución del banano | 11 |
| Importancia socioeconómica del banano | 12 |
| Generalidades del Mal de Panamá | 12 |
| Descripción, taxonomía y sistemática de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> : | 13 |
| Ecología de <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> | 15 |
| Historia de Mal de Panamá y su distribución..... | 16 |
| Problemática del Mal de Panamá en Costa Rica..... | 17 |
| Control fitosanitario | 17 |
| Métodos químicos..... | 18 |
| Prácticas culturales | 19 |
| Métodos biotecnológicos..... | 19 |
| Control biológico como método de prevención y combate del Mal de Panamá..... | 21 |
| Zingiberales como fuente de endófitos para control biológico contra el Mal de Panamá | 25 |
| Justificación..... | 26 |
| Objetivo general | 27 |
| Objetivos específicos | 27 |
| Hipótesis y predicción..... | 27 |
| Materiales y métodos | 28 |
| Sitio de estudio:..... | 28 |
| Muestreo:..... | 28 |
| Cultivo, aislamiento e identificación de endófitos: | 29 |
| Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> : | 29 |
| Prueba de confrontación: | 29 |
| Prueba de micoparasitismo: | 30 |
| Prueba de antibiosis (Producción de metabolitos inhibitorios solubles): | 31 |
| Prueba de viabilidad de conidios y clamidosporas:..... | 31 |
| Análisis estadístico:..... | 32 |
| Resultados | 32 |
| Cultivo, aislamiento e identificación de endófitos: | 32 |

| | |
|---|----|
| Pruebas de antagonismo <i>in vitro</i> | 32 |
| Prueba de confrontación: | 32 |
| Prueba de micoparasitismo: | 39 |
| Prueba de antibiosis: | 42 |
| Prueba de viabilidad de esporas: | 44 |
| <i>Discusión</i> | 44 |
| Prueba de confrontación:..... | 45 |
| Prueba de micoparasitismo..... | 47 |
| Prueba de antibiosis..... | 48 |
| Prueba de viabilidad de conidios y clamidosporas..... | 49 |
| <i>Conclusiones</i> | 49 |
| <i>Referencias</i> | 50 |
| <i>Anexos</i> | 62 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Fig. 1: Tiempo de crecimiento utilizado por los endófitos para llenar el plato Petri en presencia de FOC | 33 |
| Fig. 2: Porcentaje de inhibición de FOC cuando se confrontó con diferentes endófitos a nivel <i>in vitro</i> | 33 |
| Fig. 3: Tipos de respuestas encontradas al confrontar FOC contra diferentes endófitos que producen antibiosis | 34 |
| Fig. 4: Signos de micoparasitismo | 35 |
| Fig. 5: Respuesta de 28.2 y 10.3A al confrontarlos contra FOC..... | 36 |
| Fig. 6: Respuesta de 23.4 al confrontarlo con FOC | 37 |
| Fig. 7: Hongos que traslaparon con FOC pero no mostraron signos de micoparasitismo | 38 |
| Fig. 8: Respuesta de 7.4 al confrontarlo con FOC. | 39 |
| Fig. 9: Porcentaje de inhibición de FOC durante la presencia de endófitos considerados micoparasíticos | 39 |
| Fig. 10: Efecto de los endófitos micoparasíticos 28.2, 9.4 y 10.3A en el crecimiento de FOC a través del tiempo | 40 |
| Fig. 11: Efecto de los endófitos micoparasíticos 9.2AB y 23.4 en el crecimiento de FOC a través del tiempo | 41 |
| Fig. 12: Porcentaje de inhibición de FOC, al cultivarlo en medios que contienen extractos filtrados de endófitos. | 42 |
| Fig. 13: Respuesta de FOC al cultivarlo en medios que contienen extractos filtrados de endófitos..... | 43 |
| Fig. 14: Porcentaje de inhibición en la germinación de las clamidosporas de FOC cuando se puso a crecer con diferentes extractos de endófitos a nivel <i>in vitro</i> | 44 |
| Fig. A.1: Prueba con endófito 5.4A | 62 |
| Fig. A.2: Prueba con endófito 17.1..... | 62 |
| Fig. A.3. Prueba con endófito 3.5 | 62 |
| Fig. A.4. Prueba con endófito 4.4..... | 63 |
| Fig. A.5. Prueba con endófito 9.3B | 63 |
| Fig. A.6. Prueba con endófito 10.1 | 63 |

| | |
|---|----|
| Fig. A.7. Prueba con endófito 6.1 | 64 |
| Fig. A.8. Prueba con endófito 10.1B | 64 |
| Fig. A.9. Prueba con endófito 7.4 | 64 |
| Fig. A.10. Prueba con endófito 28.2 | 65 |
| Fig. A.11. Prueba con endófito 6.3 | 65 |
| Fig. A.12. Prueba con endófito 6.4 | 65 |
| Fig. A.13. Prueba con endófito 2.3 | 66 |
| Fig. A.14. Prueba con endófito 9.2AN | 66 |
| Fig. A.15. Prueba con endófito 9.2AB | 66 |
| Fig. A.16. Prueba con endófito 9.3A | 67 |
| Fig. A.17. Prueba con endófito 21.4 | 67 |
| Fig. A.18. Prueba con endófito 10.3A | 67 |
| Fig. A.19. Prueba con endófito 9.3 | 68 |
| Fig. A.20. Prueba con endófito 10.2A | 68 |
| Fig. A.21. Prueba con endófito 15.5A | 68 |
| Fig. A.22. Prueba con endófito 17.2 | 69 |
| Fig. A.23. Prueba con endófito 18.4 | 69 |
| Fig. A.24. Prueba con endófito 23.4 | 69 |
| Fig. A.25. Prueba con endófito 22.3 | 70 |
| Fig. A.26. Prueba con endófito 19.3 | 70 |
| Fig. A.27. Prueba con endófito 19.4 | 70 |
| Fig. A.28: Prueba con endófito 28.3 | 71 |
| Fig. A.29: Prueba con endófito 9.4 | 71 |

Endófitos de Zingiberales nativas como controladores biológicos contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Mal de Panamá), Costa Rica

Orellana-Mondol, A.

Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, apom90@gmail.com

Resumen:

Antecedentes: El Mal de Panamá (producido por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, FOC) es considerado la enfermedad más importante para la industria de banano (*Musa* spp.) Está demostrado que el control biológico es el método más eficiente para combatir al hongo causante de la presente enfermedad, pues este patógeno presenta una alta adaptabilidad y resistencia a los métodos tradicionales. Se han estudiado los efectos de agentes de control generalistas utilizados para otras plagas u organismos extraídos de plantaciones inmunosuprimidas. Estos dan excelentes resultados a nivel de laboratorio y en invernadero; sin embargo, en condiciones de campo no son prometedores. Los bosques neotropicales presentan una alta diversidad de hongos simbiotes benéficos para la planta como lo son los endófitos y en estos sitios habita una gran variedad de plantas emparentadas con el banano que pertenecen al orden Zingiberales. Por lo tanto, con la presente investigación se pretende evaluar el efecto de endófitos recolectados en Zingiberales nativas de los bosques de Costa Rica sobre el crecimiento del micelio y la viabilidad de las esporas de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*.

Metodología: Para lograrlo, se extrajeron endófitos de las raíces de estas plantas, los cuales se sometieron a pruebas de antagonismo *in vitro* donde se confrontó a FOC con los endófitos recolectados. Además, se hicieron pruebas específicas para analizar el potencial micoparasítico en un plato precolonizado por el patógeno y el potencial de los metabolitos solubles en agua en el crecimiento micelial y la germinación de las estructuras reproductivas de FOC. En esta última prueba se evaluó el efecto de éstos en el crecimiento micelial y la germinación de las esporas del Mal de Panamá

Resultados: En la prueba de confrontación, los endófitos redujeron en general el crecimiento de FOC entre un 14% a un 77% en promedio debido a competencia, micoparasitismo y antibiosis. Se encontró que un 32.3% de los hongos eran competidores, 12.9%

micoparasíticos y 51.6% que inhibían FOC por antibiosis, y el hongo 9.4 inhibió el crecimiento de FOC entre un 61 a 95%. Al evaluar estos hongos micoparasíticos, el hongo 10.3A inhibió a FOC en 5% de los casos. Los hongos 10.3A, 28.3 y 9.4 crecieron junto con FOC. En cuanto a los hongos que mostraron ser potenciales hongos antibióticos, se observó que el hongo 9.3B fue el que inhibió más a FOC (45.7%), seguido por 3.5 (39.3%) y 22.3 (37.9%). En la prueba de viabilidad de esporas solo 9.3B disminuyó ($9,5\pm 8\%$) el crecimiento de las estructuras reproductivas.

Discusión. Los endófitos mostraron poseer un efecto en el crecimiento de FOC. Se encontraron hongos antagonistas que disminuían el crecimiento de este por medio de la competencia, el micoparasitismo y la antibiosis. En el caso de los hongos competidores llenaron rápidamente los platos Petri para ser los primeros en acceder a la mayor cantidad de nutrientes posibles, no obstante, no disminuyeron la tasa de crecimiento con respecto al control. En el caso de los micoparasíticos presentaron dos estrategias: la estrategia rápida en la cual los hongos micoparasíticos intoxicaban a FOC y rápidamente crecían encima; y la estrategia lenta que estaba ligada a la antibiosis. Y finalmente los hongos antibióticos produjeron metabolitos solubles en agua que se difundían en el medio e inhibían el crecimiento de FOC.

Conclusión. Se encontraron cinco hongos con potencial micoparasítico, de estos 10.3A se debería probar *in planta* para observar si impide la entrada de FOC. Se obtuvieron 23 hongos con potencial antibiótico mayor a 40%, de estos tres mostraron producir metabolitos hidrosolubles que inhiben a FOC moderadamente y uno de ellos afecta levemente la germinación de esporas. 9.3B fue el hongo que presentó una mayor inhibición. Se recomienda realizar pruebas *in planta* e *in vivo* para corroborar la eficacia de 9.3B en inhibir la germinación de FOC. Además es importante probar si estos hongos pueden cohabitar con el banano de manera sistémica. También se resalta la importancia de los bosques como fuentes de nuevos endófitos que se pueden utilizar como controladores biológicos de importantes patógenos de cultivos.

Palabras claves: Antibiosis, CIPRONA, endófitos, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, La Selva OET, marchitamiento del banano, micoparasitismo, *Musa*, UCR.

Revisión de literatura.

Origen y distribución del banano

El banano es una monocotiledónea perteneciente a diferentes especies del género *Musa* spp. L. (Musaceae, Zingiberales). Tiene sus orígenes en la región de Indochina y en el sudeste asiático hace 110 millones de años (Kress & Specht, 2006). Esta zona es considerada el centro de mayor diversidad del género, además es el sitio donde se diversificó otros géneros de la familia Musaceae y del orden Zingiberales como Lowiaceae y posiblemente Strelitziaceae (Price, 1995; Kress & Specht, 2006; Ploetz, 2015).

El banano es un fruto que posee una gran importancia para el ser humano. Ha sido cultivado desde hace 6950 años en Nueva Guinea África, siendo uno de los cultivos más antiguos domesticados por la humanidad (Price, 1995; Perrier, 2009; Caballero-Hernández, 2010; Ploetz, 2015). También se han encontrado registros de cultivos muy antiguos en Cameroon, Pakistan y Yunnan, lo que demuestra la capacidad del ser humano de propagar esta planta desde tiempos ancestrales (Perrier, 2009).

En su gran mayoría, las plantas producidas para el comercio son el resultado de la hibridación interespecífica entre *M. acuminata* (AA) y *M. balbisiana* (BB) o a partir de individuos poliploides entre la misma *M. acuminata* (O' Donnell *et al.*, 1998; Caballero-Hernández, 2010). Generalmente, son cultivos estériles en los cuales se induce la producción de los frutos por partenocarpia y se propagan vegetativamente (Ploetz, 2015). Debido a sus características (sabor dulce, su textura suave y carnosa, entre otras), el banano es una de las plantas de mayor importancia comercial y es uno de los cultivos que más se producen en América Latina (Caballero-Hernández, 2010).

La llegada del banano al continente americano es controversial. Existen autores que afirman que el banano fue llevado por primera vez a América en 1516 a República Dominicana desde las Islas Canarias por el padre Tomás de Bergala (Marin, Sutton & Barker, 1998). Sin embargo, otros autores defienden que fueron los portugueses quienes distribuyeron clones de banano de las Islas de Cabo Verde por el continente (Marin, Sutton & Barker, 1998). Estas plantas fueron llevadas inicialmente a México en 1531 y traída a Costa Rica en 1541 por Diego Guadiérrez (Marin, Sutton & Barker, 1998).

Importancia socioeconómica del banano

El banano es un producto que tiene un valor fundamental para la economía de muchos países en vías de desarrollo en las regiones tropicales de todo el mundo. Es considerado el cuarto producto alimentario más significativo del planeta después del arroz, el trigo y el maíz en términos de valor bruto de producción y el doceavo “commodity” más exportado en el mundo (Arias *et al.*, 2004; Perrier *et al.*, 2011; Li *et al.*, 2015; FAO, 2016). La industria del banano emplea a unos 400 millones de personas alrededor del mundo y genera aproximadamente \$36 billones anuales. Su manufactura está asentada principalmente en el Neotrópico, siendo Costa Rica uno de los mayores exportadores de banano a nivel mundial (FAO, 2014). Según Barquero (2015), Costa Rica en el 2014 exportó 2564 cajas de banano por hectárea. Por lo que se superó la producción de Ecuador, el primer exportador mundial de banano, quien produjo 1700 cajas por hectárea en ese año.

El banano, el cual se cultiva comercialmente en Costa Rica desde 1872, es el segundo producto más exportado del sector agrícola, después del café (Hernandez & Witter, 1996; Soto-Morales, 2014). Según datos del 2015 de la Promotora del Comercio Exterior, esta actividad generó en el 2014, exportaciones por \$905 millones, siendo la Unión Europea y Estados Unidos los mayores compradores de este producto (Barquero, 2015).

Además, el banano es una fuente de ingresos para muchas familias. La compañía CORBANA concentra la mayor parte del banano para la exportación. Esta empresa contrata de manera directa e indirecta alrededor de 140 mil personas (Soto-Morales, 2014), lo que representa cerca del 6% del total de las personas en condiciones de trabajar de Costa Rica. Además, es fuente, del 73.6% del empleo en la región Huetar Caribe, zona donde se encuentran la mayor parte de las plantaciones de banano del país (Ramírez Céspedes, Tapia Fernández, & Brenes Gamboa, 2010; CORBANA, 2016). No obstante, este cultivo se encuentra gravemente afectado por el Mal de Panamá.

Generalidades del Mal de Panamá

El Mal de Panamá, o Fusariosis del banano, es una enfermedad producida por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (E.F. Sm.) W.C. Snyder & H.N. Hansen. Esta enfermedad es considerada una de las más destructivas que ataca al banano (Ho *et al.*, 2015; Martínez Bolaños, 2015). El sitio de origen de este hongo es aún controversial, ya que los primeros registros de daños por la enfermedad fueron reportados en Australia en 1874 y poco

tiempo después en Panamá 1890 (Bancroft, 1876 en Shivas *et al.*, 1995; Caballero-Hernández, 2010). Sin embargo, algunos autores lo ubican en el sureste asiático junto con el banano (Gowen, 1995, Pérez Salas *et al.*, 2013, Ploetz, 2015), y otros específicamente en Indonesia (Maryani *et al.*, 2018).

Descripción, taxonomía y sistemática de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* (FOC) pertenece al Phylum Ascomycota, Clase Sordariomycetes, Orden Hypocreales y a la Familia Nectriaceae (Martínez Bolaños, 2015). Es un hongo filamentoso, septado, de micelio blanco. Sin embargo, con el tiempo o en presencia de un factor estresante, adquiere una tonalidad salmón, rosado pálido, fucsia o morado oscuro (Pérez-Vicente, Dita & Martínez-de la Parte, 2014.). La colonia puede crecer 4-7 mm por día en medio de agar papa dextrosa (PDA) a 24°C. Los esporodocios son de color canela a anaranjado y los esclerocios son azules (Ploetz, 2006).

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* es un hongo anamórfico y sólo se le conoce su estado asexual. Posee tres tipos diferentes de estructuras reproductivas: los microconidios, los macroconidios y las clamidosporas. Los microconidios miden 5-16 x 2.4-3.5 µm están conformados por 1 o 2 células y poseen forma ovalada mientras los macroconidios miden 27-55 x 3.3-5.5 µm poseen forma alargada, curvada con pared delgada, y pueden llegar a tener entre 4 a 8 células. Ambas estructuras se producen sobre monofiálides cortas ramificadas o no ramificadas (Caballero-Hernández, 2010). Por otro lado, las clamidosporas miden 7-11 µm de diámetro poseen doble membrana y por lo general son globosas. Estas se pueden formar individualmente o en pares de hifas o conidias (Ploetz, 2006).

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* (FOC) pertenece al complejo de especies de *F. oxysporum*. La sistemática de este complejo ha sido difícil de resolver debido a la similitud morfológica entre las especies crípticas que conforman la agrupación (Pérez-Vicente, Dita & Martínez-de la Parte, 2014). No obstante, los análisis moleculares han permitido ir resolviendo poco a poco la sistemática (Leslie, Summerell & Bullock, 2006; Swarupa, Ravishankar & Rekha, 2014).

Este complejo está conformado tanto por especies no patogénicas como patogénicas. No obstante, las más reconocidas son las fitopatógenas por su capacidad de infectar un amplio grupo de plantas alrededor del mundo. El complejo *F. oxysporum* está conformado por diferentes líneas fitopatógenas específicas a su hospedero, por lo que se ha acordado

agruparlas en *formae specialis* (f.sp.) (Caballero-Hernández, 2010; Leslie, Summerell & Bullock, 2006). En la actualidad, se han descrito alrededor de 100 *formae specialis* para este grupo que a su vez se dividen o en razas (Marburger *et al.*, 2015).

En el caso de la *formae specialis cubense*, tradicionalmente, se ha clasificado en 4 razas, las cuales se dividen de acuerdo a la virulencia en diferentes variedades de banano. La raza 1 ataca a Gros Michel (AAA), Apple, Silk, Taiwán, Latundan (AAB) y IC2 (AAA); la raza 2 ataca a las variedades Bluggoe (AAB), Chato, Pelpita, Saba y Pome (ABB) y al híbrido tetraploide (AAAA) (Bentley, Pegg & Dale, 1995; Caballero-Hernández, 2011). La raza 3, anteriormente se consideraba dentro de la *formae specialis cubense*, debido a los antiguos reportes que producía síntomas leves en banano (Bentley, Pegg & Dale, 1995). Sin embargo, ahora se clasifica en la *formae specialis heliconiae*, ya que actualmente se sabe que ataca únicamente a *Heliconia* sp., y se ha observado diferencias en el tiempo de germinación de clamidosporas con respecto a las razas que atacan al banano (Fourie *et al.*, 2009; Swarupa, Ravishankar & Rakha, 2014).

Finalmente, la raza 4 ataca las variedades Cavendish (AAA) así como a todas las variedades de banano mencionadas anteriormente (Bentley, Pegg & Dale, 1995; Caballero-Hernández, 2011). Esta raza se divide usualmente en dos grupos: La raza subtropical (STR4), la cual afecta a Cavendish únicamente en esta zona, y la raza tropical (TR4). No obstante, a pesar de que la clasificación en razas ha sido la más utilizada, no posee una base genética que la respalde (Portal *et al.*, 2018)

Investigaciones recientes han demostrado que las clasificaciones en *formae specialis* y razas de FOC son polifiléticas (Czislowski *et al.*, 2018). Esto podría asociarse a la evolución independiente de patogenicidad en el banano en múltiples linajes de *F. oxysporum* (O'Donnell *et al.*, 1998). Estudios de los genes SIX han determinado que muchos grupos de compatibilidad vegetativa (GCV's) poseen genes que determinan ancestro común y las variaciones podrían estar asociadas a transferencia horizontal de genes de patogenicidad (Czislowski *et al.*, 2018).

Por lo que actualmente se está utilizando la clasificación de GCV's para resolver la sistemática de FOC (Czislowski *et al.*, 2018). La última clasificación mencionada es considerada monofilética, ya que se refiere a la habilidad de dos aislamientos diferentes, pero con cierta similitud genética, de anastomosarse y fusionarse para formar un heterocarion

estable (Czislowski *et al.*, 2018; Groenewald, 2005). Actualmente se clasifica a FOC en 24 GCV's (Czislowski *et al.*, 2018).

Ecología de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*

El hongo posee una naturaleza policíclica y perenne, ya que puede mantenerse hasta 40 años latente en el suelo. Esto es debido a que puede permanecer de manera saprófita y la resistencia de sus clamidosporas (Ploetz, 2015). Además, varias malezas y plantas pueden actuar como hospederos de este patógeno aumentando su resiliencia (Thangavelu, Palaniswami & Velazhahan, 2004; Ploetz, 2015).

Las clamidosporas y microconidios que se encuentran en el suelo se adhieren a la epidermis de la raíz, son estimulados por los exudados de las raíces y el contacto con tejidos sanos. Posteriormente el hongo invade a la planta entrando principalmente por las raíces terciarias (Caballero-Hernández, 2010; Li *et al.*, 2017). Los microconidios penetran el espacio parenquimático de la corteza 27 horas después de la germinación y a las 51 horas las hifas de FOC y sus esporas ya se encuentran dentro de la endodermis del sistema vascular (Li *et al.*, 2017).

Posteriormente, los conidios se desplazan a lo largo del pseudotallo por medio de los haces vasculares (Martínez Bolaños, 2015). En consecuencia, el banano encoge los haces debido al crecimiento de las células compañeras y produce varias sustancias de defensa tales como melatonina, geles y tilosas (Pérez-Vicente, Dita & Martínez-de la Parte, 2014; Wei *et al.*, 2017). Estas sustancias son consideradas como uno de los mecanismos más importantes en la prevención de la infección en el banano. Sin embargo, la producción de las estructuras de resistencia bloquea el transporte de agua y nutrientes al tallo y a las hojas. La reacción del banano, sumado a la producción de toxinas por parte de FOC genera el amarillamiento de las hojas y la marchitez de toda la planta (Pérez-Vicente, Dita & Martínez- de la Parte, 2014; Swarupa, Ravishankar & Rakha, 2014). Una vez que la planta está muerta, FOC vuelve al suelo en forma de clamidosporas e inicia nuevamente el ciclo de infección.

La gran adaptabilidad que posee *F. oxysporum* f. sp. *cubense* dificulta la permanencia de la plantación una vez invadida por la enfermedad. Además, una vez establecido el hongo la diseminación es rápida, pudiendo transmitirse a corta distancia vía rizomas, de la planta madre a la plántula (Hwang & Ko, 2004). También, puede dispersarse a través de largas

distancias por la lluvia o el agua de riego, así como por insectos vectores como *Cosmopolites sordidus* (Dryophthoridae) o por desplazamiento de material infectado y malas prácticas culturales al no desinfectar implementos y maquinaria agrícola (Hwang & Ko, 2004; Meldrum *et al.*, 2013).

Estos mecanismos de dispersión le han permitido a *Fusarium* expandirse por varias regiones del mundo. El ser humano ha sido un importante vector de la enfermedad, ya que ha distribuido rizomas y material infectado alrededor del mundo (Pérez-Vicente, Dita & Martínez-de la Parte, 2014). En la actualidad, es común encontrar a *F. oxysporum* f. sp. *cubense* en las regiones dedicadas a la producción bananeras que se encuentran tanto en el trópico como en el subtrópico (Martínez Bolaños, 2015).

Historia de Mal de Panamá y su distribución

A principios del siglo XX, la raza 1 devastó la industria bananera en los trópicos (Bentley, Pegg & Dale, 1995). Por ejemplo, Costa Rica pasó de producir más de 11 millones de racimos de banano para la exportación en 1923, a tan solo 1.4 millones en 1941 debido a la enfermedad (AEACA-Agraocalidad, 2013; Guerrero-Portilla, 2014). Además, en el país, se cerraron alrededor de 80000 Ha de plantaciones dejando a miles de personas sin empleo (Caballero-Hernández, 2011).

A partir de estas consecuencias tan serias para la industria del banano, se enfatizó la búsqueda de variedades resistentes a *Fusarium*. Una de las variedades investigadas fue la Cavendish, la cual mostró una gran resistencia al patógeno de la raza 1. Debido a ello, Cavendish es la variedad más cultivada (40% de la producción bananera proviene de esta variedad) y de mayor distribución en el Trópico Americano (Ploetz, 2015).

No obstante, en los 90s se evidenció que *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4, inicialmente restringido en el sur de África, Las Filipinas y Taiwán (Bentley, Pegg & Dale, 1995), se había adaptado a la variedad Cavendish, arrasando con grandes plantaciones de banano de exportación. Para el 2006, ya se había extendido a China (Fujian, Guangdong, Guanxi, Hainan y Yunnan), el sudeste asiático y Australia, afectando seriamente la producción de la variedad Cavendish. Actualmente, se ha esparcido a Jordania, Mozambique, Pakistan, Libano, Laos, Vietnam y Myanmar (Ho *et al.*, 2015; Ploetz, 2015; Zheng *et al.*, 2018). Se teme que *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 llegue a América en los próximos años, que es donde se encuentran las mayores plantaciones de Cavendish de exportación

(AEACA-Agraocalidad, 2013; Butler, 2013; Guerrero-Portilla, 2014; Martínez Bolaños, 2015; Ploetz, 2015).

El aumento exponencial en la distribución de la raza 4 y la posibilidad de que ingrese al continente americano está generando un gran temor, debido a que esta nueva raza ha ocasionado pérdidas cuantiosas en los países en donde se ha desarrollado. Por ejemplo, en Sumatra se reportaron pérdidas de unos \$134 millones anuales en el 2013 (Jurriaans, 2014). Por lo tanto, es de suma importancia identificar métodos de diagnósticos precisos y técnicas que permitan combatir la enfermedad oportunamente para prevenir los daños ocasionados en otras regiones del mundo. Además de la invasión inminente de la raza 4, la raza 1 aún sigue siendo un mal importante en las plantaciones de banano criollo (Gros Michel) en el continente americano (Poveda-Vega *et al.*, 2013).

Problemática del Mal de Panamá en Costa Rica

En Costa Rica, se estima que existen alrededor de 4358 Ha de banano criollo, las cuales, en su mayoría se encuentran en la región Caribe (Ramírez Céspedes, Tapia Fernández & Brenes Gamboa, 2010). El banano criollo es susceptible a infectarse con el Mal de Panamá raza 1. Por ejemplo, el 90% de las plantaciones cafetaleras asociadas con banano Gros Michel en la región de Turrialba se encuentran infectadas con esta enfermedad, y el 40% de los cacaotales en Talamanca asociados con banano, también están contaminados con el patógeno (Caballero-Hernández, 2011).

Estas plantaciones emplean a aproximadamente 1900 pequeños productores que venden el banano en el mercado nacional y regional (Caballero-Hernández, 2011; Guerrero-Portilla, 2014). Debido a la dificultad de encontrar una forma eficaz de disminuir el impacto de *F. oxysporum f. sp. cubense*, la industria bananera ha entrado en alerta (Nel *et al.*, 2006; Guerrero-Portilla, 2014). Por ello se ha invertido en la búsqueda de nuevos tratamientos para el control de la enfermedad (Pérez Salas *et al.*, 2013; FAO, 2014).

Control fitosanitario

La inversión en prevención y en manejo de enfermedades tales como el Mal de Panamá son de vital importancia para esta industria. Existe una gama limitada de opciones

para prevenir y disminuir los gastos invertidos en el manejo del Mal de Panamá. Los principales métodos son de tipo en métodos químicos, culturales, biotecnológicos y biológicos (Ploetz, 2015).

Métodos químicos

Sintéticos: Tradicionalmente, los productos químicos han sido ampliamente utilizados para el tratamiento y prevención de enfermedades fúngicas. Para manejar el Mal de Panamá, se han estudiado diferentes tipos de fungicidas para tratar no solo los cultivos (inyecciones de Carbendazim en el rizoma o TCMTC), sino el agua de riego, el equipo de cultivo, los zapatos de los trabajadores al ingresar a las plantaciones y los vehículos (Cao *et al.*, 2005; Nel *et al.*, 2007). Sin embargo, los fungicidas tienden a funcionar por muy poco tiempo porque la enfermedad desarrolla resistencia, además del impacto ambiental tan negativo que ocasionan estos agroquímicos (tales como la contaminación de acuíferos y el aumento de la mortalidad de organismos no blancos que sean benéficos (García, 1997; Nel *et al.*, 2007; Kumar *et al.*, 2008; Poveda-Vega *et al.*, 2013; Smith *et al.*, 2014).

El tratamiento con carbonato de calcio también es ampliamente empleado para prevenir o tratar suelos con *F. oxysporum* f. sp. *cubense* pues vuelve el sitio poco apto para el desarrollo de hongos al disminuir la acidez del suelo. Al elevar el pH, la cal evita la colonización y disminuye la población de patógenos (Höper, Steinberg & Alabouvette, 1995; Alarcón-Restrepo & Jimenez-Neira, 2012). También es importante el uso de detergentes, los que son utilizados principalmente para prevenir la dispersión del Mal de Panamá. Uno de los detergentes más recomendados es Farmcleanse, cuya formulación está basada en amonio (Nel *et al.*, 2007).

Biopesticidas: Son productos químicos generados a partir de organismos vivos que poseen características antagónicas frente a la presencia de patógenos. Los biopesticidas pueden generarse a partir de metabolitos extraídos del agente antagonista o se puede emplear directamente este organismo. Algunos conocidos por su eficacia frente a *F. oxysporum* f. sp. *cubense* son Serenade Soil, Poliversum y Tricho-plus (Poveda-Vega *et al.*, 2013).

Silicio: Esta sustancia proviene del ácido silícico absorbido por la planta del suelo. Posteriormente se transforma silicio elemental y se deposita en la pared celular de las células aumentando la resistencia del banano a contraer el patógeno. Además, promueve los

mecanismos naturales de defensa de la planta. No obstante, no ha dado buenos resultados en plantaciones muy extensas (Ghag, Shekhawat & Ganapathi, 2015).

Prácticas culturales

Existen métodos alternativos a los productos químicos, por ejemplo, el uso de prácticas culturales preventivas que eviten el desarrollo y propagación del patógeno (Caballero-Hernández, 2011). Por ejemplo, se recomienda sembrar plantas de banano certificadas, que no provengan de sitios donde los cormos estén infectados, así como evitar que el suelo alrededor de la planta tenga un ambiente adecuado para el asentamiento del hongo, e impedir la acumulación de agua, la cual es un medio de dispersión. También es necesario detectar, erradicar y colocar oportunamente en cuarentena a los bananales cercanos a cultivos infectados. Otras prácticas preventivas incluyen el desinfectar las semillas, las herramientas y la maquinaria agrícola de trabajo, así como capacitar a la población para un manejo responsable de las plantaciones y educar para la detección temprana de este mal (AEACA-Agraocalidad, 2013).

Es importante evitar el desplazamiento de material infectado de sitios donde hay sospecha de la presencia del hongo. Muchos agricultores están desplazando sus cultivos a tierras más altas o sitios donde no se encuentra la enfermedad. Sin embargo, este patógeno puede permanecer latente por 20 a 30 años en forma de clamidosporas sin causar ningún síntoma, pudiendo ser dispersado a nuevos lugares (Thangavelu, Palaniswami & Velazhahan, 2004; Caballero-Hernández, 2011).

Otro método cultural para el manejo del Mal de Panamá es la inundación y la rotación de cultivos. Las estructuras reproductivas de este hongo son susceptibles a periodos superiores a 18 meses de inundación. No obstante, el método puede generar altos costos para las compañías bananeras (Caballero-Hernández, 2011) a menos que se rote el cultivo con arroz anegado (Cao *et al.*, 2005).

Métodos biotecnológicos.

Uno de los métodos más comunes para prevenir la entrada del Mal de Panamá en las plantaciones de banano es la producción de variedades resistentes. Estas variedades son diseñadas para producir enzimas y sustancias de defensa frente a la presencia de *F.*

oxysporum f. sp. *cubense* (De Ascensao & Dubery, 2000; Smith *et al.*, 2014). Algunas de estas variedades como la Goldfinger han sido estudiadas ampliamente por su potencial de resistencia, incluso a la raza 4 (Smith *et al.*, 2014).

Experimentos realizados por De Ascensao & Dubery (2000) demostraron que esta variedad produce hasta 6 veces más enzimas de defensa como fenilalanina amonio liasa, que una planta sin infección. Mientras que las plantas susceptibles sólo producen 1.6 veces más esta enzima cuando había infección. Sin embargo, algunos autores consideran que la producción de nuevas variedades de banano ya no es una opción viable debido a la baja variabilidad genética que se crea dentro de las plantaciones lo que las vuelve susceptibles a patógenos a mediano plazo (Jurriaans, 2014; Li *et al.*, 2015, Ploetz *et al.*, 2015).

Otro método es la selección de genotipos tolerantes de banano. Las plantas con genotipos tolerantes a FOC responden más rápido ante la presencia del patógeno, ya que posean un refuerzo en la pared celular con enzimas y otros metabolitos que dificultan la entrada de FOC (Swarupa, Ravishankar & Rekha, 2014). Además, estas plantas producen una alta cantidad de lignina y diferentes tipos de fenoles para reforzar sus raíces como defensa ante FOC (Li *et al.*, 2017).

Estudios anteriores evaluaron diferentes genotipos de banano resistentes a FOC. En estos, se encontró que los bananos silvestres son un reservorio de genes de resistencia importante contra TR4 (Li, *et al.*, 2015; Li, *et al.*, 2017). Algunas plantas como *M. acuminata* subsp. *malaccensis*, *M. basjoo* y *M. itinerans* presentaron síntomas leves o no presentaron síntomas del todo ante la presencia de TR4 en invernadero y en campo. Otras, como *M. acuminata* subsp. *burmannica*, *M. nagensium*, *M. ruihensis*, *M. velutina* y *M. yunnanensis* se infectaron con esta raza a nivel de invernadero, pero resultaron sin FOC en el campo (Li *et al.*, 2015). Li y colaboradores (2017) concluyen que gran parte de esta resistencia se debe a las respuestas bioquímicas de las plantas al enfrentarse a FOC.

Otro método biotecnológico investigado es la producción de bananos transgénicos, los cuales poseen genes de resistencia que les brindan una menor vulnerabilidad ante FOC. Por ejemplo, Mahdavi y colaboradores (2012) estudiaron la resistencia contra FOC TR4 que le confiere al banano los genes de proteína tipo taumatina (*t1p*) del arroz. En presencia del patógeno, estos genes se activan por lo que se observó que disminuye el porcentaje de incidencia de FOC (29.4%) en los bananos transgénicos en comparación con los controles

(89.1%).

Finalmente, el cultivo de tejidos se ha considerado como otra alternativa para evitar la propagación del hongo debido a que garantiza que la planta producida bajo esta técnica haya crecido en un ambiente libre del patógeno (De Ascensao & Dubery, 2000; Caballero-Hernández, 2011). No obstante, esta técnica vuelve más vulnerable a la planta al contagio en caso de reinfección. Por eso, el cultivo de tejidos debe combinarse con prácticas culturales preventivas.

Control biológico como método de prevención y combate del Mal de Panamá

Esté método se ha presentado como una alternativa al uso de agroquímicos para el control de enfermedades. Se basa en el empleo de organismos antagonistas vivos como agentes controladores, sus genes o productos tales como metabolitos extraídos de los agentes. Estos organismos ayudan a regular el tamaño poblacional de otro organismo no deseado (Alvindhia & Natsuaki, 2008; Savazinni *et al.*, 2009; Subashri, Raman & Sakthivel, 2013; De Silva, Brooks, Lumyong & Hyde., 2019).

Existen diferentes fuentes de agentes de control biológico. Estos se diferencian en cuanto al sitio donde se recolectan los enemigos naturales del patógeno que se van a emplear. Los agentes biocontroladores se pueden recolectar en tres lugares: 1) En el sitio de origen de la planta de interés o en el sitio de origen de la enfermedad, 2) en lugares no autóctonos o 3) en sitios donde no se haya podido desarrollar la enfermedad o que esta se controle naturalmente (Eilenberg, Hajek & Lomer, 2001; Fiaboe, Fonseca, De Moraes, Ogot, Knapp, 2006; Eljounaidi, Lee & Bae, 2016).

Uno de los organismos más estudiados en el campo del control biológico como agentes antagonistas son los hongos endófitos. Estos son organismos mutualistas, comensales, o fitopatógenos latentes, que se encuentran dentro de los tejidos internos de las plantas, pero que no generan enfermedades o síntomas visibles (Thangavelu, Palaniswami & Velazhahan, 2004; Kumar *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2012). Entre los beneficios de usar endófitos están la disminución de químicos empleados para el tratamiento de patógenos. Además de que, al ser un organismo vivo, constantemente se adaptan a los cambios del agente perjudicial (Hajek, 2004; Hufbauer & Roderick, 2005).

Los endófitos interactúan con el patógeno de varias formas. Ellos estimulan la resistencia sistémica de la planta, induciendo la producción de metabolitos, o pueden

producir propiamente metabolitos que inhiben el crecimiento de otros hongos (antibiosis). También tienen el potencial de actuar como micoparásitos o competir por recursos o llenar el nicho previo al patógeno (Lecomte, *et al.*, 2016).

En el caso de la resistencia sistémica, muchos endófitos en presencia de patógenos, producen elicitores o inductores de defensa, los cuales son moléculas señalizadoras que tienden a inducir a la planta a activar el Síndrome de Resistencia Inducida (Djonovic *et al.*, 2007). Este es un proceso en el cual la planta produce en todo su organismo sustancias de defensa tales como Jasmonato, Ácido Salicílico y Etileno (Djonovic *et al.*, 2007; Kloepper & Ryu, 2007). También, los endófitos pueden inducir la producción de fitoalexinas, quitinasas, glucanasas y peroxidasas, enzimas importantes en el control de patógenos por parte de la planta (Kloepper & Ryu, 2007).

En otros casos, los endófitos generan la producción de metabolitos secundarios tales como antibióticos, fungicidas y toxinas, que pueden inhibir el crecimiento de patógenos. Por ejemplo, se ha descrito para *Gliocladium* spp. la producción de Viridina y Gliotoxina, o en el caso de *Trichoderma* spp., el cual es el género más utilizado en control biológico por la amplia gama de metabolitos secundarios que producen y que son utilizados (Sivasithamparam & Ghisalberti, 2002). Asimismo, Aneja, Gianfagna & Hebbar (2005), mencionan que *T. harzianum* produce 6-pentyl- α -pyrone y ácido nonanoico. Este último mostró tener una alta eficacia para inhibir el desarrollo de esporas de *Crinipelis perniciosa* y *Moniliophthora roreri*, patógenos del cacao.

También, existen endófitos micoparasíticos que se alimentan de otros hongos. Estos endófitos producen estructuras como haustorios y segregan enzimas que les permiten capturar los nutrientes del hongo al que están parasitando (Lecomte *et al.*, 2016). Y finalmente, se encuentran los hongos competidores. Ellos han demostrado, que su presencia previa a la llegada del patógeno, evitan su entrada o reducen su cantidad, ya que ellos pueden competir con este por recursos saturando el nicho (Adame-Alvarez, Mendiola-Soto & Heil, 2014).

Control biológico con bacterias: Muchas bacterias son utilizadas en control biológico debido a su capacidad de formar elicitores, sideróforos, producir antibiosis, entre otras cualidades. Kloepper & Riu (2007) mencionan que cepas de *Bacillus* spp. se usan para proteger la soya de patógenos como *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* spp. También las

bacterias endófitas como *Paenibacillus* o *Pseudomonas fluorescens* pueden ser utilizadas para suprimir patógenos del tejido vascular como *Verticillium* spp. (Eljounaidi, Lee & Bae, 2016).

En los últimos años, la investigación en prevención y combate del Mal de Panamá se ha concentrado en la búsqueda de agentes biocontroladores. Algunos de los estudios realizados en esta área se han hecho empleando bacterias endófitas. Por ejemplo, Sivamani & Gnanamanickam (1988) examinaron el efecto de *Pseudomonas fluorescens* como controlador de *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. La bacteria mostró un efecto de antibiosis contra las razas 1 y 4 *in vitro*. Asimismo, en pruebas *in planta* se observó que el tratamiento aplicado con la bacteria generó una menor marchitez, menor decoloración interna, y mayor crecimiento radicular y apical. También, se han logrado realizar formulaciones líquidas utilizando esta bacteria para facilitar su aplicación, lo cual ha tenido mucho éxito en reducir la incidencia de la enfermedad hasta en un 60%. Además, la bacteria permanece viva en la rizófora por más de 180 días (Selvaraj *et al.*, 2014). Sin embargo, la alta competitividad que posee la bacteria tiende a afectar a otros microorganismos no blanco que forman parte del reciclaje de nutrientes del suelo (Subashri, Raman & Sakthivel, 2013).

Por otra parte, Ho *et al.*, (2015) estudiaron el efecto de *Burkholderia cenocepacia* 869T2, una bacteria endófito benigna, sobre *F. oxysporum* f. sp. *cubense*. Esta bacteria fue encontrada en las hojas de diferentes plantas, incluyendo *Musa* sp. Concluyeron que la bacteria produce metabolitos como pirrolnitrina y pirroloquinolina quinona, los cuales actuaban como agentes eficientes de control biológico. Las sustancias producidas por la bacteria inhiben el crecimiento del hongo en un 44.4% de los cultivos *in vitro* y en un 32.1% de las plantas de banano infectadas. Aunque no reducen la enfermedad en porcentajes muy altos, estas bacterias tienen efecto preventivo. Después de 6 meses de aplicación, se encontró una incidencia de infección de 3.4% en zonas de alto contagio. Otras bacterias como *Bacillus* sp., y algunos Actinomycetes (principalmente *Streptomyces* spp.), *Rhizobium* sp., *Ochromobacterium* sp. y *Achromobacter* spp. han sido estudiadas para determinar su efecto sobre la supresión del Mal de Panamá (Sivamani & Gnanamanicka, 1988; Cao *et al.*, 2005; Poveda-Vega *et al.*, 2013, Thangavelu & Gupi, 2015).

Utilizando el conocimiento que se posee sobre las bacterias endófitas y rizosféricas con potencial biocontrolador, Thangavelu & Gupi (2015) analizaron el potencial de la acción

conjunta de diversas bacterias antagonistas en el control de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 encontradas en una plantación abandonada de Cavendish. Observaron que las bacterias endófitas *Pseudomonas putida*, *Acromobacter* spp., *Rhizobium* spp. y *Bacillus flexus* al parearlas cada una respectivamente con la bacteria de la rizosfera *Bacillus cereus* y el endófito *Bacillus flexus* con la rizosférica *Pseudomonas putida* se inhibe entre un 98-100% la germinación de los conidios, entre un 68-83% el crecimiento miceliar en los experimentos de confrontación, y en un 100% el crecimiento de las hifas de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* en las pruebas de antibiosis por difusión en agar, gracias a la producción de sideróforos. Además, se mejoró la producción de banano en un 155%.

Control biológico con hongos: Las investigaciones presentadas anteriormente muestran el importante rol que juegan las bacterias en el control biológico de los patógenos de cultivos tanto del Mal de Panamá, como de otras enfermedades. Por otro lado, los hongos endófitos se han utilizado en numerosas ocasiones para el control de enfermedades de plantaciones económicamente importantes (Lecomte *et al.*, 2016). Por ejemplo, para el cacao, Evans y colaboradores (2003) aislaron del cacao silvestre hongos como *Clonostachys byssicola*, *Tubercularia* sp. *Verticillium* sp., *Trichoderma harzianum*, *T. spirale* y *T. cf. virens*, los cuales mostraron parasitar totalmente los cultivos *in vitro* preinoculados con *M. roeri*, un patógeno del cacao.

Bailey y colaboradores (2008), también probaron diferentes cepas de *Trichoderma in vitro*, las cuales mostraron potencial para inhibir totalmente a *M. roeri*, por medio de antibiosis y micoparasitismo. Otros estudios como el de Djonovi y colaboradores (2007) demostraron que *T. virens* puede inducir un sistema de resistencia sistémica en el maíz por medio de elicitores. Estas moléculas señalizadoras de la presencia de patógenos, incrementan los niveles de transcripción de genes de defensa y la producción de fitoalexinas en la planta, lo que induce la rápida respuesta ante la presencia de patógenos.

Aunque comúnmente los microorganismos estudiados para control biológico son hongos más que bacterias, en el caso de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* se ha explorado muy poco el potencial de hongos endófitos como medio de control biológico (Thangavelu, Palaniswami & Velazhahan, 2004; Lecomte *et al.*, 2016).

Se ha investigado el efecto de diversos hongos biocontroladores como *Gliocladium* sp., *Verticillium* sp., *Fusarium oxysporum* no patogénico, *Phythium oligandrum* y diferentes

Trichoderma spp. (Thangavelu, Palaniswami & Velazhahan, 2004; Nel *et al.*, 2006; Caballero-Hernández, 2011; Thangavelu & Mustaffa, 2010; Poveda-Vega *et al.*, 2013). Por ejemplo, Thangavelu y colaboradores (2004) evaluaron la actividad antagonista *in vitro* de *Trichoderma harzianum* contra *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. *T. harzianum* crece en el suelo de las plantaciones, y es más efectivo que el fungicida carbendazim para regular el Mal de Panamá. No obstante, estos experimentos se han efectuado en condiciones muy reguladas y al aplicarlos en campo los resultados varían ampliamente (Poveda-Vega *et al.*, 2013).

Caballero-Hernández (2011) estudió el efecto de *Trichoderma* spp. obtenidas de plantaciones de banano en Costa Rica. Se encontraron 3 cepas que inhiben moderadamente (entre un 36.16% a un 62.5%) el crecimiento de *F. oxysporum* raza 1 *in vitro*. Las pruebas *in planta* mostraron una reducción de 90% en la marchitez y el amarillamiento de la planta producto de la enfermedad. Ubaub & Requina (2016) inocularon micorrizas Vesículo-arbusculares (Glomeromycota) y *T. harzianum* en banano Cavendish en plantas preinfectadas con *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 y obtuvieron que cada hongo controlaba a *F. oxysporum* f. sp. *cubense* en un 86.67% entre los 10 y los 12 días de tratamiento con la micorriza y con *T. harzianum* respectivamente.

Zingiberales como fuente de endófitos para control biológico contra el Mal de Panamá

Las plantas pertenecientes al orden Zingiberales tienen gran potencial como fuente de hongos endófitos (Costa, 2007). No obstante, casi todas las investigaciones con respecto al mal de Panamá se enfocan en los hongos de las plantaciones de *Musa* sp. (e.j. Pereira, Carneiro-Vieira & Azevedo, 1999; Cao, You & Zhou, 2002) y se sabe muy poco sobre los hongos endófitos de otras Zingiberales. Algunos trabajos realizados en plantas ornamentales en las familias Heliconiaceae, Maranthaceae, Zingiberaceae y Musaceae han dirigido su mirada en la búsqueda de hongos patógenos o endófitos facultativos (Lins & Coelho, 2003; Costa, 2007). No obstante, aún no hay estudios en Zingiberales nativos del neotrópico.

El orden Zingiberales es considerado monofilético. Este orden el cual se divide en dos clados: el grupo parafilético del banano incluye a las familias Musaceae, Strelitziaceae, Lowiaceae y Heliconiaceae, y el grupo monofilético del jengibre que abarca a las familias Marantaceae, Cannaceae, Costaceae y Zingiberaceae (Kress *et al.*, 2001; Kress & Specht, 2006). El orden Zingiberales es común, en Costa Rica, se han encontrado 24 especies nativas de la familia Costaceae del género *Costus*, 14 especies nativas Zingiberaceae del género

Renalmia, 41 especies de Marantaceae del género *Calathea* y 38 del género *Heliconia* perteneciente a Heliconiaceae (Hammel *et al.*, 2003a; Hammel *et al.*, 2003b). Estas familias no solo están emparentadas con el banano, sino que algunas funcionan como hospederas de *Fusarium oxysporum* (Bentley, Pegg & Dale, 1995; FAO, 2014). Por lo tanto, se considera que estas familias pueden albergar endófitos que inhiban el crecimiento y que micoparasiten a *F. oxysporum* f. sp. *cubense* afines con *Musa* spp.

Justificación

Como se ha detallado anteriormente, el Mal de Panamá posee grandes repercusiones económicas para la industria bananera. No obstante, no se han encontrado métodos a largo plazo para poder controlarlo. Es fundamental encontrar nuevas técnicas de control que tengan bajas repercusiones ambientales como el control biológico (Siamak & Zheng, 2018).

El uso de microorganismos como agentes de control biológico contra el Mal de Panamá ha sido ampliamente explorado. Mas, estas investigaciones han sido realizadas principalmente con organismos extraídos directamente de plantaciones de banano con baja incidencia del patógeno o con microorganismos generalistas (Sivamani & Gnanamanickam, 1988; Thangavelu, Palaniswami & Velazhahan, 2004; Cao *et al.*, 2005; Caballero-Hernández, 2010; Ho *et al.*, 2015). Sin embargo, aunque han funcionado en algunos casos, estos organismos tienen bajos rendimientos en el campo y al no ser nativos de las zonas a las que han sido introducidas, muchas veces poseen impactos negativos sobre la biota del suelo (Savazzini, Oliveira-Longa & Pertot, 2009; Subashri, Raman & Sakthivel, 2013; Ho *et al.*, 2015).

Los bosques tropicales son considerados fuentes de una gran variedad de endófitos nativos en donde podemos encontrar nuevos agentes controladores (Gazis, Rehner & Chaverri, 2011). No obstante, a pesar de que son muy comunes, el conocimiento que se tiene de ellos en el neotrópico es muy pobre (Arnold & Lutzoni, 2007; Higgins *et al.*, 2007; Caballero-Hernández, 2010). Por lo que utilizar plantas nativas de bosques tropicales costarricenses para la búsqueda de nuevos endófitos biocontroladores para la protección del banano contra *F. oxysporum* f. sp. *cubense* es innovador y constituye un aporte al control de esta enfermedad.

Estudios previos realizados por Gazis & Chaverri (2015) demostraron que los árboles

de caucho (*Hevea brasiliensis*) en hábitats nativos en la selva amazónica, poseen una mayor cantidad de *Trichoderma* spp. endófitas con potencial micoparasítico y antibiótico en comparación con los árboles que crecen en monocultivos. Por su parte, Arnold & Lutzoni, (2007), demostraron que en un solo espacio de 2 mm² de una hoja de una planta tropical es posible encontrar hasta 17 especies de hongos. Estos hongos se encuentran interactuando entre sí y con otros organismos (e.g: competencia, micoparasitismo, antibiosis, sinergia (Chen *et al.*, 2015). Esta diversidad de interacciones interespecíficas puede contribuir a la defensa de las plantas (Arnold *et al.*, 2003). Por lo tanto, estos endófitos pueden ser potenciales controladores biológicos.

Las Zingiberales, entre estas *Musa* spp., son plantas cuyo origen se dio en el sudeste asiático. Sin embargo, existen varias especies nativas en los bosques de Costa Rica que pueden albergar hongos endófitos (Hammel *et al.*, 2003a; Hammel *et al.*, 2003b). Muchas de estas plantas son hospederas de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* o son infectadas levemente por otras especies de *F. oxysporum* (Bentley, Pegg & Dale, 1995; FAO, 2014). Por lo que se considera que en estas plantas se podrían hallar hongos endófitos con potencial como agentes controladores biológicos contra el Mal de Panamá.

Objetivo general

Evaluar el efecto de endófitos recolectados en los Zingiberales: *Costus pulverulentus*, *Renealmia cernua*, *Calathea similis*, *C. lasiostachya* y *Heliconia irrasa* sobre el crecimiento del micelio y la viabilidad de los conidios y clamidosporas, en general de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Objetivos específicos

1. Crear una colección de hongos endófitos filamentosos extraídos de las raíces de *Costus pulverulentus*, *Renealmia cernua*, *Calathea similis*, *C. lasiostachya* y *Heliconia irrasa*
2. Determinar el efecto de la presencia del endófito sobre el crecimiento de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* por medio de pruebas *in vitro*.

Hipótesis y predicción

Los metabolitos producidos por estos hongos endófitos, así como por su capacidad

micoparasítica y competitiva, podrían tener un efecto negativo o antagónico sobre el crecimiento radial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. Por lo tanto, se espera que algunos posean potencial de disminuir o impedir el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, mediante la inhibición de la formación de nuevas hifas, o bien, mediante el micoparasitismo del hongo.

Materiales y métodos

Sitio de estudio

La investigación se llevó a cabo en La Reserva Biológica La Selva (10°26' N, 83°59' O, 37–150 msnm). La Selva posee un promedio anual de lluvias de 4 mm y un promedio de temperaturas es de 26°C (Lovelock *et al.*, 2004). La Selva, posee 1600 Ha, dentro de estas un 73% del territorio alberga bosque primario. El bosque está dominado por las palmas y por *Pentaclethra maculosa* (Willd.) Kuntze (Mimosaceae; Lovelock *et al.*, 2004). Según las bases de datos de la Estación, se han registrado 7 especies nativas de la familia Costaceae, 5 de Zingiberaceae, 4 de Marantaceae y 12 de Heliconiaceae (Organización para Estudios Tropicales, 2007).

Muestreo

En esta investigación se recolectaron muestras de las Zingiberales: *Costus pulverulentus*, *Renealmia cernua*, *Calathea similis*, *C. lasiostachya* y *Heliconia irrasa*. Estas plantas fueron utilizadas como fuente de hongos endófitos. Se recogieron cinco individuos por especie.

Para recolectar las plantas, se realizó un muestreo sistemático a lo largo de los senderos que recorren tanto el bosque primario (SUR, CCL, CC, LS, SHO) como secundario (SOR, ARB, SSN, SAT, STR) en La Selva. Se recolectaron por planta tres segmentos de raíz de 5 cm cerca de la base de la planta. Se recogió un espécimen de cada especie de planta para su identificación.

Cultivo, aislamiento e identificación de endófitos

En condiciones estériles, se cortaron varios fragmentos de las 3 raíces, y se escogieron al azar 5 de ellos con una longitud de 2 mm. Los segmentos se esterilizaron con alcohol al 70% e hipoclorito de cloro al 2%, y agua destilada mediante la metodología descrita por Santamaría & Bayman (2005). Una vez esterilizados, los tejidos se colocaron en un medio de cultivo a base de agar dextrosa y papa (PDA, OXOID CM0139) con 10 gotas de Succinato de Cloranfenicol por litro como antibiótico. Se aislaron las primeras hifas para separarlas de otros hongos o levaduras que puedan estar en el medio. Por último, se guardaron estas muestras ya purificadas en tubos de ensayo con 20 ml de agua. Cada muestra se identificó morfológicamente a nivel de morfoespecie.

Pruebas de antagonismo *in vitro*

Se obtuvieron los aislamientos más agresivos de *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 para Gros Michel (GM020), los cuales eran parte de la colección a disposición del Laboratorio de Fitopatología y Biología Molecular de la Sede del Atlántico (A. Tapia, UCR, Turrialba) para la elaboración de los experimentos *in vitro*. Para las pruebas de confrontación y antibiosis, se utilizaron las metodologías citadas por Samuels, Thomas & Evans (2006), Narayan *et al.* (2007), Sunil, Suresh & Birenda (2007), Bailey *et al.* (2008), Mejia *et al.* (2008). Para los experimentos de micoparasitismo, se usó las metodologías expuestas por Evans, Holmes & Thomas (2003), Samuels, Thomas & Evans (2006), y Tondje *et al.* (2007).

Prueba de confrontación

Para esta prueba se colocó en PDA un bloque de 5.5 mm del endófito de interés al borde de la placa Petri, y en el lado opuesto la placa, se cultivó un segmento de igual tamaño de FOC. Se realizaron cinco réplicas por cada endófito y se incubaron a temperatura ambiente. La medición se efectuó en el momento en que los hongos confrontados llenaron la placa Petri, a partir del borde del bloque colocado inicialmente con el patógeno, en línea recta, hasta el límite de crecimiento del hongo.

Adicionalmente, se tenía un control negativo, en el cual se cultivó en la placa, únicamente FOC. Se dejó crecer el control, la misma cantidad de tiempo que las confrontaciones y se realizaron las mediciones el mismo día que ellas. Posteriormente a la prueba, se determinó el porcentaje de inhibición de crecimiento de FOC con respecto a su

respectivo control con la siguiente fórmula, donde $C\pi$ corresponde al promedio de crecimiento del hongo en la prueba control y $P\pi$, al promedio de crecimiento del hongo en la prueba de confrontación.

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{C\pi - P\pi}{C\pi}$$

Además, a partir de estos ensayos se determinó si el endófito competía contra FOC, si lo inhibía, micoparasitaba, o si no influía en el crecimiento del otro. Se consideraba competencia, cuando el endófito colonizaba con mayor rapidez el medio de cultivo con respecto a FOC y este último no disminuía su tasa de crecimiento con respecto al control. Si el patógeno crecía a una tasa igual o mayor que el control, entonces el endófito no estaba interfiriendo en el crecimiento de FOC.

Por otra parte, se comprobó si el endófito era micoparasítico o si producía antibiosis. Para determinar si era micoparasítico, se cortó el agar alrededor de las zonas donde había un entrecruzamiento de las hifas. Se observó en el microscopio la interacción hifal entre el endófito y el patógeno en búsqueda de enrollamientos de hifas del endófito alrededor de hifas de FOC. También se consideraron como posibles micoparásitos aquellos hongos que degradaron o crecieron sobre FOC.

Por otro lado, se consideró como una señal de que el endófito producía antibiosis cuando FOC detenía o disminuía su crecimiento con respecto al control en presencia del endófito. Otra forma en que se midió esto es si se formaba un halo de inhibición entre el endófito y FOC. En estos casos, se anotó si había un cambio en la coloración del PDA.

Prueba de micoparasitismo

Para esta prueba se utilizaron aquellos endófitos que presentaron características antifúngicas en las pruebas de confrontación (Evans, Holmes & Thomas, 2003; Bailey *et al.*, 2008). En estos ensayos, se dejó crecer un fragmento de 5.5 mm del patógeno por 16 días en una placa Petri con PDA, y en otra aparte se dejó crecer al endófito de interés por nueve días. Luego, en el lado opuesto de la placa, sobre el micelio más reciente del patógeno, se colocó un fragmento del endófito de interés de 5.5 mm. Se hicieron cinco repeticiones y se incubaron a temperatura ambiente por 31 días. Se evaluó la presencia del endófito y del patógeno durante cinco días para obtener el porcentaje de colonización. Para esto se sacaron cinco

fragmentos de 5.5 mm consecutivos por día a partir del fragmento inicial de FOC hacia la izquierda y se cultivaron nuevamente en PDA para determinar si crecía FOC o el endófito. Por día, los cinco fragmentos se cultivaron en la misma placa Petri.

Prueba de antibiosis (Producción de metabolitos inhibitorios solubles)

Para esta prueba, se cultivaron tres fragmentos de 5.5 mm del micelio del endófito de interés a temperatura ambiente, cinco días a 115 rpm, en caldo de papa y dextrosa (PDB) siguiendo la metodología de Bailey *et al.*, (2008). El caldo se sometió a tres baños ultrasónico por 30 minutos cada uno y posteriormente se pasó por un filtro de 3µm (BOECO) y dos veces por un filtro de jeringa de acetato de celulosa de 0.20 µm (Minisart®, Sartorius stedim). El caldo resultante se guardó a -4°C.

El extracto resultante se mezcló con PDA al 2.25% esterilizado en una proporción 1:1, para hacer platos Petri con este medio. El micelio del patógeno se inoculó en el borde de la placa Petri para mayor uniformidad en el medio resultante por siete días a temperatura ambiente. Se realizaron cinco réplicas y un control para cada endófito y para el patógeno.

Prueba de viabilidad de conidios y clamidosporas

Para este experimento se utilizó una variación a la metodología empleada por el laboratorio de Fitopatología de la Sede del Atlántico para la evaluación de esterilizantes en la germinación de FOC. Adicionalmente, se realizaron variaciones en base a la metodología expuesta de Meldrum y colaboradores (2013).

Para extraer los conidios y las clamidosporas, se cultivó el patógeno en un plato Petri durante 15 días a temperatura ambiente. Se colocaron 10 fragmentos de 5.5 mm de FOC en erlenmeyers con Agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA), un agar pobre en nutrientes que estimula la formación de estructuras reproductivas en *Fusarium*. Después de 3 meses de incubación, se extrajo el micelio, el cual fue sometido a 11 horas de agitación a 240 rpm a temperatura ambiente, luego se tamizó con gaza y un filtro (BOECO) y se centrifugó a 3000 g por 10 min (Steinkellner, Mammerler & Vierheilig, 2005). Posteriormente, las clamidosporas se contabilizaron por medio de una cámara Neubauguer para obtener una disolución de concentración de 1×10^6 clamidosporas /ml de FOC.

Posteriormente, se procedió mediante una modificación a la metodología de uso del laboratorio de Fitopatología de la Sede del Atlántico para la evaluación de esterilizantes en

la germinación de FOC. En este caso, se extrajo una alícuota de 0,5 ml de clamidosporas y se colocó en una cantidad igual en un tubo eppendorf del extracto extraído del endófito en caldo de papa que se utilizó anteriormente para la prueba de antibiosis. Las clamidosporas se dejaron expuestas al extracto por 24 horas. Posteriormente se esparció, uniformemente, una alícuota de 0,2 ml en un plato Petri con PDA al 2.25% estéril y extracto en una proporción 1:1. Luego de 24 horas se contó el número de las unidades formadoras de colonia (UFC) de FOC. Se hicieron 5 réplicas y se compararon con un control que tenía agua destilada en lugar de extracto para obtener el porcentaje de inhibición de FOC mediante la fórmula citada anteriormente.

Análisis estadístico

Se utilizó un diseño experimental irrestricto al azar, para el cual se realizaron 5 pruebas *in vitro* por cada endófito por cada tipo de prueba. La prueba de confrontación y la de antibiosis se analizó mediante un Kruskal Wallis para medir las diferencias en el efecto de los endófitos en el crecimiento de FOC. Se utilizó un análisis de varianza (ANDEVA) para comparar el efecto de los endófitos en la germinación de las clamidosporas. Solamente se reportó el porcentaje de colonización de FOC para la prueba de micoparasitismo. Estos análisis se realizaron por medio del programa JMP® 10.

Resultados

Cultivo, aislamiento e identificación de endófitos

Se lograron recolectar y purificar 31 morfoespecies de hongos pertenecientes en su mayoría al filo Ascomycota. Dos de ellos pertenecen al género *Trichoderma*, seis a *Aspergillus*, un *Fusarium* y tres *Lasiodiplodia*.

Pruebas de antagonismo *in vitro*

Prueba de confrontación

Los endófitos duraron entre 4 a 17 días en colonizar todo el plato Petri. En general, duraron 12,25 ($\pm 2,94$) días en promedio en crecer. Siendo 28.2, 10.3A, 7.4 y 23.4 los que cubrieron la superficie del plato en menor tiempo, y 9.4, 6.4 y 2.3 duraron más días en logra dicha acción (KW: $\chi^2=116.80$, g.l=30, $p<0.001$, Fig. 1). El endófito 9.4 nunca llegó a llenar

todo el plato, por lo que se tomó el tiempo en que el control negativo con FOC llenara el plato como el límite de tiempo máximo.

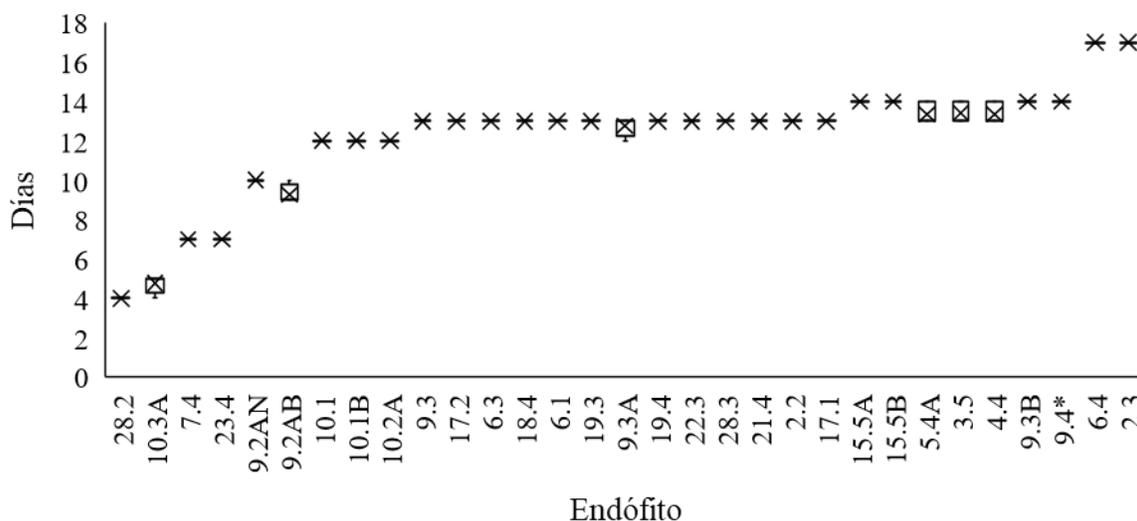


Fig. 1: Tiempo de crecimiento (Mediana) utilizado por los endófitos para llenar el plato Petri en presencia de FOC. * No llegó a llenar el plato.

En cuanto a las respuestas observadas, el modo de acción más común fue la antibiosis (51.6%). Por otro lado, el 12.9% de los hongos presentaron como respuesta el micoparasitismo y solo un hongo presentó señales de antibiosis y micoparasitismo. Finalmente, el 32.3% de los hongos solo mostraron señales de competencia.

Todos los endófitos disminuyeron significativamente el crecimiento de FOC entre un 14 a un 77% (KW: χ^2 :112.85, g.l=30, $p < 0.0001$). El 25.8% de los endófitos inhibieron entre 50% y 60% y el 6.4% de ellos inhibió por encima del 60% de inhibición (Fig. 2). En el caso del hongo 9.4 inhibió el crecimiento entre un 61% y un 95%

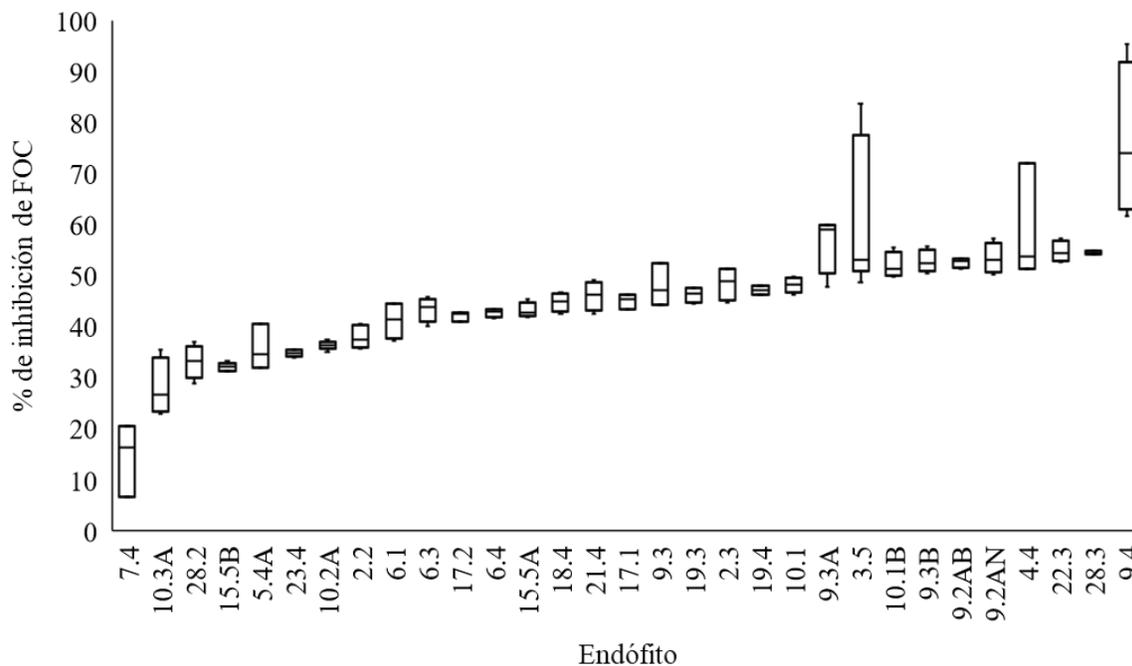


Fig. 2: Porcentaje de inhibición de FOC al confrontarlo con diferentes endófitos a nivel *in vitro*. (KW: χ^2 :112.85, g.l=30, $p < 0.0001$).

Entre las respuestas asociadas a antibiosis presentadas pudimos observar cambios en la coloración del medio de blanco a amarillo por parte del hongo 10.3A (A), formación de halo de inhibición (B), formación de barrera coloridas en la zona de confrontación entre micelios (C), inhibición en el crecimiento y cambio de coloración fuerte de FOC (D) (Fig. 3). Los hongos que presentaron mayores niveles de antagonismo pertenecen al género *Aspergillus* spp.

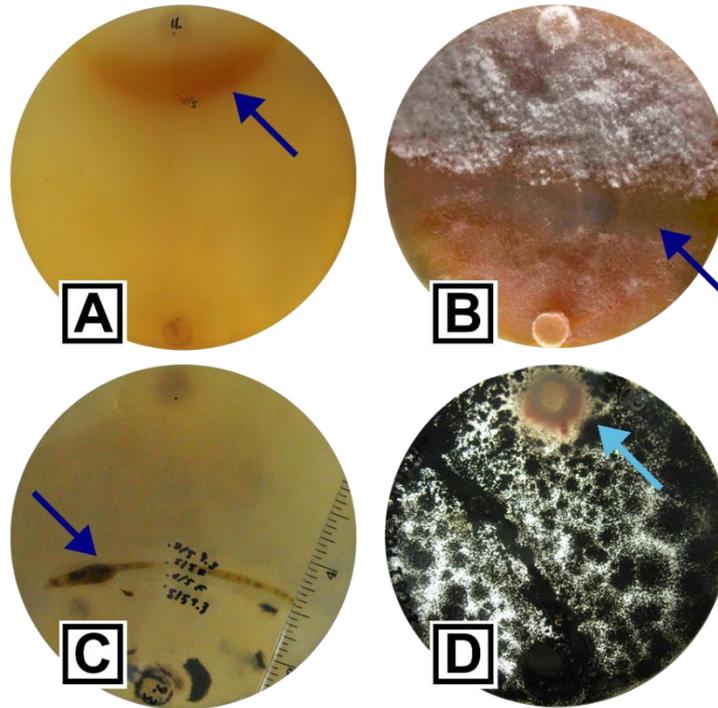


Fig. 3: Tipos de respuestas encontradas al confrontar FOC contra diferentes endófitos que producen antibiosis, FOC arriba. (A) Flecha indica la zona donde cambió de coloración en el medio. (B) Formación de halo de inhibición. (C) Formación de barrera coloridas en la zona de confrontación entre micelios, (D) inhibición en el crecimiento y cambio de coloración fuerte de FOC.

Los hongos micoparasíticos mostraron tres tipos de respuestas. Algunos como 9.4 y 9.2AN inicialmente produjeron una alta inhibición del patógeno. Una vez que las hifas del endófito y FOC se traslaparon, al observarlos en el microscopio, se podía observar cómo se enrollaban alrededor de las hifas de FOC (Fig. 4). En el caso de 9.2AN, se observó la formación de un apresorio sobre el patógeno, posteriormente, al enrollar las hifas sobre FOC, el endófito comenzó a desarrollar estructuras para esporular (Fig. 3C). No obstante, no se observó que el endófito creciera sobre FOC.

Por otro lado, 9.4 llegó a crecer encima de FOC, haciendo que este adquiriera tonos fucsias y morado oscuro (Fig. 3D). Al cultivar un fragmento de la zona de convergencia entre el patógeno y 9.4, se volvía a aislar a 9.4. También se observó que las hifas del endófito enrollaban a FOC.

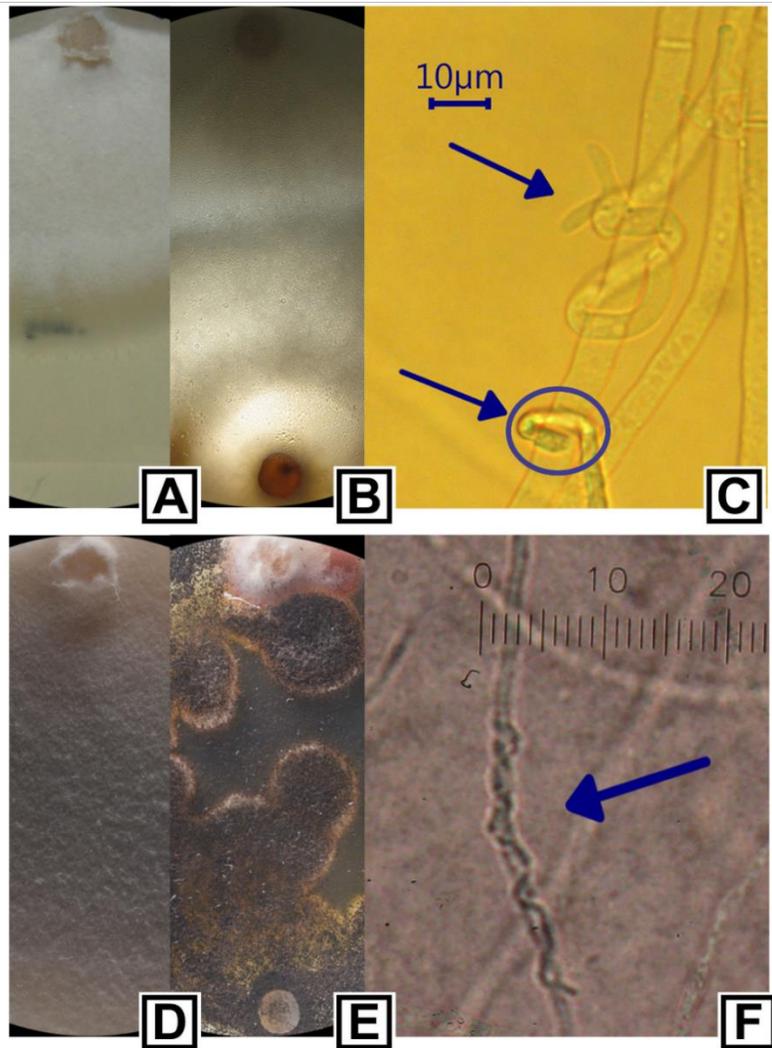


Fig. 4: Signos de micoparasitismo, FOC en la parte arriba del plato. A) control de FOC en confrontación con 9.2AN. B) Prueba confrontación con 9.2AN. C) 9.2AN forma apesorio (circulo), enrolla a FOC y comienza el proceso de producción de conidios. D) control de FOC en confrontación con 9.4. B) Prueba confrontación con 9.4, C) 9.4 enrolla a FOC. Las flechas indican enrollamiento hifal por parte del endófito alrededor de FOC.

Por otro lado, 28.2 y 10.3A crecieron rápidamente inhibiendo levemente el crecimiento del patógeno. Posteriormente, llenaron el plato y en ocasiones tiñeron el medio en la zona de confrontación y no dejaron seguir el crecimiento de FOC. Tres días después a que las hifas del endófito y FOC se traslaparon comenzaron a crecer sobre FOC y produjeron una enorme cantidad de conidios (Fig. 5).

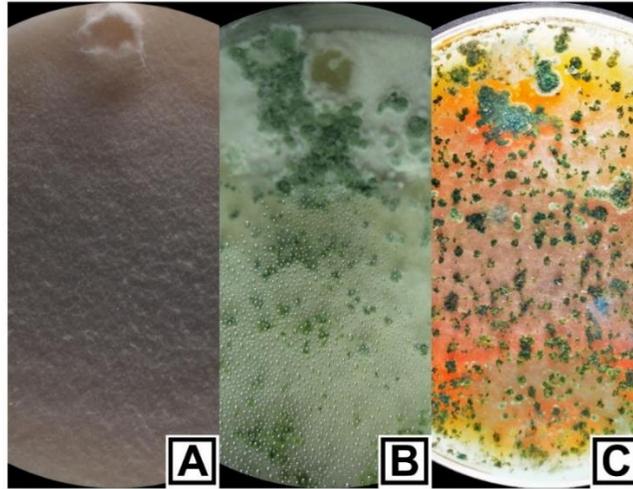


Fig. 5: Respuesta de 28.2 y 10.3A al confrontarlos contra FOC, FOC arriba. A) FOC control B) 28.2 creció sobre FOC y esporuló. B) 10.3A creció sobre FOC y esporuló.

Finalmente, 23.4 creció rápidamente sobre FOC y el medio se comenzó a poner amarillo oscuro donde estaba FOC y 23.4 juntos (Fig. 6.B). A los dos días el endófito había cubierto el 100% de FOC, se comenzó a ver cómo el patógeno iba desapareciendo e iba quedando solo 23.4. Por lo que FOC podría estar siendo degradado por 23.4 (Fig.6C). Los hongos 28.2, 10.3A y 23.4 presentaron un crecimiento tan rápido que era difícil observar al microscopio si había enrollamiento. Por lo tanto, se clasificaron como posibles micoparásitos por haber crecido sobre FOC.

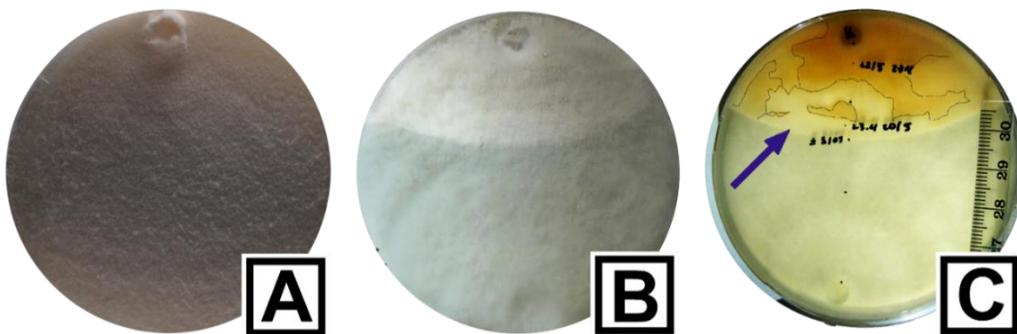


Fig. 6: Respuesta de 23.4 al confrontarlo con FOC, FOC arriba. A) FOC control. B) Crecimiento del endófito sobre FOC, lo cubre 100%. C) Endófito degrada de FOC. Flecha indica la zona donde está FOC junto con 23.4 y las líneas negras indica la zona donde se empezó a degradar FOC.

Otros hongos como 5.4a, 6.1, 6.3, 6.4, 17.2, 18.4, 19.3, 19.4 crecieron sobre FOC (Fig. 7). Sin embargo, no se observó enrollamiento en el microscopio y al cultivar un fragmento pequeño de la zona en donde convergían ambos hongos, salía FOC. Por lo que estos hongos no se consideraron micoparasíticos. No obstante, se observó cambios de coloración amarilla en la zona de convergencia de hifas de los hongos 6.3 (Fig. 7.C) y 18.4 (Fig 7.F) y cafés en 6.1 (Fig. 7.B), 6.4 (Fig. 7.D) y 19.3 (Fig. 7.G).

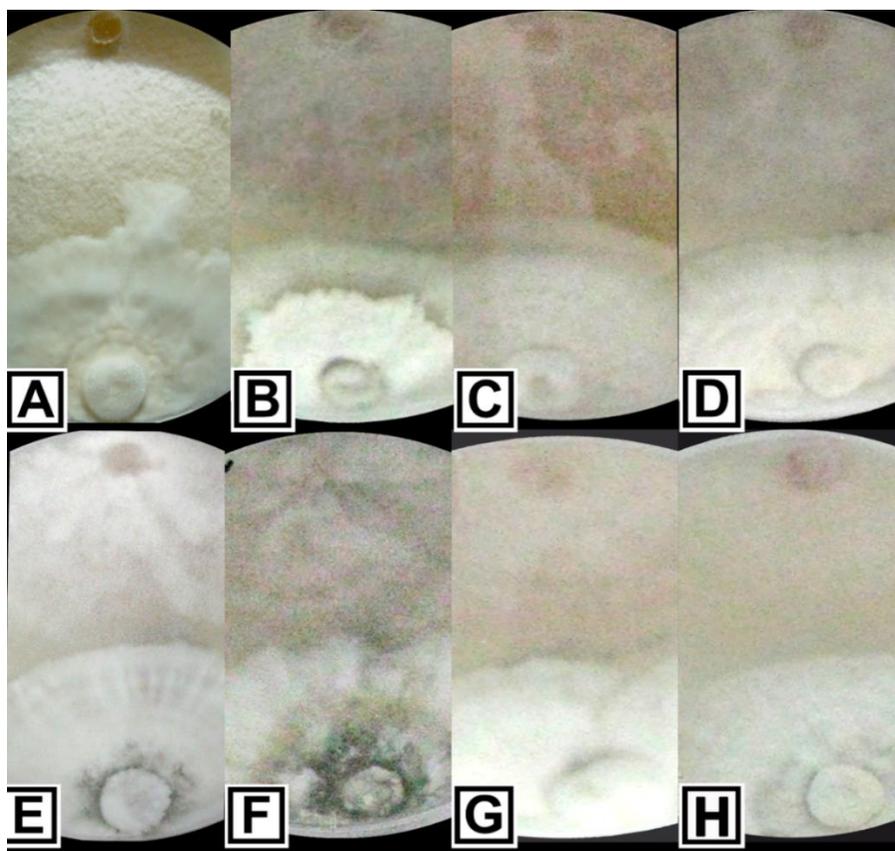


Fig. 7: Hongos que traslaparon con FOC pero no mostraron signos de micoparasitismo A) 5.4A, B) 6.1, C) 6.3, D) 6.4, E) 17.2, F) 18.4, G) 19.3, H) 19.4.

El endófito 7.4 no mostró características de antibiosis ni micoparasitismo, no obstante, creció más rápido que la mayoría de los hongos y abarcó una mayor área que FOC. En 7 días cubrió la placa Petri, impidiendo que FOC creciera más (Fig. 8). Por lo que fue considerado un competidor.

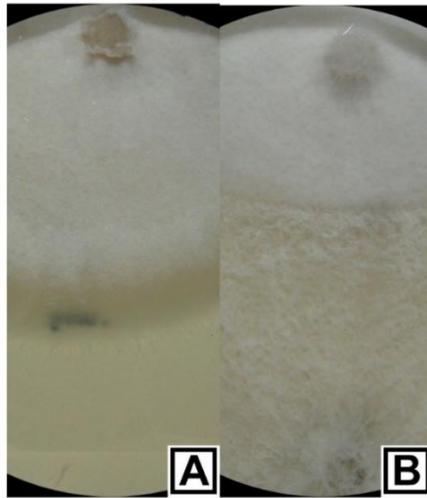


Fig. 8: Respuesta de 7.4 al confrontarlo con FOC. A) FOC control. B) Rápido crecimiento de 7.4.

Prueba de micoparasitismo

Se evaluaron los hongos 28.2, 10.3A, 9.2AN, 23.4 y 9.4 para determinar el potencial de micoparasitismo sobre FOC. Se observó que el hongo 10.3A se logró aislar en un 5% de las ocasiones sin FOC (Fig. 9) y los hongos 28.2, 9.4 y 10.3A crecieron junto con FOC (Fig. 10). Por otro lado, los endófitos 23.4, y 9.2AN no mostraron señales de micoparasitismo (Fig. 11). No se observó un patrón que relacionara los días con la aparición del endófito.

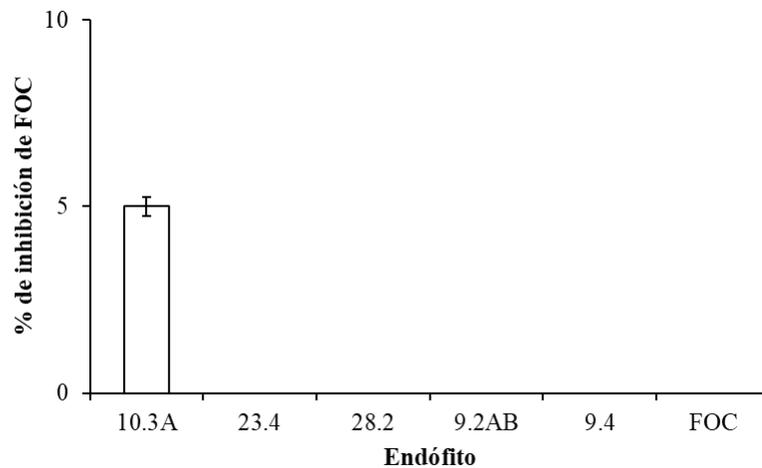


Fig. 9: Porcentaje de colonización del endófito al cultivarlo en un medio preinoculado con FOC.

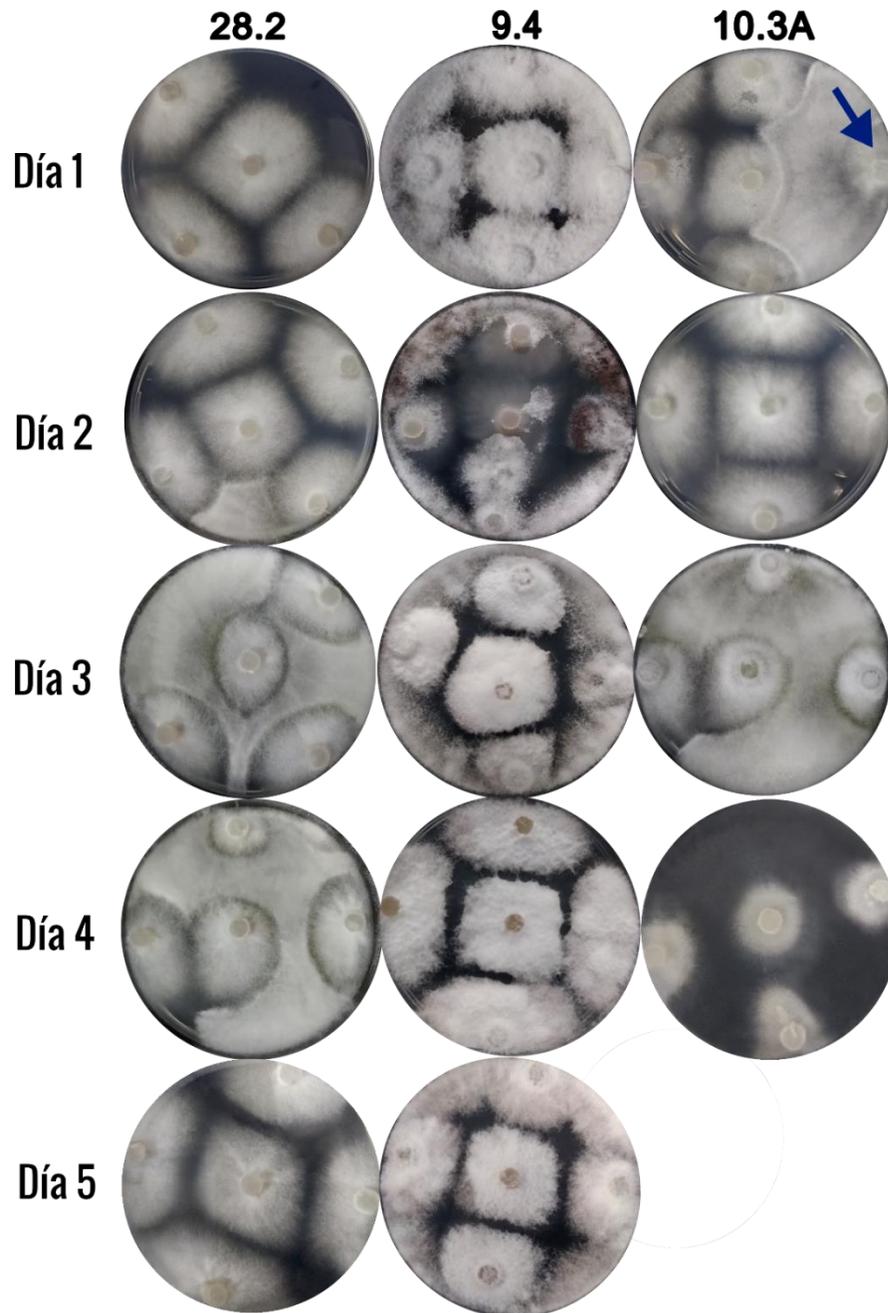


Fig. 10: Efecto de los endófitos micoparasíticos 28.2, 9.4 y 10.3A en el crecimiento de FOC a través del tiempo. 28.2 creció junto con FOC los días 2,3,4. el día 2 el endófito 9.4 creció con FOC y el día 1, 10.3A se aisló solo, la flecha indica la ubicación del endófito, 10.3A creció junto con FOC el día 3.

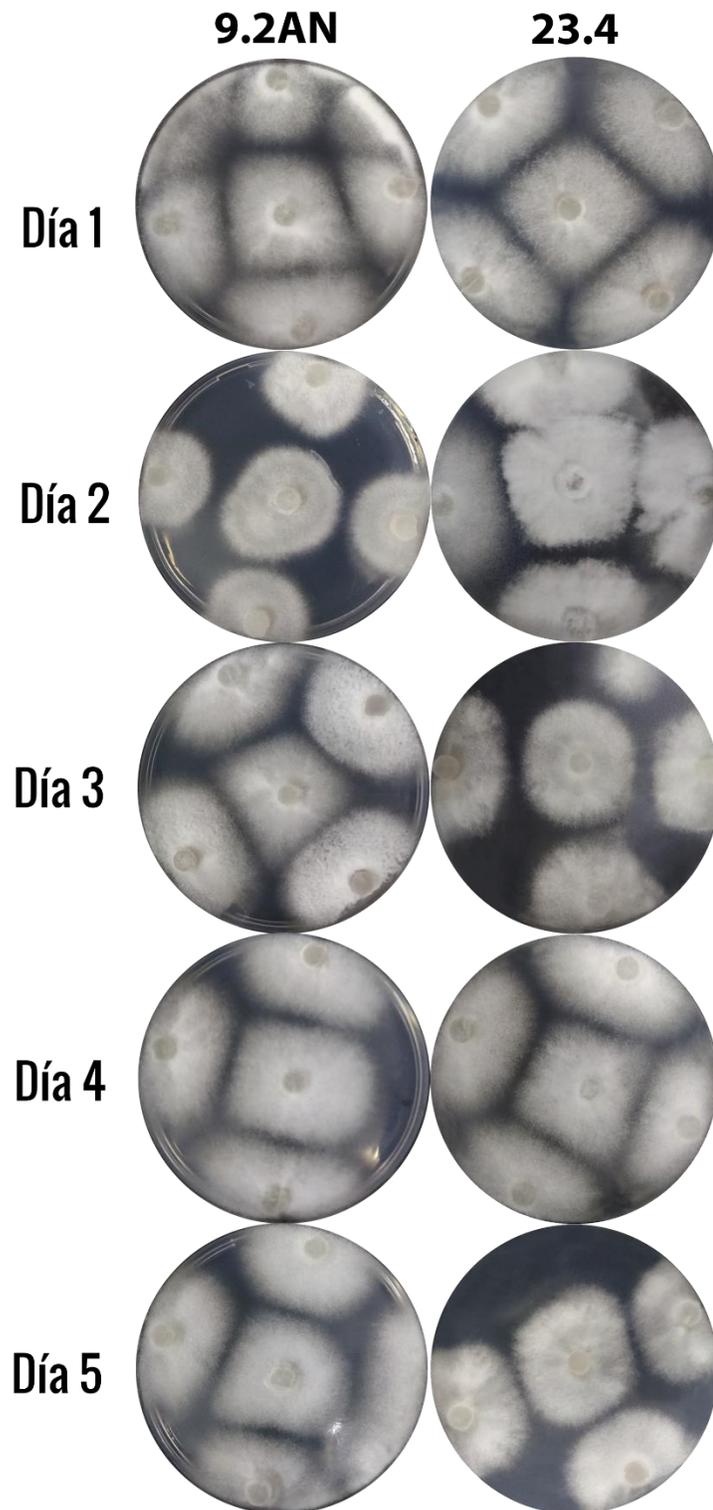


Fig. 11: Efecto de los endófitos micoparasíticos 9.2AN y 23.4 en el crecimiento de FOC a través del tiempo. Solo se logró aislar FOC.

Prueba de antibiosis

Los extractos obtenidos de los endófitos mostraron tener un efecto significativo sobre la inhibición del crecimiento de FOC (KW: $\chi^2=38,6748$; $df=12$; $p=0,001$, Fig.12). En esta prueba, el crecimiento de FOC se inhibió entre un 9.6% – 45.7%, dependiendo del endófito (Fig. 13). El hongo 9.3B fue el endófito que presentó una mayor inhibición en el crecimiento (45.7%-50.7%, Fig. 13B), seguido por 3.5 (39.3%) 22.3 (37.9%) y 28.3 (33.3%), respectivamente.

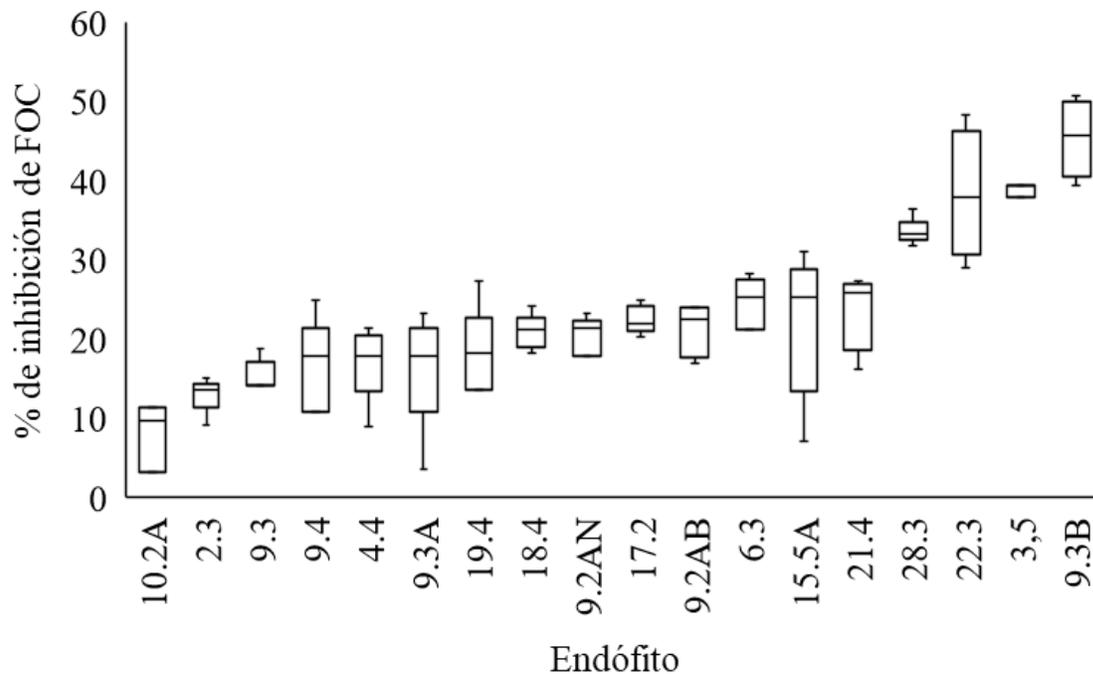


Fig. 12: Porcentaje de inhibición de FOC, al cultivarlo en medios de cultivo que contienen extractos filtrados de endófitos (KW: $\chi^2=38,6748$; $df=12$; $p=0,001$).

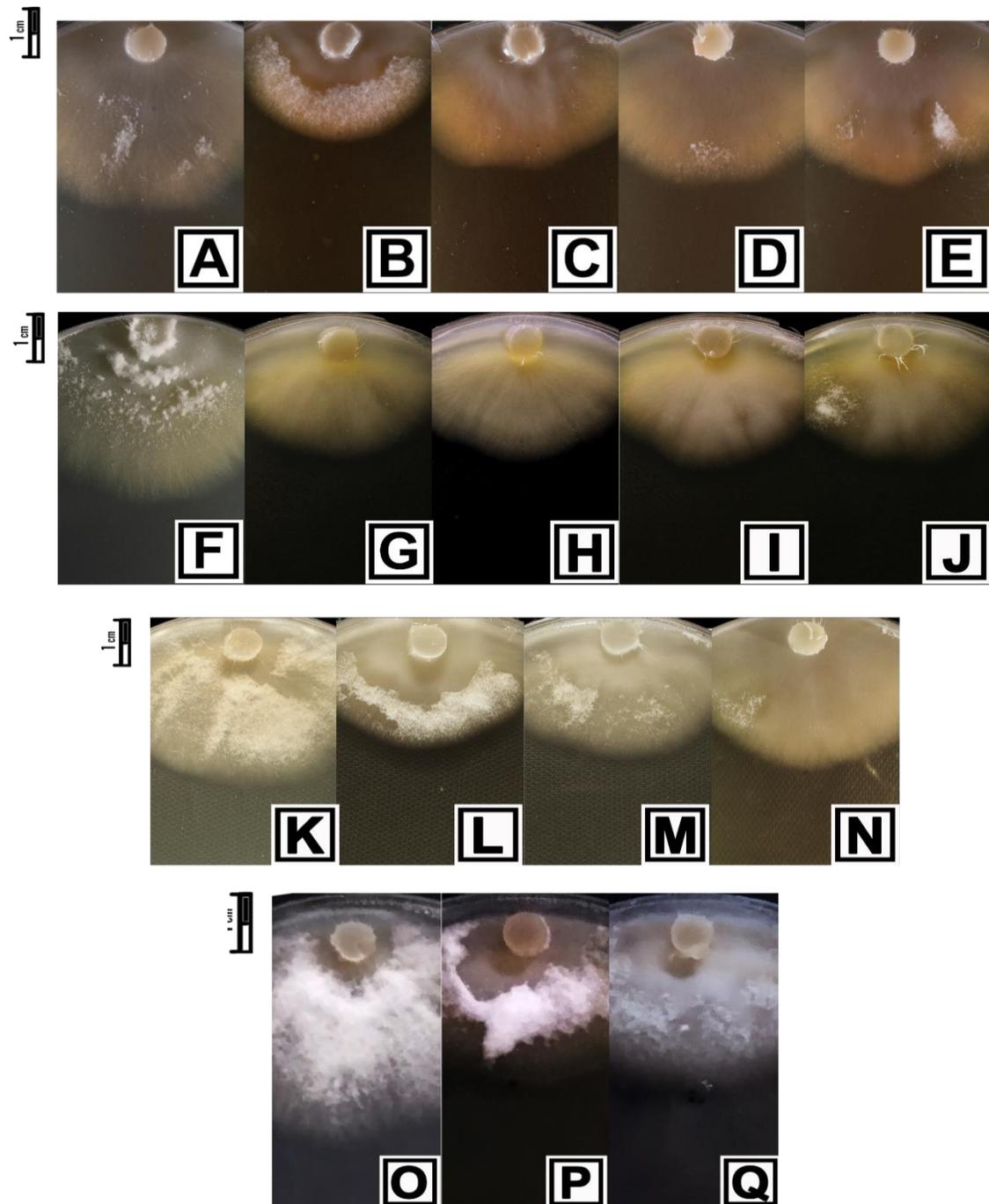


Fig. 13: Respuesta de FOC al cultivarlo en un medio con extractos filtrados de endófitos. Figuras A) F) K) O) controles de FOC. FOC disminuyó el crecimiento con respecto a los controles al crecer en: B) extracto de 9.3B C) extracto de 17.2 D) extracto de 9.2AB E) extracto de 9.3 G) extracto de 9.2AN H) extracto de 9.3A I) extracto de 4.4 J) extracto de 9.4 L) extracto de 22.3 M) extracto de 21.4 N) extracto de 10.2A P) extracto de 6.3 Q) extracto de 15.5A.

Prueba de viabilidad de esporas

Se observaron diferencias en el efecto inhibitorio de los endófitos ($R=0.44$; $F_{0.005(3,20)}=5.44$; $gl.=23$; $p=0.0067$) sobre la germinación de las esporas de FOC al compararlas con el control. 9.3B fue el endófito que inhibió en mayor promedio la germinación de FOC en un $9.7 \pm 8\%$ ($\pm DE$), pudiendo inhibir en una ocasión hasta un 21.9% la germinación de las esporas, Por otro lado, los hongos 28.3, 22.3 y 3.5, en general promovieron la germinación de las esporas (Fig. 14).

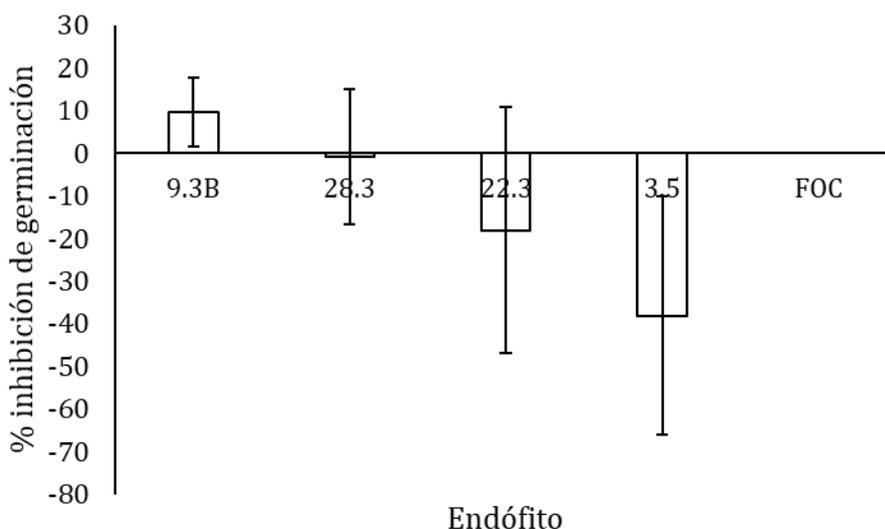


Fig. 14: Porcentaje de inhibición promedio ($\pm D.E$) en la germinación de las esporas de FOC en cultivadas en diferentes extractos de endófitos a nivel *in vitro* ($R=0.45$; $F()=5.44$; $gl.=3$; $p=0.0067$). Solo 3.5 inhibió ligeramente la germinación de esporas. Los extractos de 28.3, 22.3 y 3.5 promovieron la germinación.

Discusión

Con el surgimiento de patógenos resistentes a los métodos tradicionales de control, es fundamental incrementar las investigaciones acerca de nuevos métodos basados en estudios de la ecología del patógeno. Estudios realizados por Bailey *et al.* (2008) Evans, Holmes & Thomas (2003) en cacao y Gazis, & Chaverri, (2015) en caucho, han demostrado la importancia de los bosques neotropicales como fuentes de hongos endófitos que inhiben el crecimiento de patógenos tanto *in vitro* como *in planta*.

Asimismo, en la presente investigación se encontraron una gran diversidad de hongos endófitos extraídos de Zingiberales nativas de los bosques costarricenses. Tal como se predijo inicialmente, los endófitos mostraron efectos antagónicos *in vitro* contra el *F. oxysporum* f. sp *cubense*. Adicionalmente, revelaron una importante competitividad, ya sea por obtener rápidamente los recursos disponibles, por la producción de metabolitos que inhiben el crecimiento de FOC, o por medio del micoparasitismo (Chernin & Chet, 2002). Estudios anteriores han demostrado que las respuestas antagónicas de hongos y bacterias tiene un efecto en la presencia de FOC (Shen *et al.*, 2018). Y como la presencia de hongos como *Trichoderma*, *Aspergillus* y *Penicillium* tienden a regular la aparición del patógeno en suelos supresivos (Ghag, Shekhawat & Ganapathi, 2015).

Pruebas de antagonismo *in vitro*

Prueba de confrontación

Tal como se esperaba, la mayor parte de los endófitos estudiados a nivel *in vitro* disminuyeron el crecimiento de FOC. Endófitos como 28.2, 10.3A y 23.4 mostraron características micoparasíticas entre estas, colonizaron la placa Petri en una menor cantidad de tiempo con respecto a los demás endófitos y crecieron sobre el patógeno. Estas respuestas, le permitieron a los endófitos entrar en contacto con hongo presa en una menor cantidad de tiempo y consumirlo (Chernin & Chet, 2002; Thangavelu & Mustaffa, 2010).

Otro hongo que llenó en un menor tiempo la placa fue 7.4; no obstante, no se observaron características micoparasíticas o antibióticas, por lo que se clasificó como competidor. Estos endófitos tienden a crecer rápidamente para ser el primer organismo en acceder a los recursos que el medio les da, como en este caso del endófito 7.4 (Chernin & Chet, 2002).

También se observaron endófitos que disminuyeron significativamente el crecimiento del patógeno. Estos, en general, crecieron en un mayor tiempo con respecto a los otros endófitos. El hallazgo coincide con lo postulado por Mejía y colaboradores (2008), quienes indicaron que aquellos endófitos que producen antibiosis, tienen un crecimiento más lento. Como, por ejemplo, 9.4 el cual inhibió a FOC hasta un 95.4%.

También se obtuvieron diez hongos que inhibieron en más de 50% el crecimiento de FOC. Estos resultados son mucho más prometedores que los encontrados por Thangavelu, Palaniswami & Velazhahan (2004) donde se reporta que diferentes cepas comerciales de *T. viride* y *T. harzianum* inhibían FOC raza 1 entre 26.67% a 46.67% a nivel *in vitro*. A la vez, son más promisorios que los resultados encontrados por Caballero-Hernández (2011) en donde diferentes cepas de *Trichoderma* spp. aisladas de plantaciones de banano en Costa Rica inhibieron el crecimiento de la raza 1 entre un 36.16% a un 62.5%.

Por otro lado, el hongo 9.4 presentó tanto antibiosis como señales de micoparasitismo. El endófito se identificó como *Aspergillus cf niger*. Hu y colaboradores (2013) encontraron que este hongo puede actuar como micoparásito de los esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum* en un 89.6% a un 90.7%. Este hongo es conocido por la producción de metabolitos como aflatoxinas que tiene un alto impacto sobre el crecimiento de otros hongos (Sudarma & colaboradores, 2015).

También se seleccionaron con la prueba de confrontación cinco endófitos que presentaron síntomas de micoparasitismo. La actividad mostrada por estos hongos durante la prueba de confrontación fue similar a las descritas por Atanasova (2014) en *Trichoderma* spp., en donde se divide el proceso de micoparasitismo en cuatro etapas. El momento en donde el hongo espera a que aparezca una potencial presa, el reconocimiento de la presencia de la presa, la inducción de herramientas bioquímicas para sitiar por parte del micoparásito, y finalmente, el ataque y la muerte de la presa.

El reconocimiento de la presa ha sido estudiado principalmente en *Trichoderma* spp.. Se ha identificado que el fenómeno está asociado al quimiotropismo (Karlsson *et al.*, 2017), en donde el micoparásito, libera proteasas, las cuales influyen en la liberación de oligopéptidos al medio por parte del hongo presa. Estos oligopéptidos se unen a los receptores acoplados de proteínas G y a receptores sensibles al nitrógeno en el caso de *Trichoderma* spp. (Druzhunina *et al.*, 2011; Atanasova, 2014). En consecuencia, se produce una cascada de señalización que finaliza en la producción de enzimas degradadoras de la pared celular del otro hongo y en la biosíntesis de metabolitos secundarios (Druzhunina *et al.*, 2011; Atanasova, 2014).

Durante la investigación se pudo observar un cambio de coloración del medio mientras el micoparásito se estaba acercando a FOC. Este cambio de coloración de blanco a

un amarillo intenso sugiere la liberación de metabolitos que podían tener una función similar a la descrita en la literatura (Druzhunina *et al.*, 2011; Atanasova, 2014). Además, se observó una reducción en el crecimiento de FOC mayor del 50% al confrontarlo con 9.2AN y 9.4.

También se observó la formación de un apresorio por parte de 9.2AN y enrollamiento tanto en 9.2AN y 9.4. Karlsson y colaboradores (2017) describen que la formación de los apresorios está relacionada con la producción de lectina por parte del hongo presa. La liberación de lectina por la presa sirve como una señal para el hongo micoparasítico produzca una papila similar a un apresorio y posteriormente comience a enrollarse sobre su presa.

También se observaron dos tipos de estrategias antagonistas: la rápida y la lenta. La primera estrategia se observó con los hongos 10.3A, 23.4, y 28.2. Estos crecieron y llenaron toda la placa rápidamente. Además, inhibieron entre un 27.96% y un 34.82% a FOC durante su crecimiento. Dos días después de que convergieron las hifas del micoparasito y la presa, los endófitos comenzaron a crecer sobre FOC cubriendo parcialmente (10.3A y 28.2) y totalmente (23.4) al patógeno. Estos hongos siguieron una estrategia similar a la observada por Atanasova y colaboradores (2013) con *T. virens*, quien rápidamente intoxicó a su presa y creció encima.

Por otro lado, 9.2AN y 9.4 utilizaron una estrategia lenta similar a la descrita para el hongo *T. atroviride*. El tipo de micoparasitismo que se describe, está ligado a procesos de antibiosis (Atanasova *et al.*, 2013). Al ser un proceso de crecimiento hacia el patógeno más lento con respecto a los otros hongos micoparasíticos, se pudo observar claramente el enrollamiento de las hifas. Sin embargo, sería relevante estudiar más a fondo los procesos de micoparasitismo de los hongos 23.4, 9.4 y 9.2AN, debido a la poca documentación existente que detalle los procesos fisiológicos que ocurren durante el micoparasitismo en otras especies diferentes a *Trichoderma*.

Prueba de micoparasitismo

En esta prueba, se esperaba que los hongos endófitos colonizaran el plato preinoculado con FOC y que al extraer un fragmento de este plato y cultivarlo nuevamente se lograría aislar únicamente el endófito. No obstante, los hongos considerados micoparasíticos no actuaron con la misma eficacia que en la prueba de confrontación. Los endófitos que antes habían micoparasitado a FOC no lograron colonizar el plato preinoculado

con el patógeno, con excepción de 10.3A que se logró aislar solo en una ocasión y creció junto con el patógeno al igual que los hongos 28.2 y 9.4.

Por su parte, se esperaba que con el transcurso de los días el endófito iba a ir creciendo y se iba aislar a lo largo de la placa. Sin embargo, no se observó un patrón claro de crecimiento a partir del fragmento donde se encontraba el endófito, en el transcurso del tiempo de prueba.

Se ha reportado que varias especies de hongos con potencial micoparasítico como *Trichoderma*, crecen sobre otros hongos y se alimentan de biomasa fúngica muerta (Karlsson *et al.*, 2017). Razón por la cual posiblemente no disminuyó la presencia de FOC. Sin embargo, este hongo se podría probar *in planta* y así observar su potencial para prevenir la entrada de FOC en la planta, ya que mostraron que al crecer previo a FOC pueden micoparasitarlo.

Prueba de antibiosis

Los hongos producen un amplio rango de metabolitos secundarios, los cuales confieren una ventaja al hongo a la hora de competir por recursos (Chen *et al.*, 2015). El efecto de este proceso se observó en la prueba de confrontación, donde hubo hongos que inhibieron a FOC como 9.4, 28.3, 22.3, 4.4. La mayoría de los hongos que inhibieron el crecimiento de FOC pertenecen al género *Aspergillus*. Muchos hongos del presente género están reportados en la literatura por su capacidad de producir micotoxinas u otros metabolitos como el metil-ester el cual inhibe el crecimiento de otros hongos (Aneja, Gianfagna & Hebbbar, 2006).

Otros hongos como las *Trichoderma*, mostraron cambios en la coloración del medio antes del contacto con FOC. Está reportado que este género produce un amplio rango de metabolitos, como por ejemplo el ácido heptelídico y el ácido koníngico, entre otros (Chernin & Chet, 2002; Tonje *et al.*, 2007; Karlsson *et al.*, 2017; Adnan *et al.*, 2019). Por lo tanto, estos hongos son de un gran interés para control biológico.

Por otro lado, mediante la prueba de antibiosis se observó el efecto de los metabolitos secundarios solubles en agua inhibitorios producidos por el endófito en el crecimiento y esporulación del patógeno. Durante esta prueba, encontramos hongos que inhibieron a FOC hasta un 50,7% de su crecimiento radial. No obstante, el porcentaje podría incrementar si se utilizan métodos como la liofilización para concentrar los metabolitos disueltos en el agua y

si se trabaja con hongos que estén esporulando, que es cuando liberan una mayor gama de metabolitos (Calvo *et al.*, 2002, Zaferanloo, Vikar, Mahon & Palombo, 2013).

Prueba de viabilidad de conidios y clamidosporas

Tal como se observa en el experimento, la producción de conidios y clamidosporas fue mayor en los platos que tenían extractos de los endófitos 28.3, 22.3, 3.5 con respecto al control. Solo el hongo 9.3B inhibió el crecimiento entre un 9.7-21.9%. Esto podría estar relacionado con la metodología empleada, ya que las esporas de FOC fueron incubadas por día en caldo de papa junto con el extracto del endófito, previo a colocarlo en el plato Petri. Los extractos de los endófitos no inhibieron en ese momento la germinación de esporas, que era lo que se esperaba, sino que más bien la estimularon.

Whalley y Taylor (1973) indican que la germinación de las clamidosporas y conidios de *Fusarium* es estimulada por nutrientes como la glucosa. Además, estos carbohidratos tienen un efecto directo en la producción de clamidosporas, ya sea aumentando o inhibiendo su producción de acuerdo a las necesidades nutricionales del hongo (Schippers & Old, 1974). los azúcares provenientes del caldo pudieron ser los estimulantes de la germinación de las esporas, y una vez colocados en la paca Petri rápidamente terminaron de crecer (Peng *et al.*, 1999).

Conclusiones

En este experimento, se analizaron 31 morfoespecies, 5 de las cuales mostraron potencial micoparasítico y 15 revelaron potencial antibiótico. Al realizar pruebas más específicas se seleccionó a 10.3A, ya que fue el único que disminuyó el crecimiento de FOC por micoparasitismo en placas preinoculadas por el patógeno. Además, mostró potencial antibiótico.

En el caso de los hongos que producían antibiosis hubieron 4 que inhibieron en más de 30% el crecimiento de FOC (9.3B, 3.5, 22.3 y 28.3). En donde se seleccionó a 9.3B por su capacidad de disminuir la germinación de las estructuras reproductivas de *F. oxysporum* f.sp *cubense* hasta un 21.9% y disminuir el crecimiento micelar hasta un 50.7%. En el caso de los endófitos *Aspergillus* spp que dieron muy buenos resultados en la prueba de confrontación, se debe evaluar si los metabolitos que producen son debido a micotoxinas y

valorar cual es el efecto de estas en la plantación y la salud humana. También se recomienda, realizar pruebas con consorcios de hongos, ya que la presencia de uno puede potencial la acción de otro hongo frente al patógeno.

Los ensayos *in vitro* es una herramienta muy útil para seleccionar endófitos que tengan potencial antibiótico y micoparasítico, pero pueden generar resultados diferentes a los encontrados en pruebas *in planta* e *in vivo*. Por lo que se recomienda realizar ensayos con los hongos estudiados en invernadero y en el campo. Es importante realizar estas pruebas con diferentes tipos de suelo para evaluar la sobrevivencia y la actividad biológica contra FOC. Además, estos estudios permitirán evaluar su eficacia en estos ambientes y ayudará a entender la relación planta endófito y valorar diferentes implicaciones que puede conllevar la utilización de organismos vivos en una plantación como por ejemplo la compatibilidad del endófito con la planta, la producción de micotoxinas, competencia con otros microorganismos benéficos del suelo o si actúan en condiciones de estrés como fitopatógenos, entre otros.

Finalmente, se debe recalcar la importancia el estudio de los bosques tropicales en la búsqueda de nuevos microorganismos para control biológico y en la búsqueda de hongos que colonicen la planta de manera sistémica. Esto les permitirá una protección durante más tiempo.

Referencias

- Adnan, M., Islam, W., Shabbir, A., Khan, K. A., Ghramh, H. A., Huang, Z., ... & Lu, G. D. (2019). Plant defense against fungal pathogens by antagonistic fungi with *Trichoderma* in focus. *Microbial pathogenesis*. 129, 7-18. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401018320631>
- AEACA-Agrocalidad. (2013). Plan Nacional de Contingencia para *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (Foc R4T). Ecuador. MAGAP. Recuperado de: <http://web.ua.es/es/ice/documentos/redes/2012/asesoramiento/modelo-normas-apa-bibliografia.pdf>
- Alarcón-Restrepo, J. J. & Jiménez-Neira, Y. (2012). Manejo fitosanitario del cultivo del plátano (*Musa* spp. medidas para la temporada de invierno. Bogota, Colombia. Recuperado de: <http://www.fao.org>

- Alvindia, D. G. & Natsuaki, K. T. (2008). Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana fruit surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. *Crop Protection*, 27, 1200-1207. doi:10.1016/j.cropro.2008.02.007
- Aneja, M., Guanfagna, T. J. & Hebbar, P. K. (2005). *Trichoderma harzianum* produces nonanoic acid, an inhibitor of spore germination and mycelial growth of two cacao pathogens. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 67, 304–307.
- Arias, P., Dankers, C., Liu, P. & Pilkauskas, P. (2004). *La economía mundial del banano: 1985-2002 (No. 1)*. Roma, Italia: Food and Agriculture Organization. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/007/y5102s/y5102s00.htm>
- Arnold, a, E., Mejía, L. C. Kylo, D., Rojas, E, I., Maynard, Z, Robbins, N. & Herre, E, A. (2003). Fungal endophytes limit pathogen damage in a tropical tree. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (26), 15649-15654
- Arnold, A. E. & F. Lutzoni. (2007). Diversity and host range of foliar fungal endophytes. Are tropical leaves biodiversity hotspots? *Ecology*, 88(3), 541-549.
- Atanasova, L. (2014). Ecophysiology of *Trichoderma* in genomic perspective. En Gupta, V. G., Schmoll, M., Herrera-Estrella, A., Upadhyay, R. S., Druzhinina, I., & Tuohy, M. (Eds.). *Biotechnology and Biology of Trichoderma* (pp. 25-40). Massachusetts, EEUU, Elsevier. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/C2012-0-00434-6>
- Atanasova, L., Le Crom, S., Gruber, S., Couplier, F., Seidl-Seiboth, V., Kubicek, C. P., & Druzhinina, I. S. (2013). Comparative transcriptomics reveals different strategies of *Trichoderma* mycoparasitism. *BMC genomics*, 14(1), 121. Recuperado de: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/14/121>
- Bailey, B. A., Bae, H., Strem, M. D., Crozier, J., Thomas, S. E., Samuels, G. J., Vinyard, B.T. & Holmes, K. A. (2008). Antibiosis, mycoparasitism, and colonization success for endophytic *Trichoderma* isolates with biocontrol potential in *Theobroma cacao*. *Biological Control*, 46, 24-35.
- Barquero, M. (12 setiembre 2015). Exportación de piña cae por mal clima y salida de productores. *La Nación*. http://www.nacion.com/economia/agro/Exportacion-pina-clima-salida-productores_0_1511648829.html.
- Barquero, M. (5 de diciembre 2015). Los resultados son buenos en la producción bananera. *La Nación*. Recuperado de: http://www.nacion.com/economia/agro/resultados-buenos-produccion-bananera_0_1528447156.html.

- Bentley, S. Pegg, K. G & Dale J. L. (1995). Genetic variation among a world-wide collection of isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* analysed by RAPD-PCR fingerprinting. *Mycological research*, 99(11), 1378-1384.
- Butler, D. (2013). Fungus threatens top banana. Fears rise for Latin American industry as devastating disease hits leading variety in Africa and Middle East. *Nature*. 504, 195-196. doi: 10.1038/504195A.
- Caballero-Hernández, A. J. (2011). *Uso de hongos endofíticos de Trichoderma spp. para el biocontrol del Mal de Panamá (Fusarium oxysporum f. sp. cubense) raza tropical 1 en vitroplantas del cultivar Gros Michel (AAA)*. (Tesis inédita de Maestría) Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba, Costa Rica.
- Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W., & Keller, N. P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 66(3), 447-459. Recuperado de: <https://mmbr.asm.org/content/mmbr/66/3/447.full.pdf>
- Cao, L. X., You, J.L. & S.N. Zhou. (2002). Endophytic fungi from *Musa acuminata* leaves and roots in South China. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 18, 169–171
- Cao, L., Qiu, Z., You, J., Tan, H. & Zhou, S. (2005). Isolation and characterization of endophytic *Streptomyces* antagonists of *Fusarium* wilt pathogen from surface-sterilized banana roots. *FEMS Microbiology Letters*, 247, 147-152.
- Chen, H., Daletos, G., Abdel-Aziz, M. S., Thomy, D., Dai, H., Brötz-Oesterhelt, H., Lin, W. & Proksch, P. (2015). Inducing secondary metabolite production by the soil-dwelling fungus *Aspergillus terreus* through bacterial co-culture. *Phytochemistry Letters*, 12, 35-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phytol.2015.02.009>.
- Chernin, L & Chet, I. (2002). Microbial Enzymes in the Biocontrol of Plant Pathogens and Pests. En Burns, R & Dick, R (Eds.). *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications* (pp. 171-222). New York, USA: Marcel Dekker, Inc.
- CORBANA. (2016). La industria bananera como fuente de empleo. Recuperado de: https://www.corbana.co.cr/categories/categoria_1348798091
- Costa, C. R. (2007). *Fungos associados às plantas ornamentais tropicais no Distrito Federal*. (Tesis inédita de Maestría). Universidad de Brasília, Brasil. 114. Recuperado de: http://bdtd.bce.unb.br/tesesimplificado/tde_arquivos/53/TDE-2008-02-14T082731Z-2254/Publico/Dissert_Caroline%20Rabelo.pdf
- Czislowski, E., Fraser-Smith, S., Zander, M., O'Neill, W. T., Meldrum, R. A., Tran-Nguyen, L. T., ... & Aitken, E. A. (2018). Investigation of the diversity of effector genes in the banana pathogen, *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*, reveals evidence of horizontal gene

- transfer. *Molecular plant pathology*, 19(5), 1155-1171. Recuperado de: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/mpp.12594>
- De Ascensao, A. R. D. C. F. & Dubery, I. A. (2000). Panama disease: Cell wall reinforcement in banana roots in response to elicitors from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race four. *Phytopathology*, 90,1173-1180.
- De Silva, N. I., Brooks, S., Lumyong, S. & Hyde, K. D. (2019). Use of endophytes as biocontrol agents. *Fungal Biology Reviews*. 33(2), 133-148. Recuperado de: <https://doi.org/10.1016/j.fbr.2018.10.001>
- Djonovic, S., Vargas, W. A., Kolomiets, M. V., Horndeski, M. Wiest, A. & Kenerley, C. M. (2007). A Proteinaceous Elicitor Sm1 from the Beneficial Fungus *Trichoderma virens* Is Required for Induced Systemic Resistance in Maize. *Plant Physiology*, 145, 875–889. Recuperado de: <http://www.plantphysiol.org/content/145/3/875>.
- Druzhinina, I. S., Seidl-Seiboth, V., Herrera-Estrella, A., Horwitz, B. A., Kenerley, C. M., Monte, E., Mukherjee, P. K., Zelinger, S. Grigoriev, I. V. & Kubicek, C. P. (2011). *Trichoderma*: the genomics of opportunistic success. *Nature reviews microbiology*, 9(10), 749.
- Eilenberg, J., Hajek, A., & Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46(4), 387-400. Recuperado de: <http://link.springer.com/article/10.1023%2FA%3A1014193329979?LI=true>.
- Eljounaidi, K., Lee, S. K., & Bae, H. (2016). Bacterial endophytes as potential biocontrol agents of vascular wilt diseases—review and future prospects. *Biological Control*, 103, 62-68.
- Evans, H. C., Holmes, K. A. & Thomas, S. E. (2003). Endophytes and mycoparasites associated with an indigenous forest tree, *Theobroma gileri*, in Ecuador and a preliminary assessment of their potential as biocontrol agents of cocoa diseases. *Mycological Progress*, 2, 149-160.
- FAO. (2014). *Banana Market Review and Banana Statistics 2012-2013*. Roma, Italia. Recuperado de: <http://www.fao.org/docrep/019/i3627e/i3627e.pdf>
- FAO. (2016). *FAO statistical database. Commodities by regions exports*. Recuperado de: http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/commodities_by_regions_exports.
- Fiaboe, K. K., Fonseca, R. L., De Moraes, G. J., Ogol, C. K., & Knapp, M. (2006). Identification of priority areas in South America for exploration of natural enemies for classical biological control of *Tetranychus evansi* (Acari: Tetranychidae) in Africa. *Biological control*, 38(3), 373-379.
- Fourie, G., Steenkamp, E. T., Gordon, T. R., & Viljoen, A. (2009). Evolutionary relationships among the *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* vegetative compatibility groups. *Applied and*

- Environmental Microbiology*, 75(14), 4770-4781. Recuperado de: <https://aem.asm.org/content/aem/75/14/4770.full.pdf>
- García, J. 1997. Consecuencias indeseables de los plaguicidas en el ambiente. *Agronomía Mesoamericana*, 81, 119-135.
- Gazis, R & Chaverri, P. (2015). Wild trees in the Amazon basin harbor a great diversity of beneficial endosymbiotic fungi: Is this evidence of protective mutualism? *Fungal ecology*, 17, 18-29. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.funeco.2015.04.001>
- Gazis, R., Rehner, S. & Chaverri, P. (2011). Species delimitation in fungal endophyte diversity studies and its implications in ecological and biogeographic inferences. 20(14), 3001-3013. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05110.x
- Ghag, S. B., Shekhawat, U. K. S., & Ganapathi, T. R. (2015). *Fusarium* wilt of banana: biology, epidemiology and management. *International Journal of Pest Management*, 61(3), 250–263. doi:10.1080/09670874.2015.1043972
- Gowen, S. (1995) *Bananas and Plantains*. Doi : 10.1007/978-94-011-0737-2
- Groenewald, S. (2005). Biology pathogenicity and diversity of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. (Tesis inédita de Maestría). University of Pretoria, Pretoria, Sudáfrica.
- Guerrero-Portilla, L (28 de agosto del 2014). Crearán red para estudio del Mal de Panamá. *Universidad de Costa Rica*. Recuperado de: <http://www.ucr.ac.cr/noticias/2014/08/28/crearan-red-para-estudio-del-mal-de-panama/imprimir.html>
- Hajek, A. (2004). *Natural Enemies. An Introduction to Biological Control*. United Kindom: Cambridge University Press. https://books.google.co.cr/books?id=6zNey_Cdl3UC&printsec=frontcover&dq=biological+control+types&hl=en&sa=X&redir_esc=y#v=onepage&q=biological%20control%20types&f=false
- Hammel, B. E., Grayum, M. H., Herrera, C., & Zamora, N (Eds). (2003a). Manual de Plantas de Costa Rica Volumen II: Gimnospermas y Monocotiledoneas (Agavaceae-Musaceae). Missouri, USA: Missouri Botanical Garden Press.
- Hammel, B. E., Grayum, M. H., Herrera, C., & Zamora, N. (Eds). (2003b). Manual de Plantas de Costa Rica Volumen III Monocotiledoneas (Orchidaceae-Zingiberaceae). Missouri, USA: Missouri Botanical Garden Press.
- Hernandez, C. E & Witter, S. G. (1996). Evaluating and Managing the Environmental Impact of Banana Production in Costa Rica. *A systems analysis approach*, 25(3), 171-178.

- Higgins, K. L., A. E. Arnold, J. Miadlikowska, S. D. Sarvate & F. Lutzoni. (2007). Phylogenetic relationships, host affinity, and geographic structure of boreal and arctic endophytes from three major plant lineages. *Molecular phylogenetics and evolution*, 42, 543-555.
- Ho, Y. N., Chiang, H. M., Chao, C. P., Su, C. C., Hsu, H. F., Guo, C. T., Hsieh, J. L. & Huang, C. C. (2015). In planta biocontrol of soilborne *Fusarium* wilt of banana through a plant endophytic bacterium, *Burkholderia cenocepacia* 869T2. *Plant and Soil*, 387, 295–306.
- Höper, H. Steinberg, C. & Alabouvette, C. (1995). Involvement of clay type and pH in the mechanisms of soil suppressiveness to *Fusarium* wilt of flax. *Soil Biology and Biochemistry*, 27 (7), 955-967. Recuperado de: https://www.researchgate.net/profile/Christian_Steinberg4/publication/223032571_Involvement_of_clay_type_and_pH_in_the_mechanisms_of_soil_suppressiveness_to_Fusarium_wilt_of_flax/links/5581566b08aed40dd8cd60f0.pdf
- Hu, X., Webster, G., Xie, L., Yu, Ch., Li, Y & Liao, X. (2013). A new mycoparasite, *Aspergillus* sp. ASP-4, parasitizes the sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Crop Protection*, 54, 15-22
- Hufbauer, R. A & Roderick, G. K. (2005). Microevolution in biological control: Mechanisms, patterns, and processes. *Biological Control*, 35, 227-239. Recuperado de: <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.535.9001&rep=rep1&type=pdf>
- Hwang, S. C & Ko, W, H. (2004). Cavendish Banana Cultivars Resistant to *Fusarium* Wilt Acquired through Somaclonal Variation in Taiwan. *Plant Disease*, 88 (6), 580-588.
- Jurriaans, K. J. (23 de Diciembre del 2014). FAO and partners call for a global response to deadly banana disease. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. Recuperado de: <http://www.fao.org/news/story/en/item/271647/icode/>
- Karlsson, M., Atanasova, L., Jensen, D. F., & Zeilinger, S. (2017). Necrotrophic mycoparasites and their genomes. *Microbiology Spectrum*, 5(2). doi:10.1128/microbiolspec.FUNK-0016-2016.
- Kloepper, J. & Ryu C. M. (2006). Bacterial Endophytes as Elicitors of Induced Systemic Resistance. En: B. Schulz, C. Boyle, T. N. Sieber (Eds.), *Microbial Root Endophytes*. (pp. 33-52). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag
- Kress, W. J & C. D, Specht. (2006). The evolutionary and biogeographic origin and diversification of the tropical Monocot order Zingiberales. *Aliso*, 22, 619-630.
- Kress, W. J., Prince, L. M., Hahn, W. J., & Zimmer, E. A. (2001). Unraveling the evolutionary radiation of the families of the Zingiberales using morphological and molecular evidence. *Systematic Biology*, 50, 926-944.

- Kumar, S., Kaushik, N., Edrada-Ebel, R., Ebel, R. & Proksch, P. (2008). Endophytic fungi for pest and disease management. *En A. Ciancio & G. Mukerji (eds.), Integrated Management of Diseases Caused by Fungi. Phytoplasma and Bacteria* (pp. 365-387). Netherlands: Springer
- Lecomte, C., Alabouvette, C. Edel- Hermann, V. Robert, F. & Steinberg, C. (2016). Biological control of ornamental plant diseases caused by *Fusarium oxysporum*: A review. *Biological Control*, 101, 17–30. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.004>
- Leslie, J. F., Summerell, B. A., & Bullock, S. (2006). *The Fusarium laboratory manual*. Iowa, USA: Wiley-Blackwell Pub. Recuperado de: <https://www.wiley.com/en-cr/The+Fusarium+Laboratory+Manual-p-9780813819198>
- Li, W. M., Dita, M., Wu, W., Hu, G. B., Xie, J. H. & Ge, X. J. (2015). Resistance sources to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 in banana wild relatives. *Plant Pathology*, 64, 1061-1067. doi: 10.1111/ppa.12340. Recuperado de: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/ppa.12340>
- Li, W. M., Li, C. Sun, J & Peng, M. (2017). Metabolomic, Biochemical and Gene Expression Analyses Reveal the Underlying Responses of Resistant and Susceptible Banana Species during Early Infection with *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Plant Disease*, 101(4), 534-543. Recuperado de: http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-09-16-1245_RE.
- Lins, S. R. O & Coelho, R. S. B. (2003). Ocorrência de Doenças em Plantas Ornamentais Tropicais no Estado de Pernambuco. *Fitopatologia Brasileira*, 23(3), 332-335
- Lovelock, C. E., Wright, S. F., Clark, D. A., & Ruess, R. W. (2004). Soil stocks of glomalin produced by arbuscular mycorrhizal fungi across a tropical rain forest landscape. *Journal of Ecology*, 92, 278-287.
- Mahdavi, F. Sariah, M & Maziah, M. (2012). Expression of rice thaumatin-like protein gene in transgenic banana plants enhances resistance to fusarium wilt. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166, 1008-1019.
- Marburger, D. A., Venkateshwaran, M., Conley, S. P., Esker, P. D., Lauer, J. G., & Ané, J. M. (2015). Crop rotation and management effect on *Fusarium* spp. populations. *Crop Science*, 55(1), 365-376. Recuperado de: http://corn.agronomy.wisc.edu/Pubs/JL_JournalArticles/cs-55-1-365.pdf
- Marin, D. H., Sutton, T. B. & Barker, K. R., (1998). Dissemination of Banana in Latin America and the Caribbean and its relationship to the occurrence of *Radopholus similis*. *Plant Disease*, 82(9), 964-974. Recuperado de: <http://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PDIS.1998.82.9.964>

- Martínez Bolaños, L. (2015). *Mal de Panamá Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* FOCRT4. (Ficha Técnica No.2.) México: SENASICA. Recuperado de: https://www.researchgate.net/publication/258032129_Mal_de_Panama_Fusarium_oxysporum_Fsp_cubense_FOCRT4_Ficha_Tecnica_No2_Mexico.
- Maryani, M., Lombard, L., Poerba, Y.S., Subandiyah, S., Crous, P. W. & Kema G.H.J. (2018). Phylogeny and genetic diversity of the banana *Fusarium* wilt pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* in the Indonesian centre of origin. *Studies in Mycology*. doi: 10.1016/j.simyco.2018.06.003.
- Mejia, L. C., Rojas, E. I., Maynard, Z., Van Bael, S., Arnold, A. E., Hebbar, P., Samuels, G., Robbins, N., Herre, E. A. (2008). Endophytic fungi as biocontrol agents of *Theobroma cacao* pathogens. *Biological Control*, 46, 4-14.
- Meldrum, R. E., Daly, A. M., Tran-Nguyen, L. T. T. & Aitken, E. A. B. (2013). The effect of surface sterilants on spore germination of *Fusarium oxysporum* f. sp. *ubense* tropical race 4. *Crop protection*, 54, 194-198. Recuperado de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2013.08.014>.
- Narayan, C. P., Kim, W. K., Woo, S. K., Park, M. S. & Yu, S. H. (2007). Fungal endophytes in roots of *Aralia* species and their antifungal activity. *Plant Pathology Journal*, 23(4), 287-294.
- Nel, B., Steinberg, C. Labuschagne, N & Viljoen, A. (2007). Evaluation of fungicides and sterilants for potential application in the management of *Fusarium* wilt of banana. *Crop Protection*, 26(4), 697-705. Recuperado de: http://www.researchgate.net/profile/Nico_Labuschagne/publication/222425972_Evaluation_of_fungicides_and_sterilants_for_potential_application_in_the_management_of_Fusarium_wilt_of_banana/links/02bfe50f91442b8309000000.pdf.
- O' Donnell, K., Kistler, H. C., Cigelnik, E. & Ploetz, R. C. (1998). Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panamá disease of banana: Concordant evidence for nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95, 2044-2049.
- Organización para Estudios Tropicales. (2007). *Lista de plantas vasculares Estación Biológica La Selva, OET Sarapiquí, Costa Rica: Proyecto Flora Digital de La Selva. 1*. Costa Rica: OET. Recuperado de www.oet.ac.cr/floradigital.
- Peng, H.X., Sivasithamparam, K. & Turner, D. W. (1999). Chlamydospore germination and *Fusarium* wilt of banana plantlets in suppressive and conducive soils are affected by physical and chemical factors. *Soil Biology and Biochemistry*, 31, 1363-1374.

- Pereira, J. O., Carneiro-Vieira, M.L. & Azevedo, J. L. (1999). Endophytic fungi from *Musa acuminata* and their reintroduction into axenic plants. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 15, 37-40.
- Pérez Salas, R. A., Tapia Fernández, A. C., Soto, G. & Benjamín, T. (2013). Efecto del Bio-carbón sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* y el desarrollo de plantas de banano (*Musa* AAA). *Intersedes*, XIV(27), 66-100.
- Pérez-Vicente, L., Dita, M. A. & Martínez-de la Parte, E. 2014. Technical Manual Prevention and diagnostic of *Fusarium* Wilt (Panama disease) of banana caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4 (TR4). Food and Agriculture Organization of The United Nations 47 (FAO). Prepared for the Regional Workshop on the Diagnosis of *Fusarium* Wilt (Panama disease).
- Perrier, X., De Langhe, E., Donohue, M., Lentfer, C., Vrydaghs, L., Bakry, F., ... & Lebot, V. (2011). Multidisciplinary perspectives on banana (*Musa* spp.) domestication. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(28), 11311–11318.
- Ploetz, R. C. (2005). Panama disease, an old nemesis rears its ugly head: Part 1, the beginnings of the banana export trades. *Plant Health Progress*. doi:10.1094/PHP-2005-1221-01-RV.
- Ploetz, R. C. (2006). *Fusarium* wilt of banana is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology*, 96(6), 653-656. Recuperado de: <https://apsjournals.apsnet.org/doi/pdf/10.1094/PHYTO-96-0653>
- Ploetz, R. C. (2015). Management of *Fusarium* wilt of banana: a review with special reference to tropical race 4. *Crop protection*, 73, 7-15.
- Ploetz, R., Freeman, S., Konkol, J., Al-Abed, A., Naser, Z., Shalan, K., Barakat, R. & Israeli, Y. (2015). Tropical race 4 of Panama disease in the Middle East. *Phytoparasitica*, 43(3), 283-293. doi 10.1007/s12600-015-0470-5
- Portal, N., Soler, A., Alphonsine, P. A. M., Borrás-Hidalgo, O., Portieles, R., Peña-Rodríguez, C., ... & Santos, R. (2018). Nonspecific toxins as components of a host-specific culture filtrate from *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* race 1. *Plant pathology*, 67(2), 467-476.
- Poveda-Vega, L., Brenes-Gamboa, S., Guzmán-Quesada, M. & Tapia-Fernandez, A. (2013). Valoración de algunos productos para el control del Mal de Panamá en el cultivo de coco (*Musa* sp. (AAA) subgrupo Gros Michel). *Intersedes*, XIV(29), 81-94.
- Price, N. S. (1995). The origin and development of banana and plantain cultivation. En: Gowen, S. (Ed.). *Bananas and plantains*. (pp. 1-13). Netherlands: Springer. Recuperado de: http://link.springer.com/chapter/10.1007/978-94-011-0737-2_1

- Ramírez Céspedes, Tapia Fernandez & Brenes Gamboa, S. (2010). Desarrollo del ciclo productivo y ubicación geográfica del banano de altura que se produce en el cantón de Turrialba, Costa Rica. *Revista Intersedes*, *XI*(20), 96-113
- Samuels, G. J., Thomas, S. E. & Evans, H. C. (2006). *Trichoderma* endophytes of sapwood. *Mycological Society of America Abstracts*, *57*(4), 1-34.
- Santamaría, J & P, Bayman. (2005). Fungal Epiphytes and Endophytes of Coffee Leaves (*Coffea arabica*). *Microbial Ecology*, *50*, 1-8.
- Savazzini, F., Longa, C. M. O., & Pertot, I. (2009). Impact of the biocontrol agent *Trichoderma atroviride* SC1 on soil microbial communities of a vineyard in northern Italy. *Soil biology and biochemistry*, *41*(7), 1457-1465.
- Schippers, B., & Old, K. M. (1974). Factors affecting chlamydospore formation by *Fusarium solani* f. *cucurbitae* in pure culture. *Soil Biology and Biochemistry*, *6*(3), 153-160.
- Selvaraj, S., Ganeshamoorthi, P., Anand, T., Raguchander, T., Seenivasan, N., & Samiyappan, R. (2014). Evaluation of a liquid formulation of *Pseudomonas fluorescens* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and *Helicotylenchus multicinctus* in banana plantation. *BioControl*, *59*, 345–355. doi: 10.1007/s10526-014-9569-8.
- Shen, Z., Penton, C. R., Lv, N., Xue, C., Yuan, X., Ruan, Y., ... & Shen, Q. (2018). Banana fusarium wilt disease incidence is influenced by shifts of soil microbial communities under different monoculture spans. *Microbial ecology*, *75*(3), 739-750.
- Shivas, R. G., Wood, P. M., Darcey, M. W., & Peg, K. G. (1995). First record of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* on Cavendish bananas in Western Australia. *Australasian Plant Pathology*, *24*(1), 38-43. Recuperado de: <https://link.springer.com/article/10.1071/APP9950038>
- Siamak, S. B., & Zheng, S. (2018). Banana *Fusarium* wilt (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) control and resistance, in the context of developing wilt-resistant bananas within sustainable production systems. *Horticultural Plant Journal*, *4*(5), 208-218. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468014118301948>
- Sivamani, E. & Gnanamanickam, S. S. (1988). Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* in banana by inoculation with *Pseudomonas fluorescens*. *Plant and Soil*, *107*, 3-9
- Sivamani, E. & Gnanamanickam, S. S. (1988). Biological control of *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* in banana by inoculation with *Pseudomonas fluorescens*. *Plant and Soil*, *107*, 3-9.
- Sivasithamparam, K. & Ghisalberti, E. L. (2002). Secondary metabolism in *Trichoderma* and *Gliocladium*. En: E. Harman (Eds.), *Trichoderma & Gliocladium, Volume 1: Basic biology, taxonomy and genetics* (pp. 139-180). United Kingdom: Taylor and Francis Ltd..

- Smith, M. K., Langdon, P. W., Pegg, K. G. & Daniells, J. W. (2014). Growth, yield and *Fusarium* wilt resistance of six FHIA tetraploid bananas (*Musa* spp.) grown in the Australian subtropics. *Scientia Horticulturae*, 170, 176-181.
- Soto-Morales, E. G. (17 de agosto 2014). El banano y la piña son los productos más dinámicos del sector agrícola. *El Financiero*. Recuperado de: http://www.elfinancierocr.com/economia-y-politica/Exportaciones-Camara_de_Agricultura-pina-banano-cafe-Procomer_0_573542675.html.
- Steinkellner, S., Mammerler, R. & Vierheilig, H. (2005). Microconidia germination of the tomato pathogen *Fusarium oxysporum* in the presence of root exudates, *Journal of Plant Interactions*, 1(1), 23-30, doi: 10.1080/17429140500134334.
- Subashri, R., Raman, G., & Sakthivel, N. (2013). Biological control of pathogens and plant growth promotion potential of fluorescent *Pseudomonads*. En Maheshwari, D. K. (Ed.), *Bacteria in Agrobiological Disease Management* (pp. 77-110). Berlin Heidelberg: Springer. doi: 10.1007/978-3-642-33639-3_4.
- Sudarma, I.M., Puspawati, N. M., Suniti, N, W. Wijaya, I. N. & Ngurah Bagus, I. G. (2015). Utilization of rhizosphere fungi to control *Fusarium oxysporum* f.sp. *capsici* in vitro. *International Journal of Bioscience and Biotechnology*, 2(2), 83-96. Recuperado de: <https://ojs.unud.ac.id/index.php/jbb/article/view/18167>.
- Sunil, C. D., Suresh, M. & Birendra, S. (2007). Evaluation of *Trichoderma* species against *Fusarium oxysporum* f. sp. *ciceris* for integrated management of chickpea wilt. *Biological Control*, 40, 118–127. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964406001691>.
- Swarupa, V., Ravishankar, K. V., & Rekha, A. (2014). Plant defense response against *Fusarium oxysporum* and strategies to develop tolerant genotypes in banana. *Planta*, 239(4), 735-751. Recuperado de: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00425-013-2024-8>
- Thangavelu, R. & Gupi, M. (2015). Field suppression of *Fusarium* wilt disease in banana by the combined application of native endophytic and rhizospheric bacterial isolates possessing multiple functions. *Phytopathologia Mediterranea*, 54(2), 241-252. Recuperado de: <http://www.fupress.net/index.php/pm/article/download/15160/15749>
- Thangavelu, R. & Mustafa, M. (2010). A Potential Isolate of *Trichoderma viride* NRCB1 and its mass production for the effective management of *Fusarium* wilt disease in banana. *Tree and Forestry Science and Biotechnology*, 4(2), 76-84. Recuperado de: https://www.academia.edu/24966883/A_Potential_Isolate_of_Trichoderma_viride_NRCB1

_and_its_Mass_Production_for_the_Effective_Management_of_Fusarium_Wilt_Disease_in_Banana.

- Thangavelu, R., Palaniswami, A. & Velazhahan, R. (2004). Mass production of *Trichoderma harzianum* for managing *Fusarium* wilt of banana. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 103(1), 259-263. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016788090300358X>.
- Tondje, P. R, Roberts, D. P., Bon, M. C., Widmer, T., Samuels, G. J., Ismaiel, A., Begoude, A. D., Tchana, T., Nyemb-Tshomb, E., Ndoumbe-Nkeng, M., Bateman, R., Fontem, D. & Hebbar, K. P. (2007). Isolation and identification of mycoparasitic isolates of *Trichoderma asperellum* with potential for suppression of black pod disease of cacao in Cameroon. *Biological control*, 43, 202-212. Recuperado de: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1049964407001879>.
- Ubaub, L. T. & Requina, J. D. (2016). Vesicular Arbuscular Mycorrhizae and *Trichoderma harzianum* as Biological Control Agents against Panama Disease of ‘Cavendish’ Banana Caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* Tropical Race 4. *Asian Research Journal of Agriculture*, 1(2), 1-11. Recuperado de: http://www.journalrepository.org/media/journals/ARJA_47/2016/Aug/Ubaub122016ARJA28386.pdf.
- Wang, Y., Xu, L., Ren, W., Zhao, D., Zhu, Y. & Wu, X. (2012). Bioactive metabolites from *Chaetomium globosum* an endophytic fungus in the medicinal plant *Curcuma wenyujin*. *Phytomedicine*, 19, 364-368.
- Wei, Y., Hu, W., Wang, Q., Zeng, H., Li, X., Yan, Y., Reiter, R. J., He, C. & Shi, H. (2017). Identification, transcriptional and functional analysis of heat-shock protein 90s in banana (*Musa acuminata* L.) highlight their novel role in melatonin-mediated plant response to *Fusarium* wilt. *Journal of pineal research*, 62(1), e12367. Recuperado de: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jpi.12367>.
- Whalley, W. M., & Taylor, G. S. (1973). Influence of pea-root exudates on germination of conidia and chlamydospores of physiologic races of *Fusarium oxysporum* f. *pisi*. *Annals of Applied Biology*, 73(3), 269–276. doi:10.1111/j.1744-7348.1973.tb00933.x. Recuperado de: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1744-7348.1973.tb00933.x>.
- Zaferanloo, B., Virkar, A., Mahon, P. J., & Palombo, E. A. (2013). Endophytes from an Australian native plant are a promising source of industrially useful enzymes. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 29(2), 335-345, doi: 10.1007/s11274-012-1187-y. Recuperado de: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11274-012-1187-y>.

Zheng, S. J., García-Bastidas, F. A., Li, X., Zeng, L., Bai, T., Xu, S., ... & Yang, L. (2018). New Geographical Insights of the Latest Expansion of *Fusarium oxysporum* f.sp. *ubense* Tropical Race 4 Into the Greater Mekong Subregion. *Frontiers in plant science*, 9, 457. Recuperado de: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2018.00457/full>.

Anexos



Fig. A.1: Prueba con endófito 5.4A.

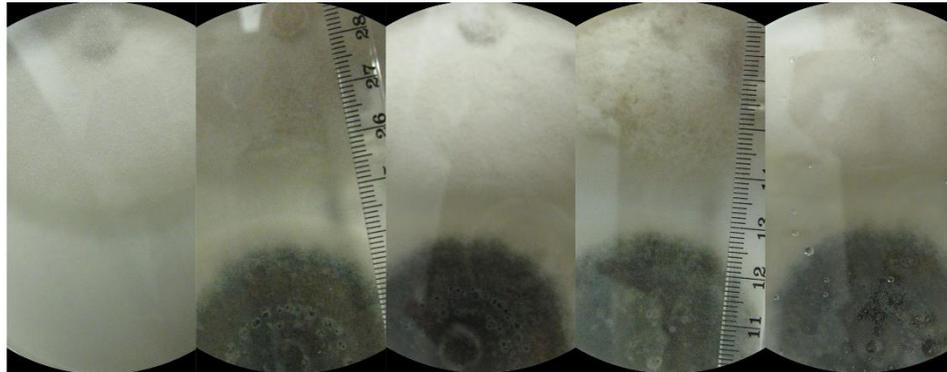


Fig. A.2: Prueba con endófito 17.1.

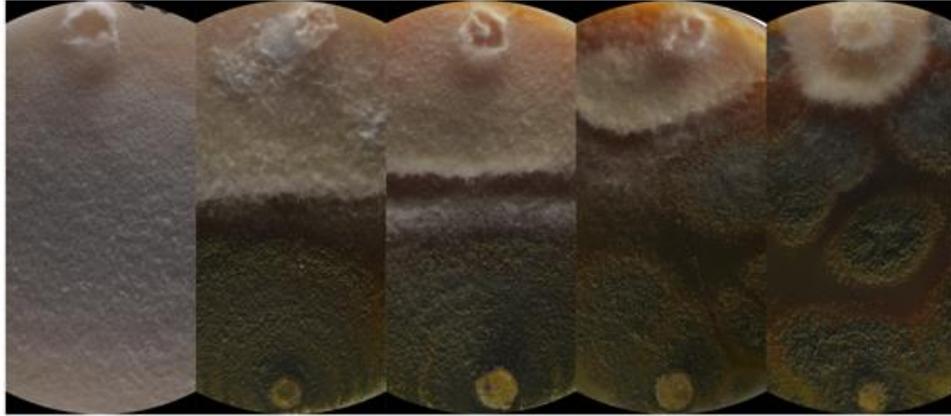


Fig. A.3. Prueba con endófito 3.5.

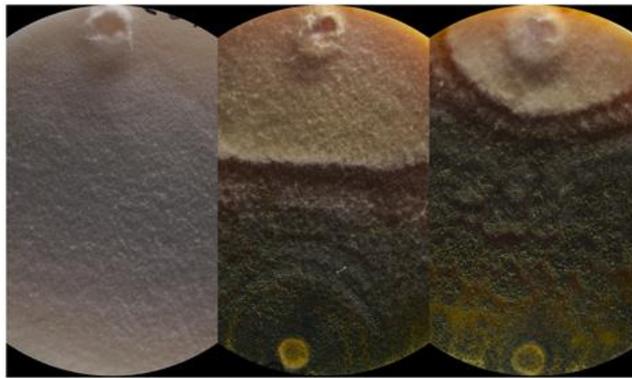


Fig. A.4. Prueba con endófito 4.4.

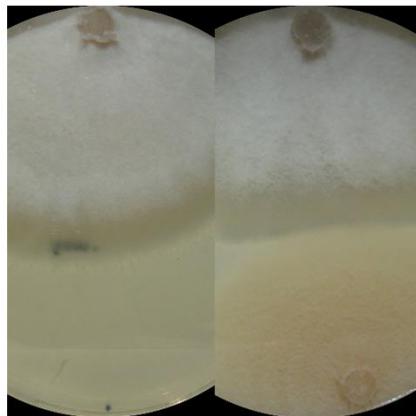


Fig. A.5. Prueba con endófito 9.3B.

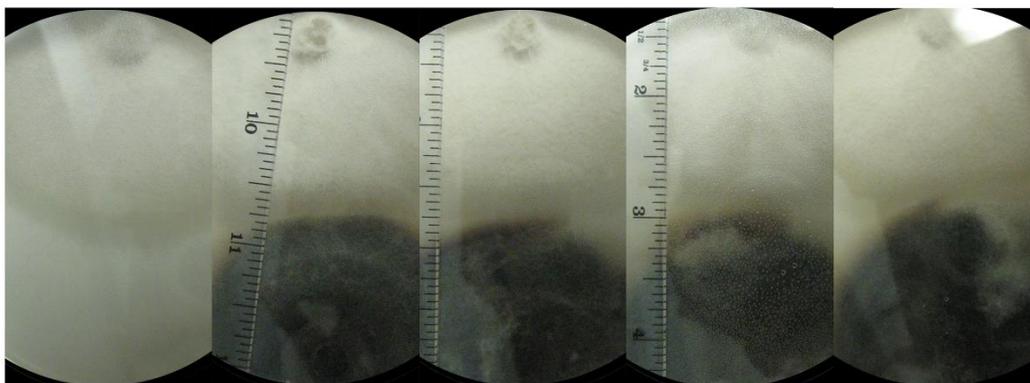


Fig. A.6. Prueba con endófito 10.1.

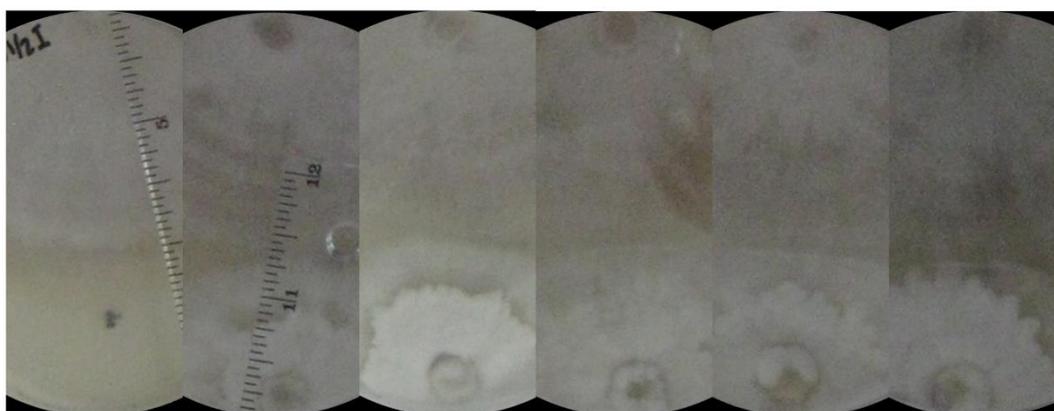


Fig. A.7. Prueba con endófito 6.1.

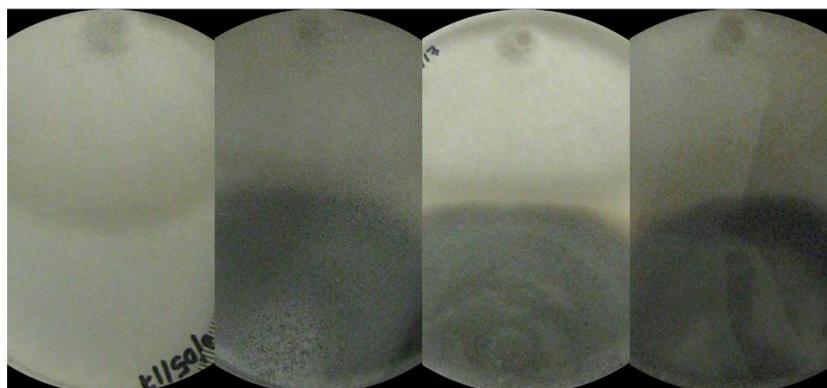


Fig. A.8. Prueba con endófito 10.1B.



Fig. A.9. Prueba con endófito 7.4.

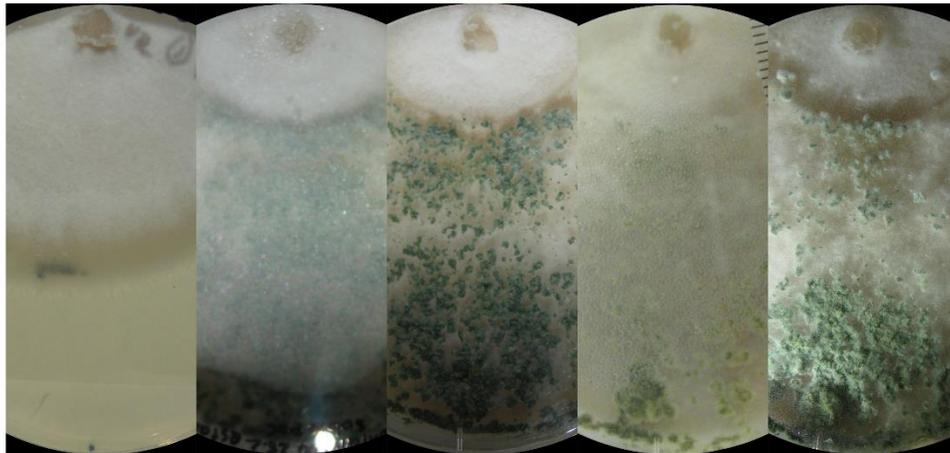


Fig. A.10. Prueba con endófito 28.2.

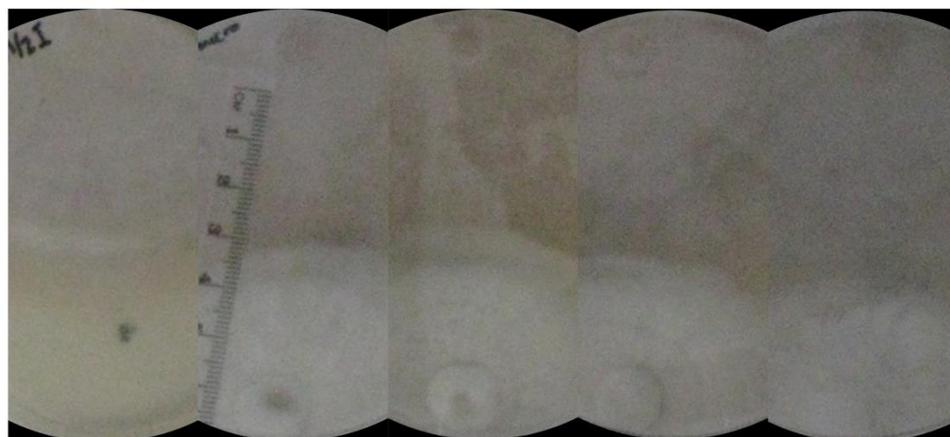


Fig. A.11. Prueba con endófito 6.3.

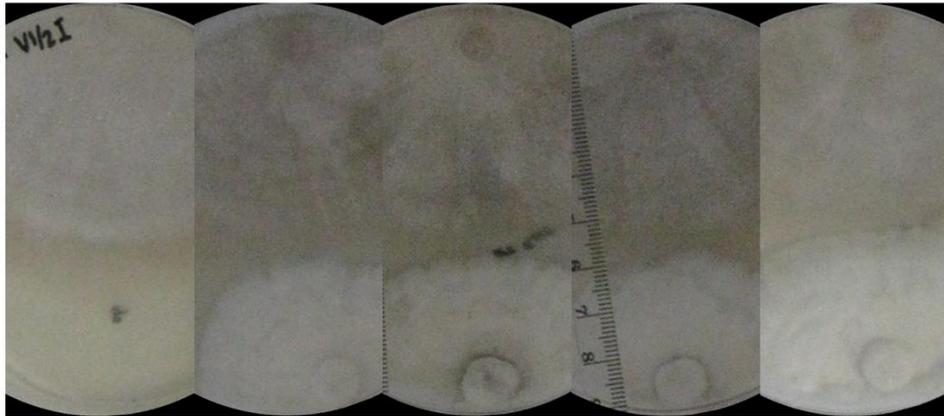


Fig. A.12. Prueba con endófito 6.4.

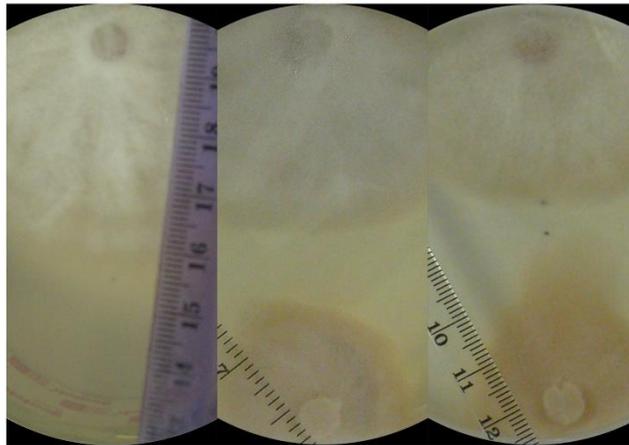


Fig. A.13. Prueba con endófito 2.3.

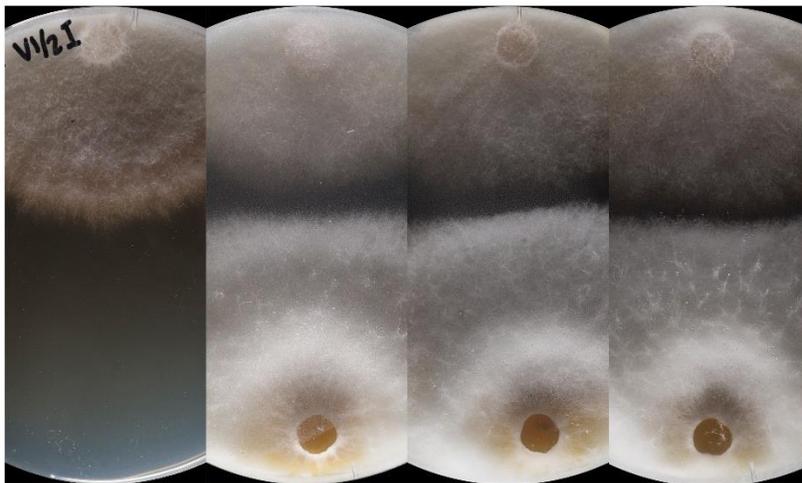


Fig. A.14. Prueba con endófito 9.2AN.

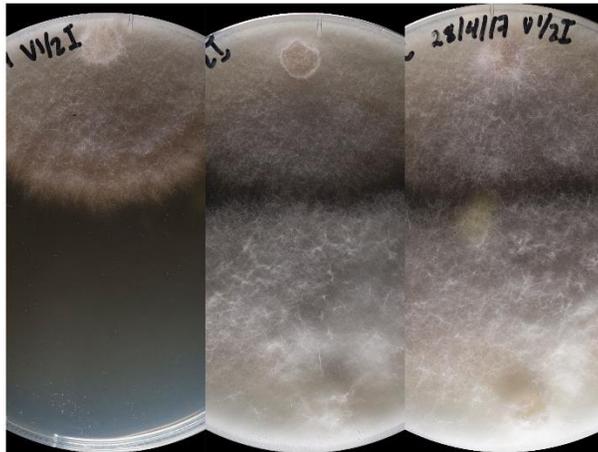


Fig. A.15. Prueba con endófito 9.2AB.

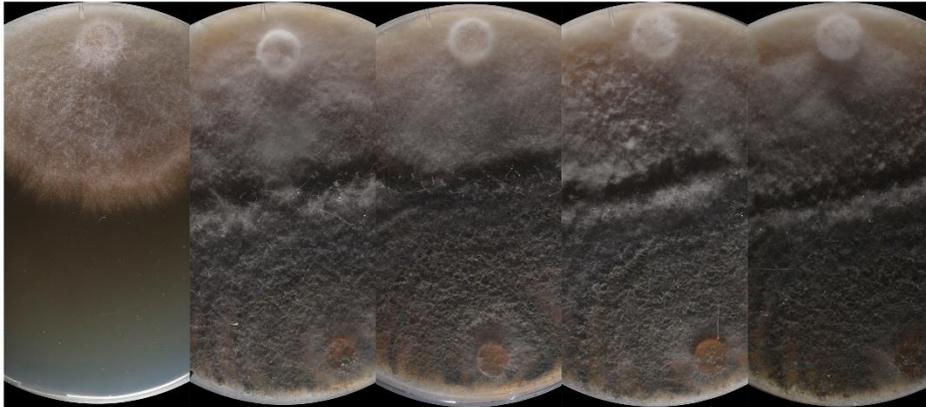


Fig. A.16. Prueba con endófito 9.3A.

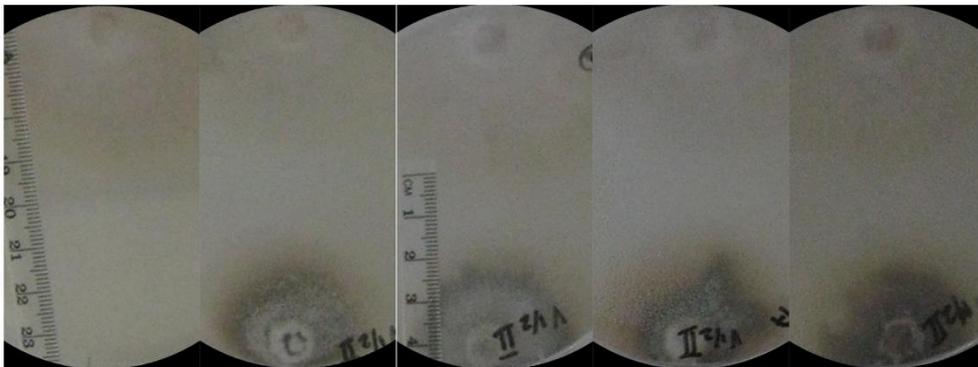


Fig. A.17. Prueba con endófito 21.4.

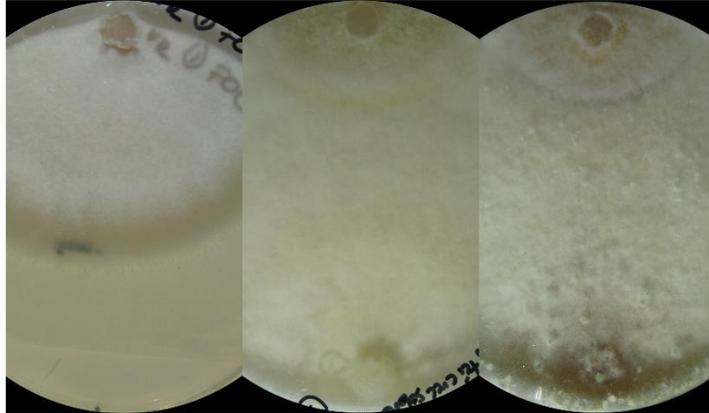


Fig. A.18. Prueba con endófito 10.3A.

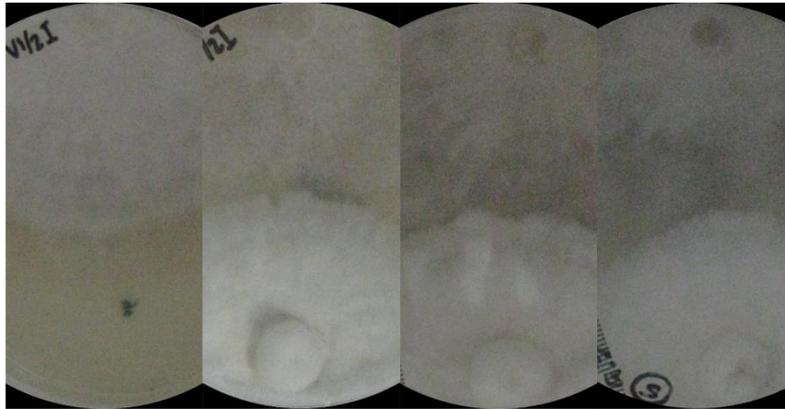


Fig. A.19. Prueba con endófito 9.3.

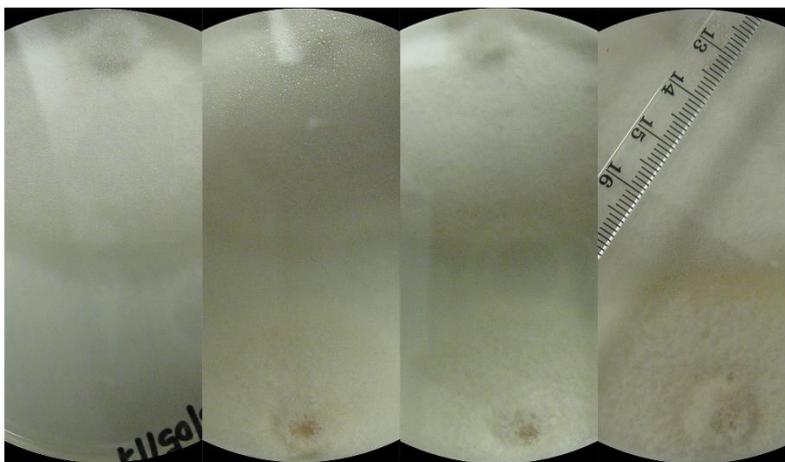


Fig. A.20. Prueba con endófito 10.2A.

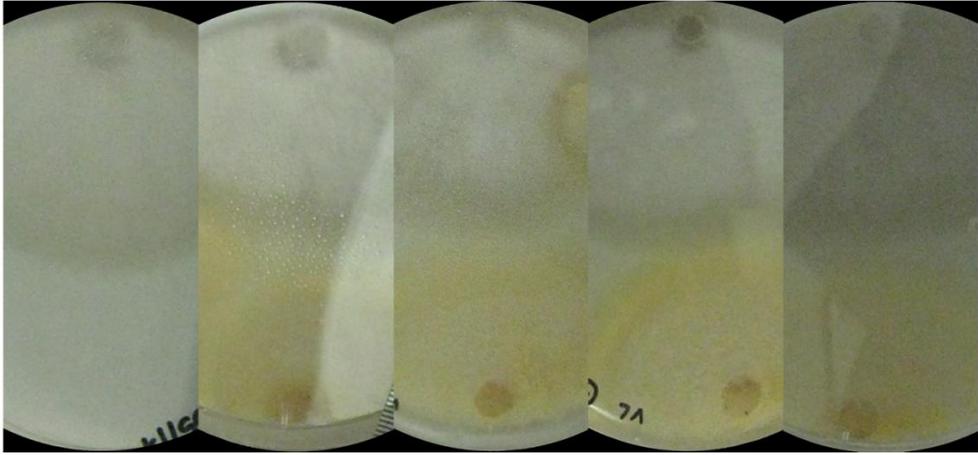


Fig. A.21. Prueba con endófito 15.5A.

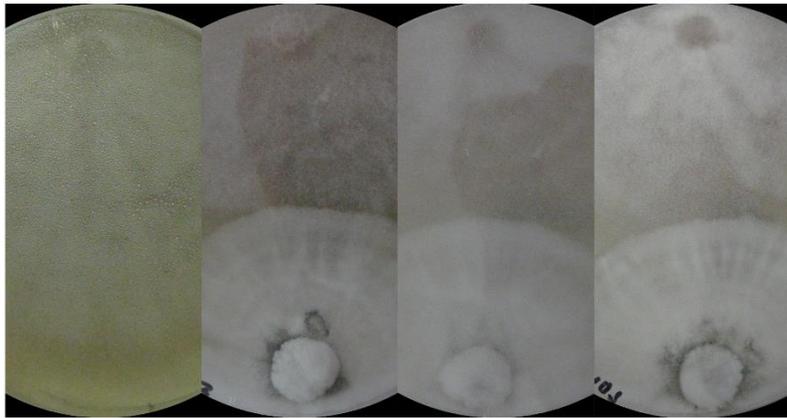


Fig. A.22. Prueba con endófito 17.2.

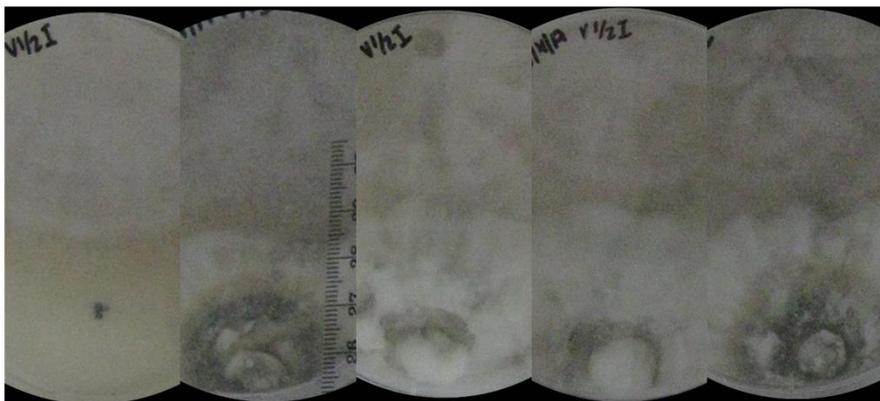


Fig. A.23. Prueba con endófito 18.4.

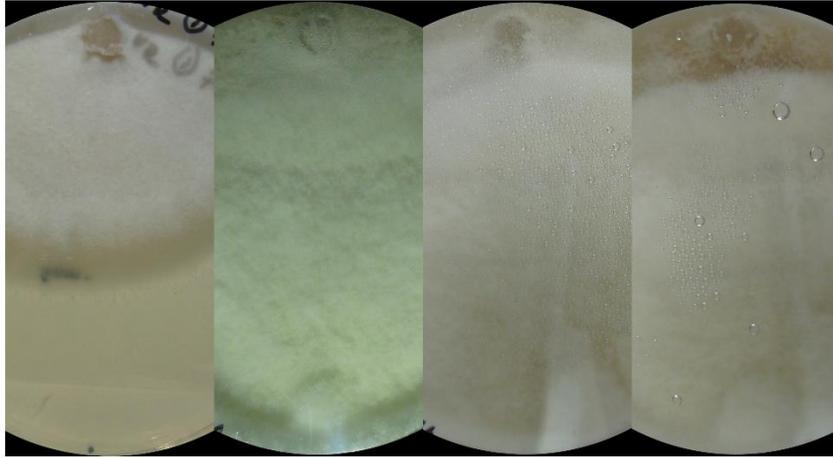


Fig. A.24. Prueba con endófito 23.4.

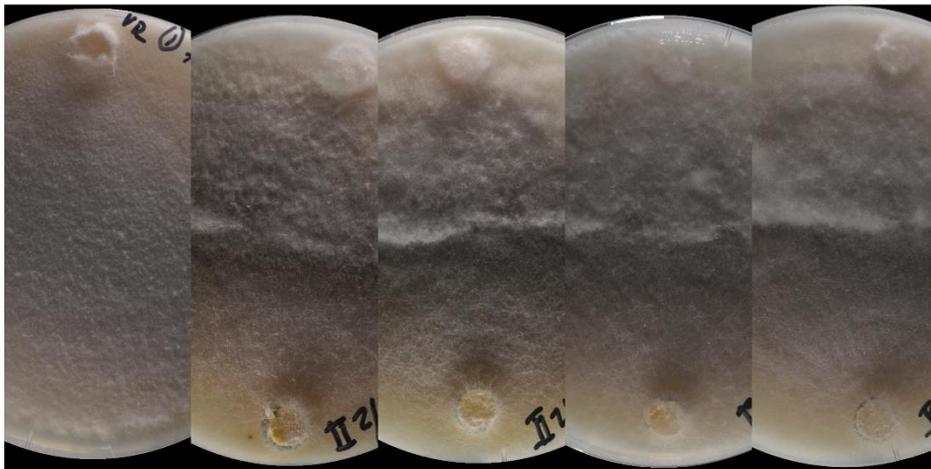


Fig. A.25. Prueba con endófito 22.3.

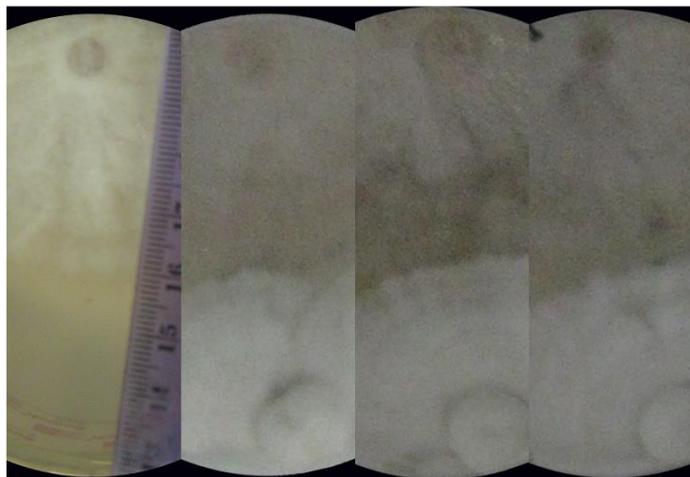


Fig. A.26. Prueba con endófito 19.3.

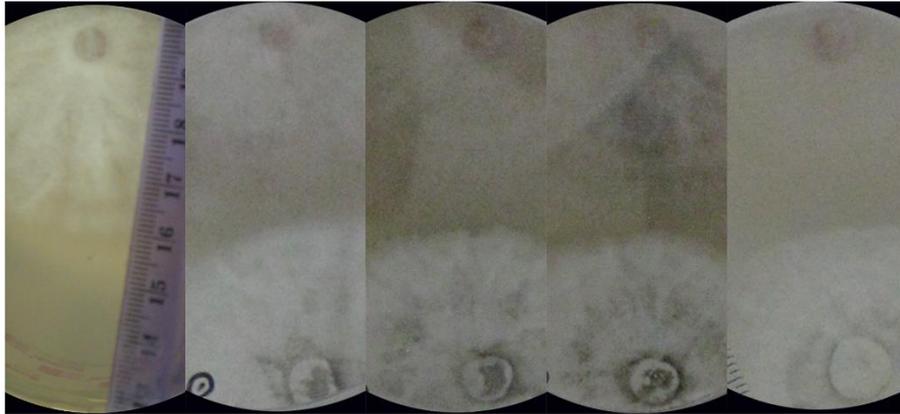


Fig. A.27. Prueba con endófito 19.4.

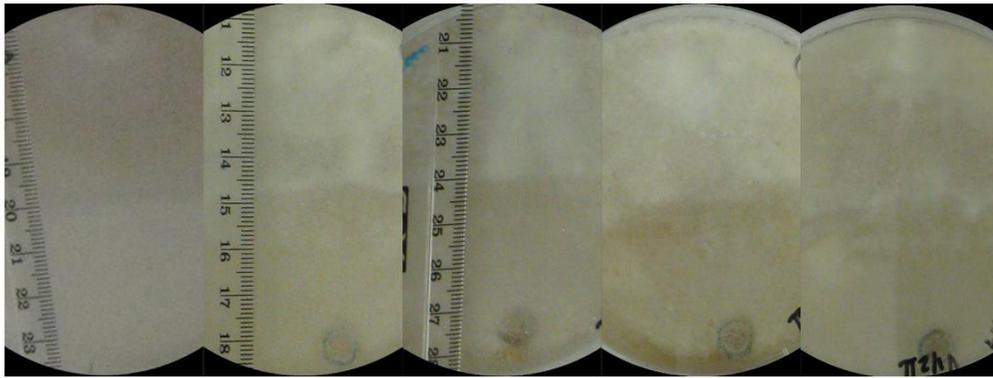


Fig. A.28: Prueba con endófito 28.3.

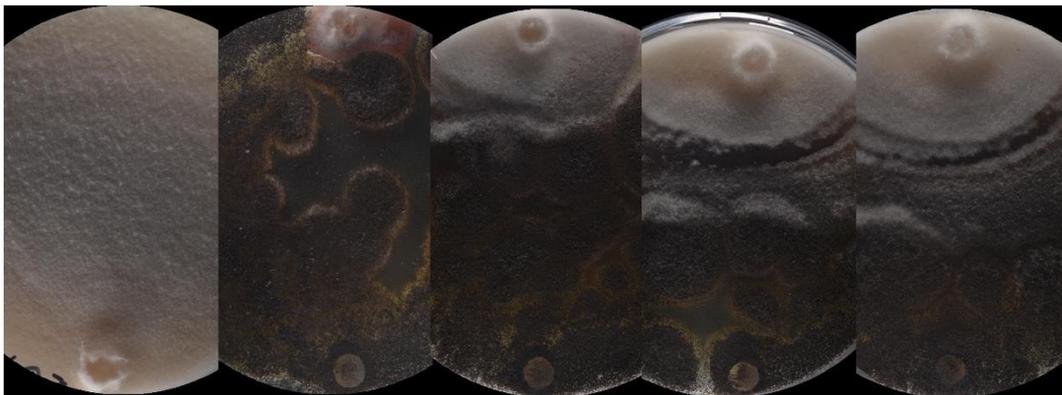


Fig. A.29: Prueba con endófito 9.4.