

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE NICARAGUA- LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS Y TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE AGROECOLOGIA**



**TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE:
INGENIERO EN AGROECOLOGIA TROPICAL**

Uso de aislamientos de *Trichoderma* spp., para el control biológico de la enfermedad Marchitez por *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f.sp *cubense*) raza 1 en vitroplántulas de banano del cultivar Gros Michael (AAA) y FHIA 17 (AAAA) en condiciones de invernadero.

AUTOR:

Br: William José Blanco Blanco.

Tutor: M.Sc.: Álvaro Caballero.

Asesor: M.Sc.: Juan Castellón

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a JEHOVA DIOS, por darme la fuerza y sabiduría necesaria para superar esta etapa de mi vida.

A mi madre Flora Esperanza Blanco Berrios quien ha sido pilar fundamental de mi vida y gracias a ella culmine mis estudios superiores.

Todos los obstáculos que enfrente durante todos estos años.

A mi sobrina Lizbeth Guadalupe Rodríguez Blanco por su ternura.

A los compañeros con los que compartí todos estos años.

AGRADECIMIENTO

Al proyecto Musáceas de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua (UNAN- León), que ejecuta proyectos en coordinación con Bioversity Internacional por haber financiado este estudio.

A mis padres por haberme dado su apoyo incondicional en todo momento.

A mi tutor M.Sc. Álvaro Caballero por compartir sus conocimientos en este estudio.

A mi Asesor: M.Sc. Juan Castellón por su apoyo brindado.

A la profesora Noelia Navas por innegable ayuda.

Al profesor Luis Moreno por su aporte en esta investigación

A mi amiga Andrea Darce por su amistad y contribuir en lo que necesitaba en la investigación.

ÍNDICE GENERAL

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTO	II
RESUMEN	VI
INDICE DE TABLAS	VII
INDICE DE CUADROS	VIII
INDICE DE GRAFICOS	IX
INDICE DE FIGURAS	X
LISTA DE UNIDADES, ABREVIATURAS Y SIGLAS	XI
I.INTRODUCCION	1
II. OBJETIVOS	2
Objetivo General	2
Objetivos Específicos	2
III. HIPOTESIS	3
IV. MARCO TEORICO	4
4.1 Importancia del cultivo de banano (Musa spp.)	4
4.2 Descripción Botánica	5
4.3 Ecología del Banano	5
4.3.1 Húmedad	5
4.3.2 Viento	6
4.3.3 Suelo	6
4.3.4 pH	6

4.4 Historia, importancia y distribución de la enfermedad Marchitez por <i>Fusarium</i> (<i>Fusarium oxysporum</i> f sp., <i>cubense</i>)	6
4.5. Caracterización de las razas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	7
4.6. Epidemiología de la enfermedad Marchitez por <i>Fusarium</i> agente causal <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cúbense</i>	7
4.7. Síntomas externos e internos de la enfermedad Marchitez por <i>Fusarium</i> .	7
4.8. Estrategias de manejo de la enfermedad Marchitez por <i>Fusarium</i> agente causal <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i> raza 1	8
4.8.1. Resistencia Genética	8
4.8.2 Control Biológico	8
V. MATERIALES Y MÉTODOS	10
5.1 Ubicación geográfica de la investigación	10
5.2 Material experimental	10
5.3 Aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f sp. <i>cubense</i>	10
5.3. Aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.	10
5.3.2 Material Vegetal	11
5.4 Diseño experimental	11
5.5 Cultivo y multiplicación de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	11
5.6 Cultivo y multiplicación de <i>Trichoderma</i> spp.	12
5.7 Esterilización del sustrato	12
5.8 Siembra en vasos plásticos	12
5.9 Preparación de la suspensión de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>.	12
5.10 Preparación de la suspensión de esporas de los <i>Trichoderma</i> spp.	13
5.11 Protección de vitroplantas con aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.	13

5.12 Inoculación de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i> a vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) y FHIA 17 (AAAA)	14
5.13 Evaluación de la incidencia y la severidad de la enfermedad	14
5.14 Métodos estadísticos.	15
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES	17
6.1 Caracterización morfológica de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>ubense</i>	17
6.2. Prueba de biocontrol	17
6.2.1 Porcentaje de índice de síntomas internos y externos	17
6.3 Variables de crecimiento	20
VII. CONCLUSIONES	25
7.1 Prueba de biocontrol	25
7.2 Promoción de crecimiento.	25
VIII. RECOMENDACIONES	26
IX. BIBLIOGRAFÍA	27
X. ANEXOS	30

RESUMEN

El objetivo de la presente investigación fue el uso de aislamientos de *Trichoderma spp.*, para el biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1. Se evaluaron dos aislamientos patogénicos FOC1 y FOC2. Los aislamientos de *Foc* fueron recolectados de plantaciones de Gros Michel (AAA) infectadas de la enfermedad Marchitez por *Fusarium* ubicada en la finca el Triunfo, Comunidad de Monterrey, Departamento de Jinotega, Nicaragua. Se procedió a evaluar la prueba de biocontrol con tres aislamientos de *Trichoderma spp.*, en vitroplantulas de Gros Michel (AAA) Y FHIA17 (AAAA) en condiciones de invernadero. En el bioensayo de biocontrol los tratamientos de FOC1 y FOC2 de la variedad de las vitroplantulas de Gros Michel (AAA) presentaron los primeros síntomas a la novena semana. Plantas protegidas con *Trichoderma spp.* Aumentaron el periodo de incubación de la enfermedad y la aparición de los síntomas externos en tres semanas en comparación con los otros tratamientos, presentando 22.22% de incidencia, tanto para la variedad Gros Michel (AAA) como para la variedad FHIA17 (AAAA) resultados similares a los testigos absolutos. Los *Trichoderma spp.*, T3 y T1 presentaron los promedios más altos en reducción de la decoloración del cormo con 16.67% para la variedad FHIA17 (AAAA) y la variedad Gros Michel (AAA). Con respecto a los parámetros de crecimiento no hubo diferencias significativas de los aislamientos de *Trichoderma spp.*, en las vitroplantulas de banano de Gros Michel (AAA) y FHIA 17 (AAAA). Sin embargo las vitroplantulas de FHIA 17 (AAAA) presentaron un crecimiento significativo con respecto a la vitroplantulas de Gros Michel (AAA) Consecuentemente el establecimiento de plántulas de banano de FHIA 17 (AAAA) en suelos infectados por *Foc* raza 1 en la Comunidades de Monterrey es una alternativa sostenible en los agroecosistemas bananeros donde plantaciones de Gros Michel (AAA) son susceptibles a la enfermedad que están siendo destruidas por completo.

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Efectos de <i>Trichoderma</i> spp., sobre los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> sobre el porcentaje de índice de síntomas externos, índice de síntomas internos y porcentaje de incidencia en las variedades de banano de Gros Michel (AAA) Y FHIA17 (AAAA) en condiciones de invernadero durante la semana 14.....	19
Tabla 2. Efecto de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 1 y <i>Trichoderma</i> spp., en los parámetros de crecimiento del cultivar de banano Gros Michel (AAA).....	20
Tabla 3. Efecto de los aislamientos de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> raza 1 y <i>Trichoderma</i> spp., en los parámetros de crecimiento del cultivar de banano FHIA17. (AAAA).....	21

INDICE DE CUADROS

Cuadro1. Escala de evaluación de síntomas provocados por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	13
Cuadro2. Aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.,.....	17
Cuadro 3. Variables evaluadas en el bioensayo de patogenicidad.....	18

INDICE DE GRAFICOS

Gráfico 1. Porcentaje de Incidencia de Marchitez por Fusarium (<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>cubense</i>) en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) en catorce semanas de evaluación.....	18
Gráfico 2. Porcentaje de Incidencia de Marchitez por Fusarium (<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>) en vitroplantas de banano del cultivar FHIA17 (AAAA) en catorce semanas de evaluación.....	18
Gráfico 3. Efecto de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp., en el porcentaje de la decoloración del corno causado por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA).....	22
Gráfico 4. Efecto de los aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp., en el porcentaje de la decoloración del corno causado por <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i> en vitroplantas de banano del cultivar FHIA17(AAAA).....	23

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Descripción botánica de la planta de banano.....	5
Figura 2. Preparación de la suspensión de esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>cubense</i>	12
Figura 3. Protección de vitroplantas con aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp.,.....	13
Figura 4. Plantas del cultivar Gros Michel (AAA) protegidas con aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp., e inoculadas con <i>Foc</i>	22
Figura 5. Planta de banano del cultivar Gros Michel (AAA) inoculada con <i>Foc</i> presentando síntomas de la enfermedad.....	22
Figura 6. Planta del cultivar FHIA17 (AAAA) protegidas con aislamientos de <i>Trichoderma</i> spp., e inoculadas con <i>Foc</i>	22
Figura 7. Planta de banano del cultivar FHIA17 (AAAA) inoculada con <i>Foc</i> presentando síntomas de la enfermedad.....	22

LISTA DE UNIDADES, ABREVIATURAS Y SIGLAS

UFC: Unidades Formadoras de Colonias

PDA: Papa Dextrosa de Agar

Foc: *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense*, Marchitez por Fusarium

FOC: Tratamiento del estudio

PDA 10% = 3.9 gr de Papa Dextrosa de Agar + 5 gr de agar

PDA 100% = 39 gr de Papa Dextrosa de Agar + 15 gr de agar

T1: Trichoderma 1

T2: Trichoderma 2

T3: Trichoderma 3

F1: Fusarium 1

F2: Fusarium 2

I.INTRODUCCION

El banano es uno de los principales cultivos dentro de los sistemas de producción agrícola en más de 120 países, donde constituye un alimento importante en la dieta básica de 400 millones de personas; con una producción de 104 millones de toneladas al año, en aproximadamente 10 millones de ha (Frison y Sharrock 1998; FAO 2004). La enfermedad Marchitez por Fusarium, causado por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* (*Foc*), es considerada una de las enfermedades más destructivas registradas en la historia; reportándose en Australia en 1874 y en 1910 en América Latina y el Caribe (Moore *et al.*, 1995).Durante el período de 1910 a 1950, plantaciones comerciales de banano Gros Michel (AAA) fueron la base de exportaciones de América Latina y el Caribe, pero la destrucción de sus plantaciones fue causada por la marchitez por Fusarium (*Foc*) raza 1, provocando el abandono y la desaparición de más de 80,000 ha (Hwang *et al.*, 2004; Pérez-Vicente 2004). Esto condujo a la adopción del clon Robusta (subgrupo Cavendish, AAA) en la década de 1950 y 1960, por su resistencia a *Foc* raza 1 (Moore *et al.*, 1995).

No existen medidas de combate químico eficientes de la enfermedad Marchitez por Fusarium (Pocasangre 2010). Prácticas culturales como la inundación y rotación de cultivos tampoco han permitido reducir su incidencia y severidad (Moore *et al.*, 1995) ni buenas prácticas culturales que reduzcan su incidencia y severidad. Debido a esto la presente investigación tiene como finalidad evaluar la utilización de los aislamientos de *Trichoderma* spp., para el manejo biológico de la enfermedad Marchitez por Fusarium causado por *Foc*, en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) y FHIA 17 (AAAA) en condiciones de invernadero.

II. OBJETIVOS

Objetivo General

- ✓ Evaluar el efecto de aislamientos de *Trichoderma* spp., para el combate biológico de la enfermedad Marchitez por Fusarium causado por *Fusarium oxysporum* f. sp., *ubense* raza 1 en vitroplántulas del cultivar Gros Michel (AAA) y FHIA 17 (AAAA) bajo condiciones de invernadero.

Objetivos Específicos

- ✓ Realizar prueba de biocontrol de la enfermedad Marchitez por Fusarium en vitroplantulas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) y FHIA 17 (AAAA) en condiciones de invernadero.
- ✓ Comparar el efecto de *Trichoderma* spp., sobre los parámetros de crecimiento vegetativo de las vitroplántulas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) y FHIA 17 (AAAA) en condiciones de invernadero.

III. HIPOTESIS

Ho: Aislamientos de *Trichoderma* spp., tiene la capacidad de reducir los porcentajes de índices de síntomas externos e internos severos y muerte de la enfermedad Marchitez por Fusarium en las vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) y FHIA 17 (AAAA) en condiciones de invernadero.

Ha: Aislamientos de *Trichoderma* spp., no tiene la capacidad de reducir los porcentajes de índices de síntomas externos e internos severos y muerte de la enfermedad Marchitez por Fusarium en las vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) y FHIA 17 (AAAA) en condiciones de invernadero.

Ho: Aislamientos de *Trichoderma* spp., tienen la capacidad de promover los parámetros de crecimiento vegetativo de las vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) y FHIA 17 (AAAA) en condiciones de invernadero.

Ha: Aislamientos de *Trichoderma* spp., no tienen la capacidad de promover los parámetros de crecimiento vegetativo de las vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) y FHIA 17 (AAAA) en condiciones de invernadero.

IV. MARCO TEORICO

4.1 Importancia del cultivo de banano (*Musa spp.*)

El cultivo de banano se ha establecido en más de 120 países, es el cuarto cultivo alimentario más importante del mundo, después del arroz, el maíz y el trigo; siendo ésta la fruta más exportada del mundo (FAO 2004; FAO 2009). Durante el año 2000 y 2001 se cultivaron 9 millones de hectáreas, con una producción de 92 a 99 millones de toneladas anuales, y en el año 2008 se cosecharon 10 millones de hectáreas, con una producción de 104 millones de toneladas, esto equivale a 4500 y 5000 millones de dólares americanos anuales en comercio internacional (FAO 2004; FAO 2009; IITA 2008).

Los productos que pueden elaborarse a partir de banano son varios tales como: harina, almidón, rebanados, tostones, hojuelas, pan, vino, lo cual le dan mayor valor agregado e importancia por su calidad de fruta en cuanto a sabor y aroma el cultivar que sobresale es Gros Michel (AAA). Plantaciones de Gros Michel (AAA) fueron la base de las exportaciones comerciales de banano entre los años 1960 a 1990 (Simmonds 1997). Pero fue excluida de las producciones para exportación por su alta susceptibilidad a la enfermedad Mal de Panamá causado por *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense* raza 1 (Simmonds 1997; Soto 2008). Por el cultivar Cavendish (AAA) mostrando mayor resistencia a esta raza 1 de *Foc* pero no así a la raza tropical 4 de *Foc* que no se ha registrado en América Latina y el Caribe (Ploetz 2006).

4.2 Descripción Botánica

El banano *Musa spp.*, es una planta monocotiledónea, perteneciente a la familia Musáceas y de orden Escitamiéneas o Zingiberales (León 2000; Ortiz *et al.*, 2001). Banano se aplica a cultivares cuya fruta es de pulpa suave y se come fresca, como el Gros Michel (AAA) y Cavendish (AAAA) siendo triploides de *Musa acuminata* pura (AAA) (León 2000; Ortiz *et al.*, 2001).

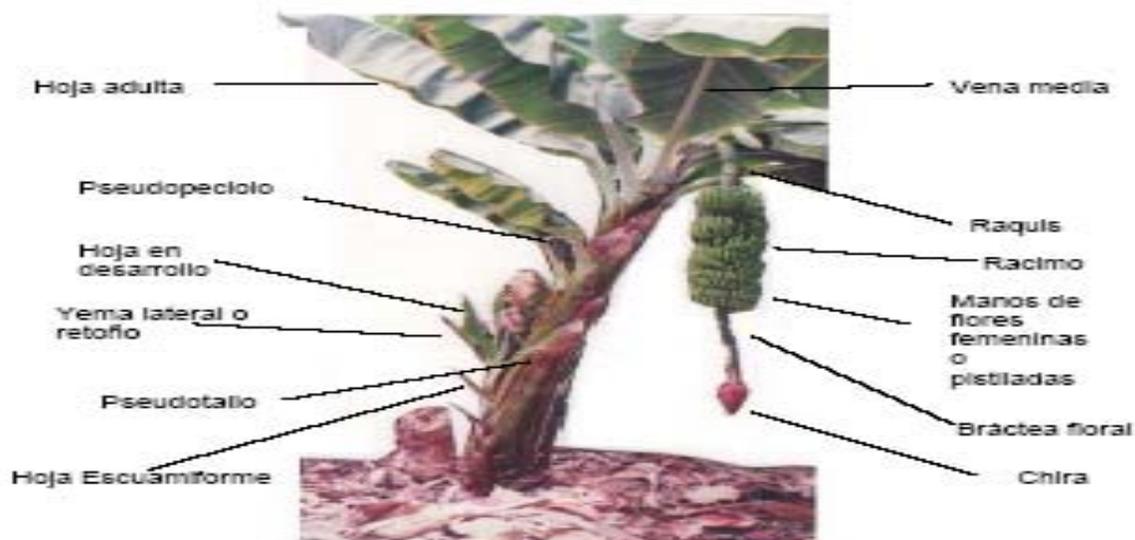


Figura 1: Descripción botánica de la planta de banano. (Darce 2012).

4.3 Ecología del Banano

4.3.1 Húmedad

Las condiciones óptimas para el cultivo de banano se dan en las regiones tropicales húmedas y cálidas, donde las plantas presentan un crecimiento continuo, cuya inflorescencia aparece cuando se detiene la producción de hojas y raíces. La luz, la temperatura y la reserva de agua son determinantes, así como un buen contenido de nutrimentos. La planta se sitúa entre los 30° latitud norte y los 30° latitud sur y las mejores condiciones se dan entre los 0 y los 15 grados de latitud norte o sur; y su altitud limite es de 1500 y 2000 msnm (Soto 2008; León 2000; Ortiz *et al.*, 2001).

4.3.2 Viento

Requiere de vientos moderados para que no les causen daños a las hojas de las plantas y evitar el acame (Ortiz *et al.*, 2001).

4.3.3 Suelo

La supervivencia de *Foc*, así como su crecimiento y esporulación son mayores en suelos de textura fina a francos y franco-arcillosos que en suelos arcillosos pesados con pH 7,2 a 8 (Cárdenas 2001). El micelio y las conidias sobreviven sólo durante poco tiempo en suelos muy secos, punto de partida para el desarrollo de clamidosporas (estructuras reproductivas de supervivencia) que se mantienen latentes aproximadamente de 20 a 30 años (Aguilar *et al.*, 2000; Cárdenas 2001; Pérez y Pocasangre 2010). Se ha documentado que inundaciones por más de 18 meses destruyen las estructuras reproductivas de *Foc* (Ploetz y Pegg 1997; Cárdenas 2001).

4.3.4 pH

Óptimo en el pH del suelo en plantaciones entre 6-7 unidades de la escala de Sorensen. Suelos de mayor grado de acidez reducirá drásticamente los rendimientos disminuyendo los beneficios económicos de los productores (Cárdenas 2001).

4.4 Historia, importancia y distribución de la enfermedad Marchitez por *Fusarium* (*Fusarium oxysporum* f sp., *cubense*)

Marchitez por *Fusarium* o Mal de Panamá fue descrito por primera vez en Australia en 1874 y posteriormente fue reportado en Costa Rica y Panamá 1890, Cuba, Puerto Rico, Jamaica y América Central en 1910 (Soto 2008). Se ha estimado que entre 1890 y 1960 más de 80 000 ha del cultivar Gros Michel (AAA) fueron destruidas en América Latina y el Caribe (Pocasangre y Pérez 2009). El Mal de Panamá sigue siendo un serio problema para muchos cultivares de banano.

En Nicaragua y en Costa Rica la Marchitez por *Fusarium* es la principal enfermedad presente en los sistemas de producción orgánica, donde se cultiva la variedad Gros Michel en asocio con café y cacao. Estudios realizados en la región de Turrialba demostraron que el 90% de las fincas que cultivan café en asocio con Gros Michel están afectadas por la Marchitez de *Fusarium* y en la zona de Talamanca el 40% de las fincas que cultivan cacao en asocio con banano presentaron problemas de *Fusarium* (Silagyi y Pocasangre 2003).

Por otro lado, la raza 4 de *Foc* ha causado importantes pérdidas en plantaciones de Taiwán, Malasia, Indonesia, China, Filipinas y el Norte de Australia (Molina 2009). Hasta el momento, esta raza no ha sido reportada en América Latina y el Caribe, pero se presume que su introducción tendría un importante impacto económico América Latina y el Caribe. La raza 4 afecta a otros grupos importantes de Musáceas como son los plátanos AAB y bananos de cocción ABB, amenazando la producción de los pequeños agricultores en América Latina y el Caribe (Ploetz 2004).

4.5. Caracterización de las razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Se han clasificado en cuatro razas de acuerdo a los cultivares hospedantes. La raza 1 ataca a Gros Michel (AAA), Silk, Pome y Lady Finger (AAB), Pisang Awak (ABB) y Maqueño (AAB); la raza 2 ataca a los bananos de cocción tipo Bluggoe y clones (ABB) estrechamente relacionados (Soto 2008); la raza 3 afecta principalmente a *Heliconia* spp. (Soto 2008). Y la raza 4 ataca al subgrupo Cavendish (AAA) y a todos los cultivares susceptibles a la raza 1 y raza 2 del patógeno (Ploetz 1994).

4.6. Epidemiología de la enfermedad Marchitez por *Fusarium* agente causal *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*

Fusarium oxysporum f. sp. *cubense* puede permanecer en residuos de banano infectados en forma de clamidosporas, las cuales germinan estimuladas por secreciones radicales de las raíces de plantas hospederas y no hospederas. Micelio y conidios son producidos luego de 6 a 8 horas y nuevas clamidosporas después de 2 a 3 días (Ploetz 1994). El hongo penetra a la planta a través de las raíces terciarias pero no por las raíces principales, a menos que haya exposición del cilindro central (Ploetz 1994; Caballero 2010). Posteriormente, pasa al sistema vascular del rizoma y pseudotallo e invade los vasos del xilema; el hongo produce conidios los cuales son llevados a lo largo de los haces vasculares donde inician nuevas zonas de infección, ocasionando su obstrucción y como consecuencia el movimiento del agua y nutrientes se neutraliza en el pseudotallo de las plantas infectadas (Ortiz *et al.*, 2001)

4.7. Síntomas externos e internos de la enfermedad Marchitez por *Fusarium*.

Foc es una enfermedad que causa marchitez en la planta, necrosis, pudrición de las raíces y rizomas las haces vasculares del pseudotallo (Pérez-Vicente 2004). Los primeros síntomas son la aparición de estrías verdes pálidas en la base del pecíolo y la decoloración rojiza de los vasos debajo de la epidermis del pecíolo dos semanas antes de iniciar los síntomas típicos. Estos síntomas aparecen entre 2 y 5 meses después de la infección de las raíces (Pérez-Vicente 2004). A medida que avanza la enfermedad se presenta un amarillamiento de las hojas más viejas a lo largo del margen foliar y continúa hacia la nervadura central hasta quedar completamente seca y de color café (Ploetz 2006). Todas las hojas se agobian y se marchitan en la unión del pecíolo con el pseudotallo quedando colgadas; los pseudotallos pueden permanecer de pie por 1 o 2 meses (Lichtemberg 2010) En las plantas

con activo crecimiento puede observarse una rajadura del pseudotallo a nivel del suelo (Pérez-Vicente 2004). En sus inicios este síntoma se puede confundir con deficiencia de potasio, especialmente bajo condiciones de sequía y frío (Moore *et al.*, 1995). Los primeros síntomas internos de la enfermedad se producen en las raíces, moviéndose al rizoma en los límites de la corteza y el cilindro central donde hay mayor área vascular, observándose estrías necróticas, oscuras o azuladas sobre un fondo blanco (Ploetz 2006). El patógeno pasa a través de los vasos afectados a nuevos retoños en crecimiento (Ploetz y Pegg 2000; Pérez-Vicente 2004). Las hojas nuevas que emergen del pseudotallo infectado son más cortas de lo normal y no se presentan síntomas internos en los frutos de banano (Pérez-Vicente 2004).

4.8. Estrategias de manejo de la enfermedad Marchitez por *Fusarium* agente causal *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* raza 1

4.8.1. Resistencia Genética

La utilización de genotipos resistentes y tolerantes a *Foc* constituye la manera más efectiva, económica y práctica de combatir la enfermedad (Seshu *et al.*, 1998; Rutherford y Kangire 1998). Varios estudios han centrado sus esfuerzos en la búsqueda de fuentes naturales de resistencia al patógeno en especies y cultivares silvestres; a través de la utilización de herramientas biotecnológicas que se han seleccionado de plantas de banano *in vitro* tolerantes a la Marchitez por *Fusarium* (Matsumoto *et al.*, 1999, Cárdenas 2001), identificado cultivares resistentes a las razas 1 y 4 de *Foc* (Orjeda 1998), como los FHIA-01, FHIA-03 y FHIA 17 (AAAA) que pueden reemplazar a variedades susceptibles en América Latina y el Caribe (Rutherford y Kangire 1998). No obstante, a nivel comercial, estos cultivares no tienen aceptación debido a que sus ciclos de cultivo son excesivamente largos y por la baja calidad de la fruta. Hasta el momento no existe un cultivar resistente que presente la alta calidad organoléptica del subgrupo Cavendish (AAA) y mucho menos la del cultivar Gros Michel (AAA).

4.8.2 Control Biológico

El término antagonista se puede acuñar como, un conjunto de microorganismos que actúan como parásitos, predadores, competidores que de alguna manera repelen, inhiben o matan a los nematodos, insectos y hongos fitopatógeno. (Sikora 1992) La utilización de microorganismos antagonistas constituye una alternativa para disminuir la incidencia de enfermedades, mejorar la nutrición y la resistencia de las plantas (Pocasangre 2000). Investigaciones han demostrado que existen varios mecanismos de acción de estos antagonistas para controlar el desarrollo de patógenos, que involucran generalmente antibiosis, competencia por espacio o por nutrientes, interacciones directas con el patógeno (mico parasitismo y lisis enzimática) e inducción de resistencia (Fernández 2001; Berg y Hallmann 2006).

Pocasangre (2000) indica que la utilización de microorganismos antagonistas constituye una alternativa para disminuir la incidencia de enfermedades, mejorar la nutrición y la resistencia de las plantas. Hongos dentro del género *Trichoderma* son efectivos en la reducción de pérdidas atribuidas a un número de patógenos transmitidos por el suelo, incluyendo la marchitez por *Fusarium* y *Verticillium*.

El biocontrol con hongos endofíticos ha sido objeto de estudio de varias investigaciones en diferentes cultivos. Encontrando que *Trichoderma harzianum* redujo la incidencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *Radicis lycopersici* en varios cultivos, como por ejemplo en tomate bajo condiciones de campo. En concordancia, Pérez *et al.* 2003 informaron de la actividad inhibitoria de *T. harzianum* en tratamientos previos a inoculaciones con *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en plantas susceptibles.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Ubicación geográfica de la investigación

El estudio se realizó en el Laboratorio de Fitopatología del Departamento de Agroecología de la Facultad de Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León (UNAN-León). Ubicado en la parte este de la ciudad de León a 1.5 Km carretera a la Ceiba. Y el establecimiento del Bioensayo de biocontrol fue en Jardín Botánico de la UNAN-León ubicado a 1.5 Km del Politécnico La Salle. Esta zona se caracteriza por presentar una temperatura mínima de 25° C y una temperatura máxima de 39° C, con altitud de 90 msnm y precipitaciones anuales de 1200 mm.

5.2 Material experimental

5.3 Aislamientos de *Fusarium oxysporum* f sp. cubense

Se utilizaron dos aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* provenientes del estudio de Patogenicidad de *Foc* realizado por Darce (2012), correspondientes a la raza 1, extraídos de plantas enfermas del cultivar susceptible Gros Michel (AAA) en la Finca el Triunfo de la Comunidad de Monterrey, Departamento de Jinotega, Nicaragua.

Aislamiento	Código	Procedencia
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. cubense	<i>Foc</i> 1	Finca el Triunfo, Jinotega
<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. cubense	<i>Foc</i> 2	Finca el Triunfo, Jinotega

5.3. Aislamientos de *Trichoderma* spp.

Se utilizaron 3 aislamientos de *Trichoderma* spp., proporcionados por el Laboratorio de Controladores biológicos del Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos de la UNAN-León.

Cuadro1. Aislamientos de *Trichoderma* spp.,

<i>Trichoderma</i> spp.,	Aislamiento 1	<i>Trichoderma harzianum</i>
	Aislamiento 2	<i>Trichoderma</i> (extraído del suelo)
	Aislamiento 3	<i>Trichoderma</i> (extraído de una planta de tomate)

5.3.2 Material Vegetal

Se utilizaron plantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) y FHIA 17(AAAA) con dieciséis semanas de endurecimiento colectivo en invernadero, provenientes del área de tejido del laboratorio de la UNA (Universidad Nacional Agraria).

5.4 Diseño experimental

Se utilizó un diseño de bloque completamente al azar, el estudio consistió con 24 tratamientos y tres repeticiones para un total de 72 unidades experimentales, con dos Niveles, Nivel A variedad Gros Michel y Nivel B variedad FHIA17.

Tratamientos			
Gros Michel		FHIA17	
Nombre del tratamiento	Abreviatura	Nombre del tratamiento	Abreviatura
Fusarium 1 + Trichoderma 1	FOC1T1	Fusarium 1 + Trichoderma 1	FOC1T1
Fusarium 1 + Trichoderma 2	FOC1T2	Fusarium 1 + Trichoderma 2	FOC1T2
Fusarium 1 + Trichoderma 3	FOC1T3	Fusarium 1 + Trichoderma 3	FOC1T3
Fusarium 2 + Trichoderma 1	FOC2T1	Fusarium 2 + Trichoderma 1	FOC2T1
Fusarium 2 + Trichoderma 2	FOC2T2	Fusarium 2 + Trichoderma 2	FOC2T2
Fusarium 2 + Trichoderma 3	FOC2T3	Fusarium 2 + Trichoderma 3	FOC2T3
Fusarium 1	FOC1	Fusarium 1	FOC1
Fusarium 2	FOC2	Fusarium 2	FOC2
Trichoderma 1	T1	Trichoderma 1	T1
Trichoderma 2	T2	Trichoderma 2	T2
Trichoderma 3	T3	Trichoderma 3	T3
Testigo	Test	Testigo	Test

5.5 Cultivo y multiplicación de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense

Se cultivaron colonias puras de los dos aislamientos de *Foc* en PDA al 10%, (microconidias, macroconidias y clamidosporas) de *Foc* raza 1 del cultivar Gros Michel (AAA) procedentes del estudio (Darce 2012). Las colonias puras del patógeno fueron transferidas a los platos Petri que contenían el PDA, acidificado con ácido láctico al 85%, a

continuación cada plato fue rotulado, registrado y sellado con parafilm en condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar horizontal y posteriormente fueron almacenado a 24°C por dos semanas en una incubadora, para el crecimiento y esporulación de las colonias de *Foc*. Al cabo de este período, se procedió a la multiplicación de los aislamientos FOC1 y FOC2, extrayéndose discos de PDA con colonias de *Foc* de 5 mm de diámetro que contenían micelio, microconidias, macroconidias y clamidosporas, que fueron trasladadas a nuevos platos Petri con PDA al acidificado con ácido láctico al 85% en condiciones asépticas. Estos platos Petri fueron rotulados, registrados y sellados con papel parafilm. Los platos sembrados con los aislamientos de *Foc* fueron almacenados a 24°C por dos semanas en una incubadora. Listo para ser utilizados en el bioensayo de biocontrol en invernadero.

5.6 Cultivo y multiplicación de *Trichoderma* spp.

Las colonias puras de *Trichoderma* spp., proporcionadas por el CIRCB (Centro de Investigación y Reproducción de Controladores Biológicos) fueron cultivadas en PDA al 10%, acidificado con ácido láctico al 85%, cada plato Petri fue rotulado, registrado y sellado con parafilm en condiciones asépticas en una cámara de flujo laminar horizontal y posteriormente fue almacenado a 24°C por una semana en una incubadora, para el crecimiento y esporulación de las colonias de *Trichoderma* spp. Al finalizar este período, se realizó la multiplicación de los *Trichoderma* spp., extrayéndose discos de PDA al 10% de las dos semanas de crecimiento de 5 mm de diámetro que contenían micelio y conidias, que fueron llevados a nuevos platos Petri con PDA al 100% acidificado al 85% con ácido láctico, cada plato fue rotulado, registrado y sellado con papel parafilm y fue almacenado a 24°C por dos semanas en una incubadora. Listo para utilizarse en el bioensayo de biocontrol en invernadero.

5.7 Esterilización del sustrato

Se esterilizo un saco de arena y un saco de tierra, el cual fue en una autoclave a 120 °C durante 1 hora, esterilizando primero los sacos plásticos, esto para evitar que la tierra o arena se pudieran contaminar luego se tomaron bolsas plásticas para llenarlas de tierra y arena e introducir las a la autoclave para su esterilización y una vez esterilizado el sustrato se depositó en los sacos plásticos ya esterilizados.

5.8 Siembra en vasos plásticos

Una vez que la tierra y la arena estaban esterilizadas se procedió a mezclarla en proporciones de 1:1 para colocarlas en vasos plásticos de 250 ml y sembrar las vitroplantulas. Los vasos plásticos se llenaron con la mezcla y posteriormente se rotularon y se ubicaron en el correspondiente lugar ya determinado en el estudio.

5.9 Preparación de la suspensión de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Cultivos puros de *Foc* que crecieron en PDA al 100% con ácido láctico al 85% y almacenados a 24°C durante 2 semanas en una incubadora, fueron utilizados para la obtención de una suspensión de esporas. A cada plato Petri que contenía los crecimientos de un aislamiento específico de *Foc* se le agregaron 20 ml de agua destilada hasta cubrir el cultivo puro. Posteriormente se removieron las esporas y el micelio con una espátula

plástica; las suspensiones obtenidas se filtraron por medio de una gasa doble para separar el micelio de las esporas, vertiéndose en un beaker, y llevando a un volumen de 100 ml. Una vez obtenida la suspensión de esporas, se procedió al conteo de las unidades formadoras de colonias (ufc) utilizando un hematocímetro de Neubauer en un microscopio con aumento de 40x, para luego ajustar la suspensión a una concentración de 1×10^6 ufc/ml. (Figura 2)



Figura 2. Preparación de la suspensión de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

5.10 Preparación de la suspensión de esporas de los *Trichoderma* spp.

Para la obtención de una suspensión de esporas de los aislamientos de *Trichoderma* spp., se utilizó el mismo protocolo descrito en el numeral anterior (5.8).

5.11 Protección de vitroplantas con aislamientos de *Trichoderma* spp.

Vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) y FHIA17 (AAAA) de 16 semanas de aclimatación en invernadero se inocularon con suspensiones conidiales de los aislamientos de *Trichoderma* spp., T1, T2, y T3. El sistema radical de las vitroplantas fueron sumergida en una suspensión conidial de los aislamientos a una concentración 1×10^6 ufc/ml durante 30 minutos. Posteriormente, las vitroplantas fueron trasplantadas en contenedores plásticos que contenían una mezcla esterilizada de tierra y arena en una relación 1:1.

Se realizaron tres repeticiones por cada tratamiento, estas unidades experimentales fueron distribuidas al azar en mesas en el invernadero, donde permanecieron 14 semanas a una temperatura 27.3 ± 2 °C (Figura 3).



Figura 3. Protección de vitroplantas con aislamientos de *Trichoderma* spp.

5.12 Inoculación de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* a vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) y FHIA 17 (AAAA)

Cuatro semanas después de la protección de las vitroplantas con *Trichoderma* spp T1, T2, y T3 se realizó la inoculación con los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* FOC1 y FOC2. La inoculación se realizó aplicando 15 ml de una suspensión ajustada de *Foc* a una concentración 1×10^6 ufc/ml en tres agujeros a una profundidad de 2 cm en el sustrato alrededor del área radical y cercana a la base del rizoma. Se establecieron dos testigos referenciales inoculados con FOC1 y FOC2, sin previa protección de las inoculaciones de los aislamientos de *Trichoderma* spp., además, se estableció un testigo absoluto con plantas sin inoculación de los aislamientos de *Foc* y *Trichoderma* spp.

5.13 Evaluación de la incidencia y la severidad de la enfermedad en condiciones de invernadero

El período de incubación se determinó cuando se presentó la primera planta con síntomas externos característicos de la enfermedad. La incidencia de la enfermedad se calculó por el número de plantas que presentaron síntomas de la enfermedad y se expresaron en porcentajes de plantas enfermas. Las evaluaciones se realizaron de manera semanal hasta el término del bioensayo. La severidad de la enfermedad fue evaluada por el grado de daño expresado tanto en síntomas externos como internos, los cuales fueron estimados visualmente según la escala propuesta por (Orjeda 1998) (Cuadro 2). Los síntomas externos se evaluarán cada semana después de la primera inoculación con *Foc*. La evaluación de síntomas internos se realizó al finalizar el bioensayo. Las plantas fueron sacrificadas y se realizaron cortes longitudinales a nivel del cormo. Las variables de crecimiento fueron medidas cada semana, hasta el término del bioensayo, evaluando los parámetros de crecimiento (Cuadro 3). Finalmente se tomó el peso radical, foliar y total de la planta (Cuadro 3). El porcentaje de índice de síntomas externos e internos fueron calculados con la fórmula descrita por Saravanan *et al.* (2003).

Cuadro 2. Escala de evaluación de síntomas provocados por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Síntomas externos			
Valor	Amarillamiento	Marchitez	Síntomas internos
1	Ausencia de síntomas	Ausencia de síntomas	Ausencia de síntomas
2	Amarillamiento en hojas viejas	Marchitez en hojas viejas	Puntos aislados de decoloración en el tejido vascular
3	Amarillamiento en hojas bajas	Marchitez en hojas bajas	Decoloración de hasta 1/3 del tejido vascular
4	Amarillamiento en hojas jóvenes	Marchitez en hojas jóvenes	Decoloración de entre 1/3y 2/3 del tejido vascular
5	Severo amarillamiento	Severa marchitez	Decoloración mayor a los 2/3 del tejido vascular
6	Muerte de la planta	Muerte de la planta	Decoloración total del tejido vascular

Fuente: Orjeda (1998)

5.14 Métodos estadísticos.

Se procedió a realizar un análisis de varianza ANDEVA de las variables de los parámetros de crecimiento (Cuadro 3); posteriormente la media de cada uno de los tratamientos fueron comparada con una prueba de rango de DUNCAN, presentándose estos datos en tablas de porcentaje, esto se realizo por medio del programa estadístico SSPS 19.

Catorce semanas después del inicio del experimento, se evaluaron los síntomas externos e internos de la enfermedad Marchitez por *Fusarium* (Cuadro 3), utilizando la escala de Orjeda 1998. Y consecutivamente se calcularon los porcentajes de índices de síntomas externos (amarillamiento y marchitez) e internos (decoloración del cormo). Estos porcentajes realizados en el programa Excel

Con respecto a la evaluación de las variables de síntomas externos e internos, se procedió a calcular los porcentajes de índice de síntomas externos e internos y los porcentajes de incidencia por medio del programa Excel.

El porcentaje de índice de síntomas externos e internos fue calculado usando la fórmula descrita por Saravanan *et al.* (2003).

$$\% \text{ I Síntomas} = \frac{\text{Suma total de coeficientes numéricos} \times 100}{\text{Número de plantas observadas} \times \text{valor máximo de categoría en la escala}}$$

Con respecto al porcentaje de incidencia fue calculado usando la fórmula descrita por Subramaniam *et al.* (2006)

$$\text{Incidencia (\%)} = \frac{\text{Número de plantas enfermas por } Foc \times 100}{\text{Número total de plantas evaluadas}}$$

Cuadro 3. Variables evaluadas en el bioensayo de biocontrol en las vitroplantulas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) y FHIA 17(AAAA).

Bioensayo	Variables
Prueba de patogenicidad	Incidencia Severidad Amarillamiento Marchitez Decoloración del cormo Crecimiento de la planta Numero de hojas Altura de la planta Diámetro del pseudotallo Largo de la tercera hoja Ancho de la tercera hoja Índice foliar Peso radical de la planta Peso foliar de la planta Peso total de la planta

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

6.1 Caracterización morfológica de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*

Los aislamientos de *Foc* presentaron un abundante micelio con apariencia algodonosa; sin embargo, la coloración de las colonias varió. El aislamiento FOC1 presentó una pigmentación blanquecina, y FOC 2 exhibió un tono rosado, estos resultados concuerdan con Lara (2009).

6.2. Prueba de biocontrol

6.2.1 Porcentaje de índice de síntomas internos y externos

Los aislamientos de *Foc* causaron los primeros síntomas de la enfermedad a partir de la novena semana después de la inoculación (período de incubación) en ambas variedades. Para la variedad Gros Michel (AAA) la severidad se destacó más en comparación a la variedad FHIA 17 (AAAA). En el cultivar Gros Michel (AAA) el testigo referencial FOC1 presentó una severidad de 66.66%, precedido de FOC2 con una severidad de 33.33%, y los tratamientos FOC1T1, FOC1T2, FOC1T3, FOC2T1 con una severidad del 22.22%. Este resultado concuerda con Caballero (2009), que plantas protegidas con *Trichoderma* spp., reducen el porcentaje de síntomas externos en un 50%, se destaca que los tratamientos que presentaron una incidencia porcentual baja retrasaron su aparición de síntomas hasta la doceava semana, esto gracias a que fueron inoculados con *Trichoderma* spp. Esto concuerda con Lara (2009) ya que realizó bioensayos con bacterias endofíticas para proteger vitroplántulas de Gros Michel (AAA) de *Foc* raza 1.

La incidencia de la enfermedad Marchitez por *Fusarium* en el cultivar Gros Michel (AAA) fue del 100% excluyendo los tratamientos FOC2T1 Y FOC2T3 que presentaron una incidencia de 66.66%, los tratamientos T1, T2, T3 Y TEST que no fueron inoculados con *Foc* no presentaron incidencia alguna.

En la variedad de banano FHIA17 (AAAA) los tratamientos FOC1T1, FOC1T2, FOC1T3, FOC2T2, FOC2T3, FOC1 y FOC2 presentaron una severidad de 22.22%, se destaca que los tratamientos que presentaron incidencia retrasaron su aparición hasta la doceava semana. Debido a que fueron inoculados con *Trichoderma* spp., Plantas testigos absolutos y testigo referencial (inoculadas con *Trichoderma* spp.) que no fueron inoculadas con *Foc*, permanecieron sanas y libres de síntomas externos e internos de la enfermedad (Tabla 1). Esos datos no se pueden comparar con otros similares ya que no se han descritos estudios similares con respecto a FHIA 17 (AAAA).

La incidencia de la enfermedad Marchitez por *Fusarium* en el cultivar FHIA17 (AAAA) fue del 100% excluyendo los tratamientos FOC2T1 Y FOC2T3 que presentaron una incidencia de 66.66%, los tratamientos T1, T2, T3 Y TEST que no fueron inoculados con *Foc* no presentaron incidencia alguna.

Por lo tanto el uso de organismos antagonistas en esta investigación de tesis proporciona resultados similares a otros estudios, ya que plantas protegidas con *Trichoderma* spp., retrasan los síntomas de la enfermedad Marchitez por *Fusarium* hasta en tres semanas.

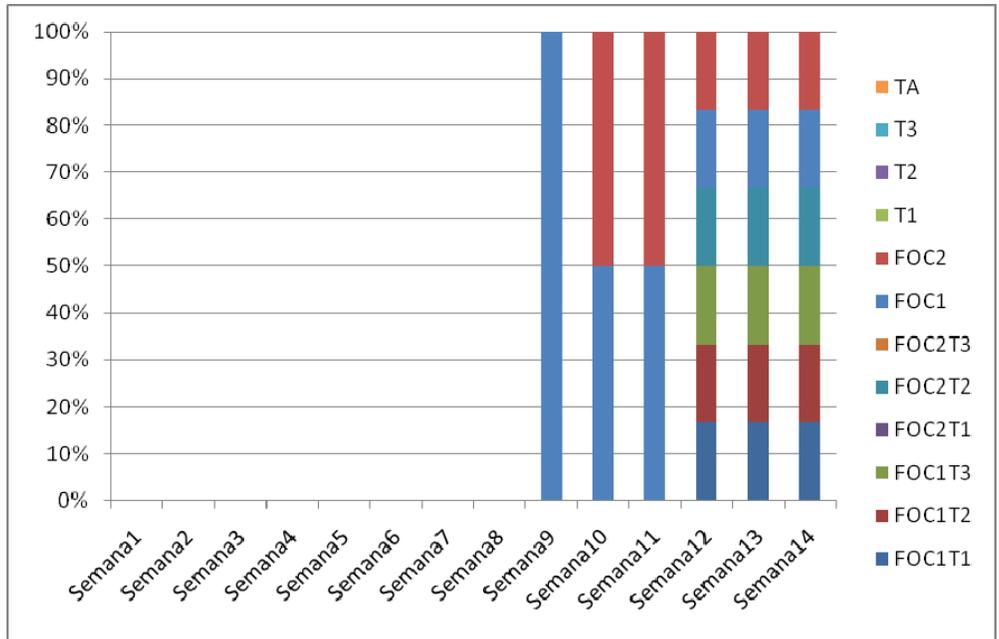


Gráfico 1. Porcentaje de incidencia de Marchitez por Fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) en catorce semanas de evaluación.

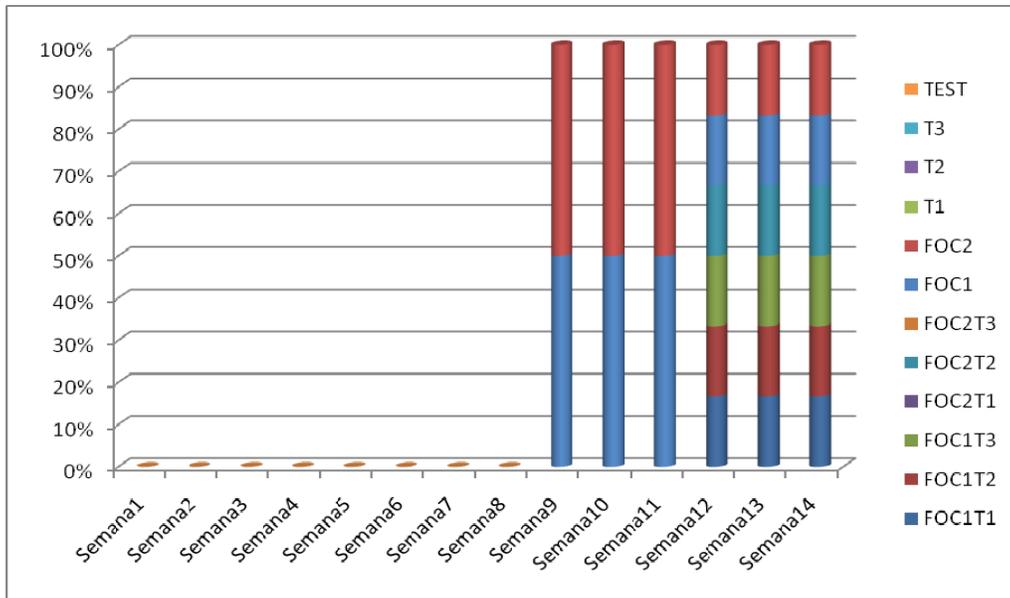


Gráfico 2. Porcentaje de incidencia de Marchitez por Fusarium (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) en vitroplantas de banano del cultivar FHIA17 (AAAA) en catorce semanas de evaluación.

Respecto a los síntomas externos expresados en amarillamiento y marchitez. La severidad del amarillamiento y la marchitez se incrementaron conforme avanzaron las semanas de evaluación, el aislamiento FOC1 presentó el mayor porcentaje de amarillamiento y marchitez. Esto concuerda con Caballero (2011) al usar aislamientos endofíticos de *Trichoderma* spp., que reducen en un 40% los síntomas de amarillamiento y marchitez.

Tabla 1. Efectos de *Trichoderma* spp., sobre los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* sobre el porcentaje de índice de síntomas externos, índice de síntomas internos y porcentaje de incidencia en las variedades Gros Michel (AAA) Y FHIA17 (AAAA) en condiciones de invernadero durante la semana 14.

Tratamientos Variedades	% de Incidencia		% índice de síntomas externos				% índice de síntomas Internos	
	Gros Michel	FHIA17	Amarillamiento		Marchitez		Decoloración del cormo	
			Gros Michel	FHIA17	Gros Michel	FHIA17	Gros Michel	FHIA17
Foc1T1	100	100	22.22	22.22	22.22	22.22	16.67	16.67
Foc1T2	100	100	22.22	22.22	16.67	22.22	22.22	16.67
Foc1T3	100	100	16.67	16.67	16.67	16.67	16.67	16.67
Foc2T1	66.66	66.66	22.22	22.22	16.67	16.67	16.67	22.22
Foc2T2	100	100	22.22	22.22	16.67	22.22	16.67	16.67
Foc2T3	66.66	66.66	27.78	22.22	27.78	22.22	22.22	22.22
Foc1	100	100	66.66	22.22	44.44	22.22	38.89	22.22
Foc2	100	100	33.33	22.22	33.33	22.22	33.33	22.22
T1	0	0	16.67	16.67	16.67	16.67	16.67	16.67
T2	0	0	16.67	16.67	16.67	16.67	16.67	16.67
T3	0	0	16.67	16.67	16.67	16.67	16.67	16.67
Test	0	0	16.67	16.67	16.67	16.67	16.67	16.67

6.3 Variables de crecimiento

Para la variedad Gros Michel, los resultados no registraron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento (Tabla 2.)

Tabla 2. Efecto de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* raza 1 y *Trichoderma* spp., en los parámetros de crecimiento en cultivar Gros Michel (AAA).

Gross Michel	FOC1T1	FOC1T2	FOC1T3	FOC2T1	FOC2T2	FOC2T3	FOC1	FOC2	T1	T2	T3	Test	$\alpha=0.05$
Altura (cm)	12.2 a	14.1 ab	13 a	14.6 ab	13.4 a	14.1 ab	13 a	13.1 a	14.1 ab	14.6 ab	14 ab	12 a	0.65
Nº de hojas	4 a	4 a	4 a	4 a	4 a	4 a	3 a	3 a	4 a	4 a	4 a	4 a	0.52
Diámetro (mm)	1.1 a	1.1 a	1.2 a	1.1 a	1.2 a	1.1 a	1 a	1 a	1.2 a	1.1 a	1.2 a	1.2 a	0.82
Largo T ^{ra} hoja (cm)	17.66 ab	13.66 a	13.66 a	11 a	13.5 a	25.5 ab	11 a	12 a	13.5 a	22.56 ab	13.5 a	13.5 a	0.52
Ancho T ^{ra} hoja (cm)	7 a	8 a b	8.1 ab	7 a	7.8 a	9 ab	7 a	6 a	7.8 a	8 ab	7.5 a	7.8 a	0.57
Índice foliar	2.5 a	1.7 a	1.6 a	1.5 a	1.7 a	2.8 a	1.5 a	1.5 a	1.7 a	2.6 a	1.6 a	1.6 a	0.93

Para la variedad FHIA17, los resultados no registraron diferencias significativas en los parámetros de crecimiento (Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 y *Trichoderma* spp., en los parámetros de crecimiento en cultivar FHIA17 (AAAA).

FHIA17	FOC1T1	FOC1T2	FOC1T3	FOC2T1	FOC2T2	FOC2T3	FOC1	FOC2	T1	T2	T3	Test	$\alpha=0.05$
Altura (cm)	13.2 a	13.5 a	13.6 a	14 ab	14.4 ab	14.2 ab	12.9 a	12.6 ab	14.6 ab	13 a	14.7 ab	13 a	0.183
Nº de hojas	4 a	3.3 a	3.3 a	3 a	4 a	3.3 a	3 a	3 a	3.3 a	3.3 a	3.3 a	3.3 a	0.182
Diámetro (cm)	1 a	1 a	1 a	1.1 a	1.1 a	1.1 a	1 a	1 a	1.1 a	1.2 a	1.1 a	1.1 a	0.114
Largo T ^{ra} hoja (cm)	13.2 a	13.3 a	13.5 a	15.1 a	14.5 a	17.4 a	15.1 a	13 a	15.1 a	16.5 a	13.1 a	16 a	0.330
Ancho T ^{ra} hoja (cm)	7.7ab	8.8 ab	7.6 ab	8.8 ab	9.8 ab	8.7 ab	6.5 a	8.1 ab	8 ab	8.5 ab	7.7 ab	8.5 ab	0.058
Índice foliar	1.8 a	2 a	1.6 a	1.6 a	1.9 a	1.7 a	2 a	1.8 a	1.9 a	1.8 a	1.7 a	2 a	0.093

Figura 4. A- Plantas de banano del cultivar Gros Michel protegidas con aislamientos de *Trichoderma* spp., e inoculadas con *Foc*. B- Planta del cultivar Gros Michel inoculada con *Foc* presentando síntomas de la enfermedad.

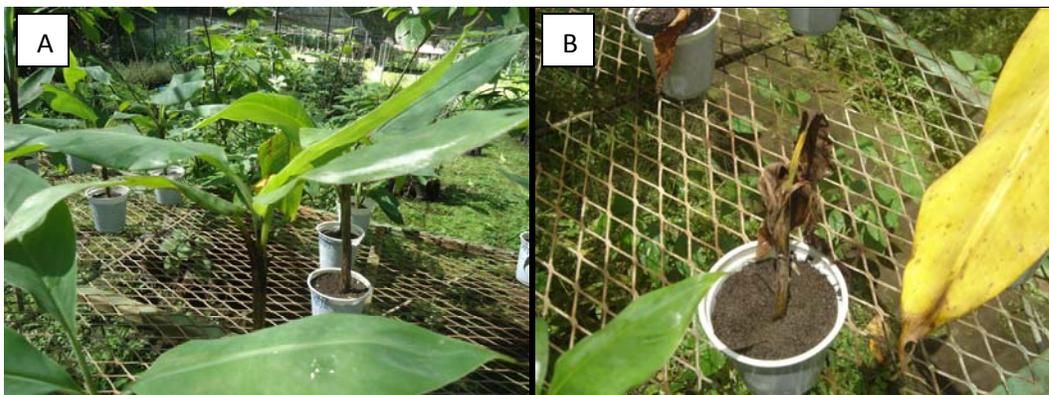


Figura 5. A- Planta de banano del cultivar FHIA17 protegidas con aislamientos de *Trichoderma* spp., e inoculada con *Foc*. B- Planta del cultivar FHIA17 inoculada con *Foc* presentando síntomas de la enfermedad.



En la variable síntomas internos evaluados en la decoloración del cormo, presentaron que, plantas inoculadas con FOC1 obtuvieron síntomas internos más severos; mientras que en plantas inoculadas con el aislamiento FOC2 los síntomas fueron menos severos, esto en el caso de la variedad Gros Michel (AAA). (Gráfico 3). Esto concuerda con Caballero (2011) que con el uso de aislamientos de *Trichoderma* spp., reduce en un 74% los síntomas de decoloración del cormo.

Para la variedad FHIA17 la enfermedad no logro desarrollar más de un 22.22% en la decoloración del cormo. (Gráfico 4)

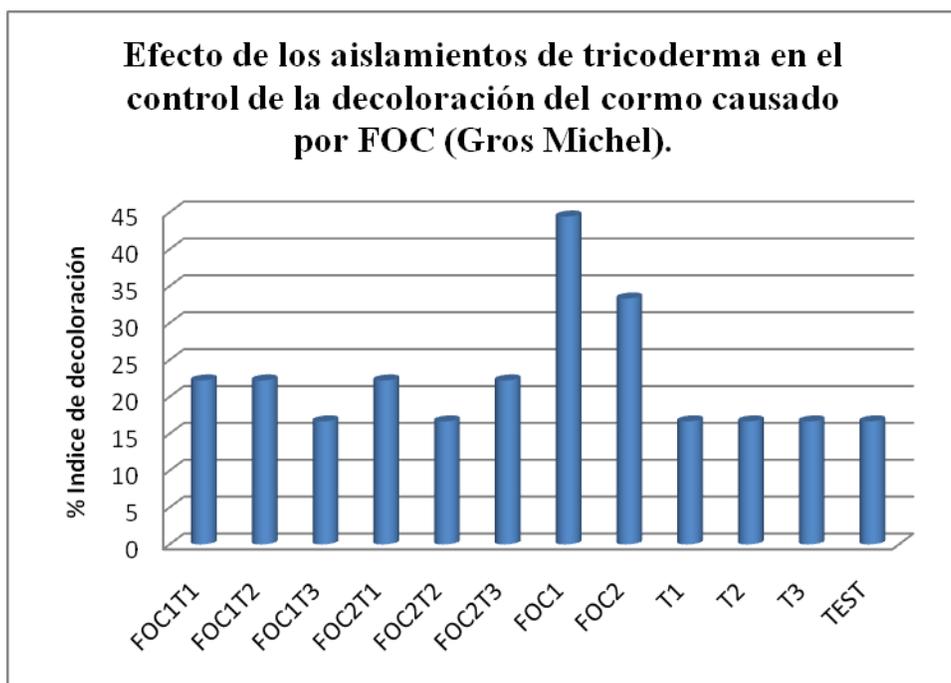


Gráfico 3. Efecto de los aislamientos de *Trichoderma* spp., en el control de la decoloración del cormo causado por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA).

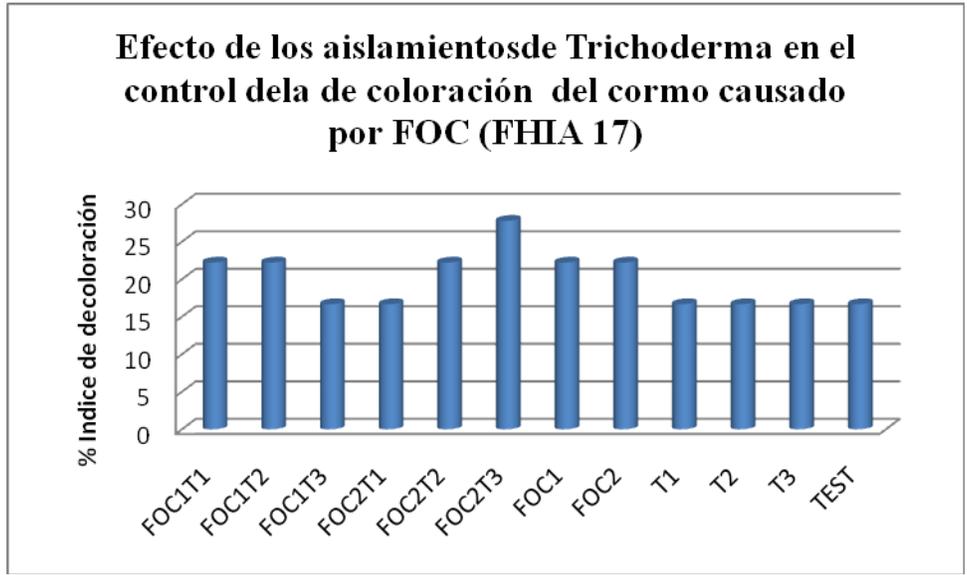


Gráfico 4. Efecto de los aislamientos de *Trichoderma* spp., en el control de la decoloración del cormo causado *Fusarium oxysporum* f. sp. *cabense* en vitroplantas de banano del cultivar FHIA17(AAAA).

VII. CONCLUSIONES

7.1 Prueba de biocontrol

Los aislamientos de *Trichoderma* spp., evaluados en esta investigación retardaron la aparición de los síntomas externos en tres semanas en comparación con los otros tratamientos, presentando 22.22% de incidencia, tanto para la variedad Gros Michel (AAA) como para la variedad FHIA17 (AAAA).

Los aislamientos de *Trichoderma* spp., T1 y T3 redujeron un 40% los síntomas externos de la enfermedad en comparación de los testigos referenciales, tanto para la variedad Gros Michel (AAA) como para la variedad FHIA17 (AAAA).

Los aislamientos de *Trichoderma* spp., T1 y T3 presentaron los promedios más altos en reducción de decoloración del corno con 16.67% para la variedad FHIA17 (AAAA). Y para la variedad Gros Michel (AAA) los aislamientos T2 y T3 presentaron los promedios más altos en control de decoloración del corno con 16.67%.

7.2 Promoción de crecimiento.

No hubo diferencias significativas en los parámetros de crecimiento en las variedades de banano de los cultivares Gros Michel (AAA) y FHIA 17 (AAAA)

VIII. RECOMENDACIONES

Realizar pruebas de biocontrol con los aislamientos de *Trichoderma* spp., T1, T2 y T3 que se ha generado de esta investigación, para confirmar la consistencia a la acción antagonista de estos agentes en el biocontrol de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*.

Evaluar el efecto de inoculaciones periódicas de los aislamientos de *Trichoderma* spp., para determinar si aplicaciones frecuentes pueden potenciar la actividad de biocontrol de los hongos sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* o mantener en largo término el efecto del control biológico.

Se les recomienda a los productores no sembrar el cultivar de banano Gros Michel (AAA) debido a las pérdidas económicas que ha presentado por *Foc* por lo tanto la nueva alternativa es el cultivar FHIA 17 (AAAA) que demostró resistencia a la enfermedad.

Realizar estudios de campo con los aislamientos T1, T2 y T3 en suelos bananeros donde está la enfermedad.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, EA; Turner, DW; Sivasithamparam, k. 2000. Mecanismos propuestos acerca de lapredisposición de los bananos Cavendish al marchitamiento por *Fusarium* durante la hipoxia. *InfoMusa* 9(2):9-12.
- Caballero, AJ. 2010. Uso de hongos endofíticos de *Trichoderma* spp., para el biocontrol del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) raza 1 en vitroplantas cultivar Gros Michel (AAA). Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 104 p.
- Cárdenas, JE. 2001. Selección de vitroplantas provenientes de microsecciones de banano de la variedad Gros Michel (AAA) resistentes a la raza 1 del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*). Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 122 p.
- Darce 2012, Evaluación de la agresividad de los aislamientos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1 causante de la enfermedad Mal de Panamá en vitroplantas de banano del cultivar Gros Michel (AAA) y FHIA 17 (AAAA) en condiciones de invernadero. Tesis, UNAN-León 45 p
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2004. La economía mundial del banano 1985-2002. Eds. Arias, P; Dankers, C; Lui, P;Pilkauskas. Roma. 104 p.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2009. Principales enfermedades del banano y plátano: información actualizada sobre suprogación, efectos y estrategias de repuestas. CCP:BA/TF 09/7. 9-11 de diciembre.FAO:Roma.
- IITA (Instituto Internacional de Agricultura Tropical). 2008. Banana and Plantain in Africa: Harnessing international partnerships to increase research impact. International conference Mombasa, Kenya, 5-9 de october (en línea). Consultado el 20 de jul. 2010.
- Disponible en http://www.banana2008.com/cms/details/index_details.aspx.
- Lara, D. 2009. Uso de bacterias endofíticas para el control biológico del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) en el cultivar Gros Michel (AAA). Tesis Mag Sc. Turrialba, CR. CATIE. 85p.
- León, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. 3 ed. IICA. San José, CR. 522 p.

- Lichtemberg, PSF. 2010. Occurrence, incidence and grower perception of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in banana intercropped with coffee and trees Costa Rica and Nicaragua smallholders. Thesis Master of Science. INRE, DE. Bonn. 76 p.
- Matsumoto, K.; Barbosa, M.L.; Copati Souza, LA.; Teixeira, JB. 1999. In vitro selection for Fusarium wilt resistance in banana. II. Resistance to culture filtrate of race 1 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Fruits* 54:97-102.
- Orjeda, G. 1998. Evaluation of Musa germplasm for resistance to Sigatoka diseases and Fusarium wilt. INIBAP (International Network for improvement of banana and Plantain). Montpellier, FR. 19-29 p.
- Ortiz, RA; Lopez, A; Ponchner, S; Segura, A. 2001. El cultivo del Banano. EUNED. San José, CR. 186 P.
- Pérez, L; Batlle, A; Fonseca, J. 2003. *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* en Cuba: biología de las poblaciones, reacciones de los clones híbridos de la FHIA y biocontrol. In Rivas, G; Rosales, F. eds. Manejo convencional y alternativo de la Sigatoka negra, nematodos y otras plagas asociadas al cultivo de Musáceas en los trópicos. Taller Guayaquil, EC. p. 141-155
- Pocasangre, LE. 2000. Biological enhancement of banana tissue culture plantlets with endophytic fungi for the control of the burrowing nematode *Radopholus similis* and the Panama disease (*Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*). Ph.D. Thesis. University Bonn,DE. 95 p.
- Pocasangre, LE. 2009. Estado actual y manejo del manejo de Panamá en América Latina y el Caribe. In REUNIÓN DE GRUPO DE INTERÉS SOBRE LOS RIESGOS DE LA RAZA TROPICAL 4 DE FUSARIUM, BBTV Y OTRAS PLAGAS DE MUSACEAS PARA LA REGIÓN DEL OIRSA, AMERICA LATINA Y EL CARIBE (Documentos de Programa y Resúmenes de la Reunión). 29 al 31 de julio. OIRSA, San Salvador, El Salvador. 18 p.
- Pocasangre, L; Perez-Vicente, L. 2010. Impacto potencial de la entrada de la raza tropical 4 del Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*) en la industria bananera y platanera de América Latina y el Caribe. In Pocasangre, LE; Perez, L; Martínez, E; Tapia, A; Guzmán, M; Brown, D. eds. Taller de entrenamiento sobre el diagnóstico y caracterización de la marchitez por *Fusarium* o Mal de Panamá. 22 al 26 de febrero, Turrialba, CR. 3 p.
- Ploetz,; Pegg, KG. 1997. Fusarium wilt of banana and Wallace's line: was the disease originally restricted to the Indo-Malayan region? *Australasian Plant Pathology* 26:239-249.
- Seshu, KV; Ngode, L; Ssenyonga, JW; Wabule, M; Onyango, M; Adede, TO; Ngoze, S. 1998. Management of pests and diseases of banana in Kenya: a status report. In Frison,

EA;Gold, CS; Karamura EB; Sikora, RA. eds. Mobilizing IPM for sustainable banana production in Africa. Proceeding of a workshop on banana IPM hek. 215-218 p.

Simmonds, NW. 1997. The evolution of the bananas. Longman, London, UK. 170 p.

Soto, M. 2008. Bananos. Cultivos y comercialización. 2 ed. San José, CR. 627 pp.

Ploetz, RC. 2006. Fusarium wilt of bananas is caused by several pathogens referred to as *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Phytopathology* 96(6):653-656.

Zambrano, AY; Martínez, G; Gutiérrez, Z; Manzanilla, E; Vicente-Villardón, JL; Demey, JR. 2007. Marcador RAPD asociado a la resistencia de *Fusarium oxysporum* en *Musa*. *INCI* 32(11):775-779.

ANEXOS

Prueba de homogeneidad de varianzas^a

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Altura	4,100	11	72	,000
Numero_de_hojas	5,610	11	72	,000
Largo_3ra_hoja	4,257	11	72	,000
Ancho_3ra_hoja	9,379	11	72	,000
Indice_foliar	2,242	11	72	,021
Grosor	2,667	11	72	,006

a. Variedad = Gros michel

Subconjuntos homogéneos

Numero_de_hojas^b

		N	Subconjunto para alfa = 0.05		
Tratamientos			1	2	
Duncan ^a	FOC 2	3	3		
	Test	3	4	4	
	T3	3	4,4	4,4	
	FOC 2T3	3	4	4	
	FOC 1T3	3	4	4	
	FOC 1T2	3	4		
	FOC 2T1	3	4,3	4,3	
	FOC 2T2	3	4		
	T1	3	4	4	
	FOC 1	3	3		
	FOC 1T1	3	4		
	T2	3	4,33		
	Sig.			,125	,052

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Numero_de_hojas^b

	Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
			1	2	
Duncan ^a	FOC 2	3	3		
	Test	3	4	4	
	T3	3	4,4	4,4	
	FOC 2T3	3	4	4	
	FOC 1T3	3	4	4	
	FOC 1T2	3	4		
	FOC 2T1	3	4,3	4,3	
	FOC 2T2	3	4		
	T1	3	4	4	
	FOC 1	3	3		
	FOC 1T1	3	4		
	T2	3	4,33		
	Sig.			,125	,052

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Largo_3ra_hoja^b

	Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05			
			1	2	3	
Duncan ^a	FOC 1T3	3	13,665			
	T3	3	13,584			
	T2	3	22,522	22,522		
	FOC 2	3	12,36	12,36	12,36	
	FOC 2T1	3	11,714	11,714	11,714	
	FOC 1T2	3	13,664	13,664	13,664	
	FOC 2T3	3	23,857	22,857	22,857	
	Test	3	13,286	13,286	13,286	
	FOC 1	3	11,857	11,857	11,857	
	T1	3	13,857	13,857	13,857	
	FOC 1T1	3		17,714	17,714	
	FOC 2T2	3			13,429	
	Sig.			,052	,067	,072

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Indice_foliar^b

Tratamientos		N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
Duncan ^a	T3	3	2,529	
	FOC 2T3	3	2,854	2,854
	T1	3	1,729	1,729
	FOC 2	3	1,541	1,541
	FOC 1T3	3	1,543	1,543
	FOC 2T1	3	1,543	1,543
	FOC 1T1	3	2,571	2,571
	T2	3	2,614	2,614
	FOC 2T2	3	1,257	1,257
	Test	3	1,643	1,643
	FOC 1T2	3	1,729	1,729
	FOC 1	3		1,571
	Sig.		,093	,141

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Variedad = Gros michel

Prueba de homogeneidad de varianzas^a

	Estadístico de Levene	gl1	gl2	Sig.
Altura	3,674	11	72	,000
Numero_de_hojas	3,076	11	72	,002
Largo_3ra_hoja	2,247	11	72	,021
Ancho_3ra_hoja	2,674	11	72	,006
Indice_foliar	3,011	11	72	,002
Grosor	1,397	11	72	,193

a. Variedad = FHIA17

Subconjuntos homogéneos

		Altura ^b		
Tratamientos		N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	2
Duncan ^a	FOC 2	3	12,500	
	FOC 1	3	12,143	
	FOC 1T1	3	13,429	
	FOC 1T2	3	13,571	
	T2	3	13,571	
	Test	3	13,571	
	FOC 1T3	3	13,857	
	FOC 2T1	3	14,000	
	FOC 2T3	3	14,143	
	T1	3	14,143	
	FOC 2T2	3	14,429	
	T3	3		14,714
	Sig.		,183	

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

Numero de hojas^b

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Duncan ^a FOC 1T3	3	3,33	
FOC 2	3	3,33	3,33
T3	3	3,33	3,33
FOC 1T2	3	3,33	3,33
T1	3	3,33	3,33
FOC 1T1	3	3,33	3,33
FOC 2T2	3	4	4
FOC 1	3	4	4
FOC 2T1	3	4	4
Test	3		4
T2	3		4
FOC 2T3	3		4
Sig.		,113	,182

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Variedad = FHIA17

Largo_3ra_hoja^b

			Subconjunto para alfa = 0.05
Tratamientos		N	1
Duncan ^a	FOC 2	3	13
	T3	3	13,100
	FOC 1T1	3	13,286
	FOC 1T3	3	13,571
	FOC 2T2	3	14,571
	FOC 2T1	3	15,143
	FOC 1	3	15,143
	T2	3	16,571
	Test	3	16,286
	T1	3	16,286
	FOC 1T2	3	17,429
	FOC 2T3	3	17,286
	Sig.		,330

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Variedad = FHIA17

Ancho_3ra_hoja^b

Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
		1	2
Duncan ^a FOC 1	3	6,571	
FOC 1T3	3	7,629	7,629
FOC 1T1	3	7,743	7,743
T3	3	7,754	7,754
FOC 2	3	8,143	8,143
FOC 2T1	3	8,857	8,857
T2	3	8,571	8,571
T1	3	8,000	8,000
Test	3	8,571	8,571
FOC 1T2	3	8,857	8,857
FOC 2T3	3	8,714	8,714
FOC 2T2	3		9,857
Sig.		,165	,058

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Variedad = FHIA17

Indice foliar^b

	Tratamientos	N	Subconjunto para alfa = 0.05	
			1	
Duncan ^a	FOC 1T3	3		1,681
	FOC 2T1	3		1,691
	T3	3		1,721
	FOC 2T3	3	1,763	
	T2	3	1,856	
	FOC 1T1	3	1,865	
	FOC 2	3	1,890	
	T1	3	1,900	
	FOC 2T2	3		1,910
	FOC 1T2	3		2,000
	FOC 1	3		2,000
	Test	3		2,000
	Sig.			,093

Se muestran las medias para los grupos en los subconjuntos homogéneos.

a. Variedad = FHIA17