

Evaluación *in vitro* de diez cepas de hongos nematófagos para el control de *Meloidogyne exigua*, *Meloidogyne incognita* y *Radopholus similis*

In vitro assessment of ten strains of nematophagous fungi to control *Meloidogyne exigua*, *Meloidogyne incognita* and *Radopholus similis*

Ingrid Varela-Benavides¹, Joaquín Durán-Mora²,
Tomás Guzmán- Hernández³

Fecha de recepción: 23 de mayo de 2016
Fecha de aprobación: 21 de agosto de 2016

Varela-Benavides, I; Durán-Mora, J; Guzmán-Hernández, T.
Evaluación *in vitro* de diez cepas de hongos nematófagos para el control de *Meloidogyne exigua*, *Meloidogyne incognita* y *Radopholus similis*. *Tecnología en Marcha*. Vol. 30-1. Enero-Marzo 2017. Pág 27-37.

DOI: 10.18845/tm.v30i1.3062



- 1 Laboratorio de Nematología, Centro de Investigación y Desarrollo Sostenible para el Trópico Húmedo, Instituto Tecnológico de Costa Rica, sede San Carlos. Costa Rica. Correo electrónico: invarela@itcr.ac.cr.
- 2 Centro de Investigación y Desarrollo Sostenible para el Trópico Húmedo, Instituto Tecnológico de Costa Rica, sede San Carlos. Costa Rica. Correo electrónico: jduran@itcr.ac.cr.
- 3 Miembro del Consejo Institucional. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Doctorado en Ciencias Naturales para el Desarrollo. Correo electrónico: tjguzman@itcr.ac.cr.

Palabras clave

Hongos nematófagos; control biológico; *Meloidogyne*; *Radopholus similis*.

Resumen

El desarrollo de alternativas al uso de nematicidas, plaguicidas altamente tóxicos, es un tema de importancia en la actualidad. En esta línea ha habido un creciente reconocimiento de la efectividad del control biológico por medio de hongos nematófagos. Por tales razones, y con el fin de determinar la capacidad nematófaga de hongos que habían sido previamente aislados de fincas en la Región Huasteca Norte, se establecieron ensayos *in vitro*, en los que se evaluó la mortalidad de individuos de *Radopholus similis*, *Meloidogyne incognita* y *M. exigua* expuestos a estos hongos. Según los criterios establecidos, las cepas de *Hypocrea virens* y *Penicillium janthinellum* no presentaron actividad nematicida contra ninguna de las especies de nematodos. *Monacrosporium megalosporum*, *Trichoderma spirale* y *T. asperellum* 2 presentaron actividad nematicida contra *R. similis* y *M. exigua*. Mientras que *Gliocladium roseum* y *Fusarium oxysporum* mostraron actividad únicamente en contra de *R. similis*. *T. asperellum* y *Gongronella butleri* también mostraron potencial de control en contra de *M. exigua*. Ninguna de las cepas cumple con lo establecido para considerarla con actividad nematicida contra juveniles de *M. incognita*. Además, *P. lilacinus* y *F. oxysporum* mostraron capacidad para parasitar huevos de las dos especies de *Meloidogyne* evaluadas. *T. asperellum* y *T. spirale* parasitaron huevos de *M. incognita*, mientras que *M. megalosporum* parasitó un 56% de los huevos de *M. exigua*. Estos resultados deben ser confirmados con pruebas en campo, estudiar posibles metabolitos producidos por estos hongos, evaluar la posibilidad de mejoramiento genético de los mismos y estudiar los genes involucrados en su capacidad para parasitar nematodos.

Keywords

Nematophagous fungi; biological control; *Meloidogyne*, *Radopholus similis*.

Abstract

The search of alternative strategies to the use of nematicides to control plant parasitic nematodes is a major issue today. On this matter there has been a growing interest in the effectiveness of biological control using nematophagous fungi. Therefore, the objective of this research was to determine the predatory capacity of several fungal strains were isolated from soil from plantations located in the Región Huasteca Norte. To reach this goal, laboratory experiments were established to evaluate the *in vitro* mortality of individuals of *Radopholus similis*, *Meloidogyne incognita* and *M. exigua*, in the presence of each one of these fungal strains. According to the criteria, *Hypocrea virens* and *Penicillium janthinellum* strains had no predatory activity against the nematode species tested. *Monacrosporium megalosporum*, *Trichoderma spirale* and *T. asperellum* 2 strains showed nematicide activity against *R. similis* and *M. exigua*. Meanwhile, *Gliocladium roseum* and *Fusarium oxysporum* showed predatory activity against *R. similis*, only. Furthermore, *T. asperellum* and *Gongronella butleri*, showed potential for controlling *M. exigua*. None of the strains had the capability to control *M. incognita*. Moreover, *P. lilacinus* and *F. oxysporum* showed the capability to parasitize the eggs of both *Meloidogyne* species tested. In the same way, the eggs of *M. incognita* were parasitized by *T. asperellum* and *T. spirale*, and 56% of the eggs of *M. exigua* were parasitized by *M. megalosporum*. These results should be confirmed by field tests. It is also important, to study the secondary metabolites produced by

these fungi, evaluate the possibility of genetic improvement and study the mechanisms involved in their nematode predatory capacity.

Introducción

Los nematodos fitófagos se encuentran entre los parásitos que causan más impacto en el rendimiento de plantaciones a nivel mundial. Muchos cultivos de importancia comercial son afectados por nematodos, los cuales, además de parasitar las raíces, predisponen a la planta a infecciones por bacterias, hongos y virus [1].

Costa Rica no es ajena a esta realidad, entre los cultivos de importancia económica afectados por nematodos en el país se encuentran el café, el banano y el tomate; en estos dos últimos el uso de nematicidas sintéticos de uso restringido por su toxicidad, es común [2] [3].

En Latinoamérica *Radopholus similis* es el nematodo de mayor importancia en la mayoría de las plantaciones comerciales de banano, que junto con otros nematodos, son los responsables del deterioro gradual del sistema radical de las plantas, siendo el segundo problema fitosanitario del cultivo, ya que provocan pérdidas económicas estimadas entre el 10 y 50% [4] [5].

Por otro lado, en el cultivo del tomate el nematodo de mayor importancia en las plantaciones costarricenses es *Meloidogyne*, varias especies de este nematodo pueden reducir el rendimiento de una plantación hasta en un 68%, afectando la cantidad y calidad de los frutos [6]. La reducción del rendimiento puede causar que los costos de producción superen los ingresos económicos [7].

El café es otro cultivo afectado por varias especies de nematodos, siendo *Meloidogyne exigua* uno de los más importantes en Centroamérica [8]. Este nematodo produce en plantas susceptibles raíces más cortas, reduciendo el rendimiento hasta en un 55%, además se le atribuye la disminución en el rendimiento de las plantaciones de Río de Janeiro, en Brasil [9].

Como se mencionó anteriormente, en estos cultivos el control de nematodos se realiza con nematicidas sintéticos que son altamente tóxicos, y que por sus efectos en la salud y el ambiente, se ha restringido su uso y en algunos casos han sido removidos del mercado [10] [4].

El desarrollo de alternativas al uso de plaguicidas ha sido una prioridad para los investigadores durante los últimos años. En esta línea, ha habido un creciente reconocimiento de la función de algunos enemigos naturales para combatir los nematodos parásitos de las plantas, entre ellos, el control biológico por medio de hongos nematófagos el cual ha demostrado tener potencial para ser integrado en los programas de manejo [11] [12].

A pesar de haber demostrado su potencial, en las investigaciones sobre el uso de hongos nematófagos se han obtenido resultados variables, y aunque se han realizado numerosas investigaciones, solamente se han estudiado en detalle un reducido grupo de especies, de las cuales muy pocas se han desarrollado como productos para el control biológico [12]. En [13], atribuyen estas limitaciones al escaso conocimiento sobre la biología y ecología de los hongos, que son determinantes para establecer los factores clave que afectan su eficacia como agentes biocontroladores, y proponen realizar más investigación para reducir la falta de información.

En Costa Rica, la diversidad de hongos existente en los ecosistemas naturales y agrícolas del país, es indicadora del potencial para utilizar los nematófagos como medio de control biológico, y la capacidad de cepas de hongos para controlar nematodos ya ha sido demostrada [14] [15].

Por estas razones, el objetivo de la presente investigación fue determinar la capacidad nematófaga de diez cepas de hongos sobre los fitonematodos *Meloidogyne exigua*, *Meloidogyne incognita* y *Radopholus similis*, mediante un ensayo *in vitro*, los resultados obtenidos serán el

punto de partida para la realización de investigaciones posteriores en campo y laboratorio, que permitan el desarrollo de productos eficientes e inocuos para el control de nematodos.

Materiales y métodos

Selección y reactivación de los hongos

Las cepas de los hongos que fueron objeto de este estudio se aislaron del suelo de plantaciones de piña, plátano y arroz en la Región Huetar Norte, en el año 2010. Las mismas habían sido identificadas a nivel de género por sus características morfológicas y se mantenían almacenadas en aceite mineral.

Una selección de veinte de estas cepas fue reactivada y colocada en medio PDA para su crecimiento y multiplicación según la metodología propuesta por [16]. Se procuró incluir hongos aislados de todos los cultivos, y se evitó incluir cepas que podrían tratarse de duplicados (hongos aislados de una misma plantación y pertenecientes al mismo género).

Seguidamente y antes de iniciar los ensayos, un duplicado de cada hongo fue enviado al Laboratorio de Técnicas Moleculares Aplicadas a la Fitoprotección, del Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos, de la Universidad de Costa Rica, para confirmar su identidad mediante secuenciación de una región del gen ITS.

Entre las cepas reactivadas, diez fueron seleccionadas para estudiar su patogenicidad sobre los nematodos (cuadro 1), la selección se realizó tomando en cuenta la diversidad de cultivos y lugares de muestreo de los que provinieran. Además, únicamente se probaron hongos en los que se logró confirmar la identificación morfológica a través de técnicas moleculares.

Cuadro 1. Hongos aislados de plantaciones de piña, plátano y arroz en la Región Huetar Norte, y que fueron seleccionados para evaluar su potencial nematófago en pruebas *in vitro*.

Hongo	Cultivo	Lugar de muestreo
<i>Hypocrea virens</i>	piña	Pital
<i>Penicillium janthinellum</i>	piña	Guatuso
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	plátano	Fortuna
<i>Gliocladium roseum</i>	piña	Guatuso
<i>Trichoderma asperellum</i>	plátano	Fortuna
<i>Monacrosporium megalosporum</i>	plátano	Fortuna
<i>Fusarium oxysporum</i>	piña	Guatuso
<i>Trichoderma spirale</i>	piña	Pital
<i>Trichoderma asperellum 2</i>	piña	Guatuso
<i>Gongronella butleri</i>	piña	Talamanca

Establecimiento de poblaciones de nematodos

Previo a la preparación de las pruebas de patogenicidad se establecieron poblaciones puras de *Radopholus similis*, *Meloidogyne incognita* y *M. exigua*. Las poblaciones de *R. similis* se establecieron en discos estériles de zanahoria (*Daucus carota*) según la metodología

propuesta por [17], los discos de zanahoria con la población inicial fueron proporcionados por el Laboratorio de Nematología de la Corporación Bananera Nacional.

Por otro lado, las poblaciones de *M. incognita* y *M. exigua* fueron establecidas en plántulas de tomate y café respectivamente que fueron inoculadas con huevos obtenidos de plantaciones infectadas.

Una vez establecidas las poblaciones, la identidad de las especies fue confirmada por análisis molecular mediante PCR-RFLP, utilizando el protocolo descrito por [18].

Durante la realización de las pruebas de patogenicidad se prepararon suspensiones de nematodos y huevos a partir de las poblaciones establecidas. Los discos de zanahoria se lavaron con agua destilada estéril, y por otro lado, de las raíces de tomate y café fueron extraídos y a la vez desinfectados huevos y juveniles de *M. incognita* y *M. exigua* separadamente, con una solución de NaOHCl al 0,5% según la metodología propuesta por [19].

Pruebas de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad se realizaron utilizando la metodología descrita por [14]. Platos petri con agar agua fueron inoculados con 200 µl de una solución de esporas (5 000 a 7 500 esporas/µl), que fue distribuida en toda la placa con una espátula de Drigalski.

Los platos Petri se incubaron por cuatro días a 25°C y fotoperiodo de 12 horas. Transcurridas 96 horas, se depositó 0,5 ml de una suspensión conteniendo 150 individuos y 100 huevos del nematodo de interés. Las cajas se incubaron por cuatro días más en oscuridad a 25°C.

Pasado este tiempo se evaluó cada plato petri en un microscopio Olympus BX 51 para verificar la capacidad depredadora de cada aislamiento mediante la presencia de individuos muertos y huevos parasitados, y se calculó el porcentaje de mortalidad en cada repetición.

Para cada hongo y especie de nematodo se prepararon 10 repeticiones. Además se prepararon 5 platos inoculados con el hongo y cinco platos control (sólo con nematodos y huevos).

Cada prueba fue trabajada de forma individual tanto para cada hongo como para cada especie de nematodo. Todas las pruebas se realizaron de forma independiente por tal razón no se realizaron comparaciones entre ellas.

Basado en resultados obtenidos por otros autores se consideró como hongos con potencial nematófago para controlar *M. incognita*, *M. exigua* o *R. similis* aquellos que cumplieran lo siguiente:

1. Porcentajes de mortalidad de nematodos significativamente mayores que las de su respectivo testigo, según las pruebas estadísticas.
2. Porcentaje de mortalidad sobre los nematodos o porcentaje de huevos parasitados mayor a un 50%.

Para determinar diferencias entre el porcentaje de mortalidad del tratamiento y el de su respectivo control, se realizó un análisis de varianza entre objetos de un solo factor.

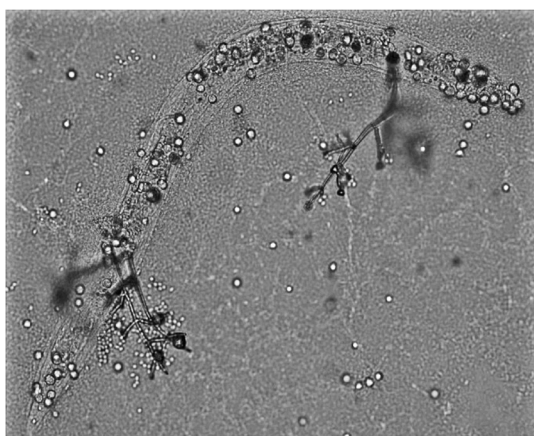
Resultados y discusión

Según los criterios establecidos en la metodología, para establecer el potencial nematófago de los hongos, las cepas de *H. virens* y *P. janthinellum* no presentaron actividad nematocida contra ninguna de las especies de nematodos (cuadro 2, 3 y 4).

M. megalosporum, *T. spirale* y *T. asperellum 2* presentaron actividad nematocida en las pruebas realizadas contra *R. similis* y *M. exigua*. Mientras que *G. roseum* y *F. oxysporum* mostraron actividad únicamente en contra de *R. similis* (cuadros 2 y 3, figura 1).

Cuadro 2. Porcentajes de mortalidad estimados de *Radopholus similis*, en pruebas *in vitro*, con hongos nematófagos aislados de plantaciones de piña, plátano y arroz en la Región Huetar Norte (Valores con asterisco (*) son significativamente mayores que el testigo ($p < 0,05$)).

Hongo	Porcentaje	
	nematodos muertos	nematodos muertos en el testigo
<i>Hypocrea virens</i>	21,0	9,4
<i>Penicillium janthinellum</i>	31,6	27,2
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	37,2*	14,0
<i>Gliocladium roseum</i>	54,1*	31,8
<i>Trichoderma asperellum</i>	45,2*	24,2
<i>Monacrosporium megalosporum</i>	76,4*	35,8
<i>Fusarium oxysporum</i>	72,0*	48,4
<i>Trichoderma spirale</i>	59,7*	35,1
<i>Trichoderma asperellum 2</i>	71,3*	47,1
<i>Gongronella butleri</i>	38,3	25,5



A



B

Figura 1. Individuos de *Radopholus similis* parasitados por aislamientos de *Trichoderma asperellum* proveniente de una plantación de piña en la localidad de Guatuso (A) y *Monacrosporium megalosporum* proveniente de una plantación de plátano en la localidad de La Fortuna (B) (Fotos Laboratorio de Nematología, ITCR, San Carlos, 2014).

En las pruebas realizadas contra *Radopholus similis*, las cepas de *Monacrosporium megalosporum*, *Trichoderma asperellum 2* y *Fusarium oxysporum*, evaluadas demuestran un potencial para el control de este nematodo con porcentajes de mortalidad mayores al 70%.

Además de *M. megalosporum*, *T. spirale* y *T. asperellum 2*, *T. asperellum* y *G. butleri* también mostraron potencial de control en contra de *M. exigua*, estos dos últimos no mostraron actividad nematocida en las pruebas realizadas con *R. similis* y *M. incognita*.

Cuadro 3. Porcentajes de mortalidad estimados de *Meloidogyne exigua*, en pruebas *in vitro*, con hongos nematófagos aislados de plantaciones de piña, plátano y arroz en la Región Huetar Norte (Valores con asterisco (*) son significativamente mayores que el testigo ($p < 0,05$)).

Hongo	Porcentaje		
	nematodos muertos	nematodos muertos en el testigo	huevos parasitados
<i>Hypocrea virens</i>	47,2	39,2	29,9
<i>Penicillium janthinellum</i>	58,1	48,9	33,6
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	66,7	60,5	73,9
<i>Gliocladium roseum</i>	72,0	87,8	0
<i>Trichoderma asperellum</i>	60,3*	48,3	36,4
<i>Monacrosporium megalosporum</i>	50,3*	34,8	56,8
<i>Fusarium oxysporum</i>	60,0	53,5	53,7
<i>Trichoderma spirale</i>	71,0*	57,2	18,8
<i>Trichoderma asperellum</i>	66,7*	46,2	46,1
<i>Gongronella butleri</i>	58,6*	45,0	48,3

Ninguna de las cepas cumple con lo establecido para considerarla con actividad nematocida contra juveniles de *M. incognita*, únicamente con *T. asperellum 2* se obtuvieron porcentajes de mortalidad significativamente mayores que los del testigo, sin embargo, este porcentaje no alcanza el 50%, es de apenas un 43% (cuadro 4).

Por otro lado, *P. lilacinus* y *F. oxysporum* mostraron capacidad para parasitar huevos de las dos especies de *Meloidogyne* evaluadas. Además, *T. asperellum* y *T. spirale* parasitaron un porcentaje de huevos de *M. incognita* mayor al 70%, y *M. megalosporum* parasitó un 56% de los huevos de *M. exigua* (figura 2).

En las pruebas realizadas contra *Meloidogyne incognita* y *M. exigua*, es notable el porcentaje de parasitación de huevos observado en las pruebas realizadas con *Paecilomyces lilacinus* y *Trichoderma asperellum*, mayores al 80%, además de que se observaron altos porcentajes de mortalidad de juveniles en las pruebas realizadas con *Trichoderma spirale*, *Trichoderma asperellum* y *Fusarium oxysporum*.

Los porcentajes de mortalidad obtenidos en estos ensayos están cercanos a los determinados en ensayos similares. Por ejemplo [20] determinaron porcentajes de parasitación de *P. lilacinus* sobre masas de huevos de *Meloidogyne javanica*, entre 45 y 52% después de tres semanas de inoculación.

Cuadro 4. Porcentajes de mortalidad estimados de *Meloidogyne incognita*, en pruebas *in vitro*, con hongos nematófagos aislados de plantaciones de piña, plátano y arroz en la Región Huetar Norte (valores con asterisco (*)

son significativamente mayores que el testigo ($p < 0,05$).

Hongo	Porcentaje		
	nematodos muertos	nematodos muertos en el testigo	huevos parasitados
<i>Hypocrea virens</i>	3,0	2,5	4,3
<i>Penicillium janthinellum</i>	5,8	6,0	0
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	15,2	15,2	84,3
<i>Gliocladium roseum</i>	10,7	11,8	31,0
<i>Trichoderma asperellum</i>	15,7	12,4	82,6
<i>Monacrosporium megalosporum</i>	24,8	17,2	24,0
<i>Fusarium oxysporum</i>	42,9	35,6	52,8
<i>Trichoderma spirale</i>	42,7	32,8	73,3
<i>Trichoderma asperellum*</i>	42,9	27,8	38,3
<i>Gongronella butleri</i>	26,8	28,5	1,1

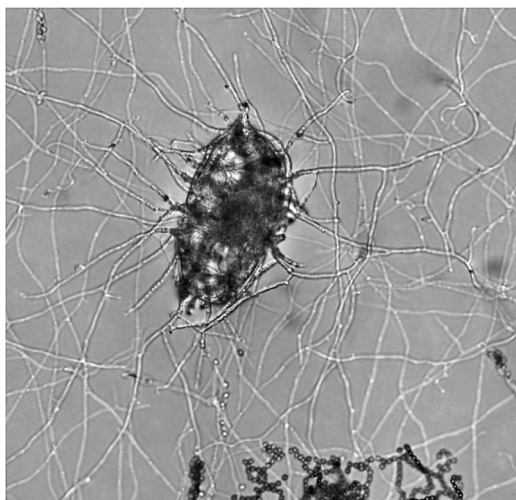


Figura 2. Huevo de *Meloidogyne incognita* parasitado por un aislamiento de *Paecilomyces lilacinus* proveniente de una plantación de plátano en la localidad de La Fortuna. (Fotos Laboratorio de Nematología, ITCR, San Carlos, 2014).

[14] también obtuvieron porcentajes de mortalidad-parasitación mayores al 60% con dos cepas de *Monacrosporium* y *Trichoderma*, y porcentajes de parasitación de huevos cercanos al 50% con tres diferentes cepas de *P. lilacinus*, una de *F. oxysporum* y varias de *Trichoderma*.

También [21], determinaron porcentajes de parasitación de *T. viride* y *P. lilacinus* sobre *M. incognita* de 60% y 25% respectivamente en pruebas *in vitro*. Además ambos hongos disminuyeron la eclosión en más de un 40% y *P. lilacinus* parasitó el 70% de los huevos después de una semana de realizada la inoculación

Todos los hongos estudiados en esta investigación que tienen potencial para el control de nematodos ya han sido reportados como hongos nematófagos por otros autores, a excepción de *Gongronella butleri*.

Trichoderma ha sido ampliamente estudiado y se reconoce como parasitador de nematodos y otros organismos, siendo un hongo antagonista muy agresivo. Cepas específicas se han utilizado en el control de otros hongos, insectos y además nematodos [22]. Se cree que su capacidad de controlar nematodos se debe a la producción de nematotoxinas, tales metabolitos ya han sido aislados [23] [24].

Monacrosporium es reconocido por ser un hongo que forma trampas que le permiten parasitar nematodos vivos, la formación de trampas es estimulada por condiciones ambientales o compuestos liberados por los nematodos [25], además se ha determinado que también produce proteasas con efecto nematocida [26].

La capacidad de *Fusarium oxysporum* de parasitar nematodos también se basa en la producción de compuestos nematotóxicos, mismos que ya han sido aislados y probados para el control de diversas especies de nematodos [27] [28]. Además tiene la ventaja de comportarse como un hongo endofítico, por lo que su actividad ya ha sido comprobada contra nematodos endoparásitos [29].

Paecilomyces lilacinus es uno de los hongos más utilizados para control biológico, y ha sido ampliamente estudiado como parasitador de huevos de nematodos [30], su efecto se basa en su capacidad quitinolítica que destruye la quitina en la cubierta de los huevos de los nematodos [31], además se han aislado compuestos nematocidas de algunas cepas [32].

Gliocladium roseum y *Gongronella butleri*, son hongos sin actividad nematocida reconocida. De algunas cepas de *G. roseum*, se han aislado compuestos nematocidas [32] [33]. En el caso de *G. butleri* se conoce que produce una gran cantidad de quitosano, que se utiliza en agricultura como estimulante del crecimiento y la inmunidad, sin embargo las referencias a su capacidad nematocida son casi nulas [34].

Conclusiones

Entre los hongos evaluados, únicamente las cepas de *Hypocrea virens* y *Penicillium janthinellum* no presentaron actividad nematocida en ninguna de las pruebas.

Las cepas evaluadas de *Monacrosporium megalosporum*, *Trichoderma* spp., *Fusarium oxysporum* y *Paecilomyces lilacinus*, demostraron buen potencial para el control de diferentes estadios de *Meloidogyne* incognita, *M. exigua* y *Radopholus similis*.

Los porcentajes obtenidos de mortalidad y parasitación de huevos, son similares a los apuntados en estudios similares, además se logró determinar causalidad entre la mortalidad y parasitación de los nematodos y la presencia de las cepas evaluadas.

El potencial demostrado por estas cepas para el control de nematodos debe ser probado en posteriores investigaciones en invernadero y campo. Según [30] [26] [35] es indiscutible la importancia de las pruebas *in vitro* para aislar los factores que pudieran afectar el establecimiento de relaciones de causalidad, pero, una vez establecida tal causalidad es necesario realizar pruebas en el campo, ya que la temperatura, la densidad de inóculo, las fuentes de carbono y otras condiciones afectan directamente la eficiencia de los hongos nematófagos como controladores.

Por otro lado, las pruebas *in vitro* realizadas aportan importante información, que puede ser utilizada con ayuda de técnicas moleculares, para la obtención de hongos más patogénicos. Como ya lo apuntan otros autores [36], es posible de desarrollar cepas altamente eficientes en el control, y resistentes a diferentes condiciones ambientales, además de identificar los genes relacionados con la patogenicidad que permitan entender mejor los mecanismos moleculares y evolucionarios de la interacción hongos-nematodos.



Bibliografía

- [1] S. Casas-Flores & A. Herrera-Estrella, "Antagonism of Plant Parasitic Nematodes by Fungi". En C. P. Kubicek, I. S. Druzhinina, & K. Esser (Ed.), *The Mycota: Environmental and Microbial Relationships* (Vol. 4, págs. 147-158). Berlin: Springer Science & Business Media. 2007.
- [2] M. Araya & T. Moens, "Los nematodos parásitos de *Musa* AAA (Subgrupo Cavendish cvs. "Grand Nain", "Valery" y "Williams")", en D. W. Turner, & F. E. Rosales (Ed.), Simposio Internacional: Sistema radical del banano: hacia un mejor conocimiento para su manejo productivo. San José, 2003, pp. 57.
- [3] V. Bravo, E. de la Cruz *et al.*, "Uso de plaguicidas en cultivos agrícolas como herramienta para el monitoreo de peligros en salud", *Uniciencia*, vol.27, no.1, pp. 351-376, 2013.
- [4] L. A. Pocasangre *et al.*, "Hongos endofíticos como agentes de control de fitonematodos en banano", en *XVII Reunión Internacional para la Cooperación de la Investigación en Banano en el Caribe y América Tropical. Banano un negocio sustentable*, Santa Catarina. 2006, pp. 249-254.
- [5] C. A. Gauggel *et al.*, "La problemática del deterioro radical del banano y su impacto en la producción: Experiencia en América Latina". En D. W. Tuner, & F. E. Rosales (Ed.), *Sistema Radical del Banano: hacia un mejor conocimiento para su manejo productivo*. Memorias de un Simposio Internacional, San José. 2003, pp. 13.
- [6] M. Moens *et al.*, "*Meloidogyne* species – a diverse group of novel and important plant parasites". En CAB International, R. N. Perry, M. Moens, & J. L. Starr (Edits.), *Root knot nematodes*. Wallingford, UK, 2009, pp. 1-17.
- [7] W. Salazar & T. Guzman, "Efecto de poblaciones de *Meloidogyne* sp. en el desarrollo y rendimiento del tomate". *Agronomía Mesoamericana*, vol.24, no.2, pp. 419-426, 2013.
- [8] V. P. Campos & L. Villain, "Nematode parasites of coffee and cocoa". En M. Luc, R. A. Sikora, & J. Bridge (Edits.), *Plant parasitic nematodes in subtropical and tropical agriculture* (Segunda ed., págs. 529-579). CAB International. 2005.
- [9] D. H. Barbosa *et al.*, "Effect of graft and *Meloidogyne exigua* (nemata) infestation on coffee's root growth and yield", *Coffee Science*, vol.9, no.4, pp. 427-434, 2014.
- [10] G. Saxena, "Biocontrol of nematode-borne diseases in vegetable crops". En K. G. Mukerji (Ed.), *Fruit and Vegetable Diseases*, Springer Netherland, 2004, pp. 397-450.
- [11] L. V. López *et al.*, "Mode of action and interactions of nematophagous fungi". En A. Ciancio, & K. G. Mukerji (Edits.), *Integrated management and biocontrol of vegetable and grain crops nematodes*, Springer Netherlands, 2008, pp. 51-76.
- [12] L. Gómez & L. Hidalgo, "Hongos nematófagos como agentes de control biológico". *Revista de Protección Vegetal*, vol.15, no.1, pp. 1-6, 2000.
- [13] H. Jansson & L. V. López, "Control of nematodes by fungi". En D. K. Arora (Ed.), *Fungal biotechnology in agricultural, food, and environmental applications*, Marcel Dekker, Inc., 2004, pp. 205-215.
- [14] W. Peraza *et al.*, "Evaluación *in vitro* de hongos nematófagos en zonas arroceras de Costa Rica contra el nematodo agallador *Meloidogyne javanica*", *Agronomía Costarricense*, vol.38, no.2, pp. 19-32, 2014.
- [15] N. Soto *et al.*, "In-vitro predatory activity of nematophagous fungi from Costa Rica with potential use for controlling sheep and goat parasitic nematodes", *Revista de Biología Tropical*, vol.59, no.1, pp. 37-52, 2011.
- [16] R. A. Humber, "Fungi: Preservation of Cultures", en L. Lacey (Ed.), *Manual of Techniques in Insect Pathology*, Academic Press, pp. 269-278, 1997.
- [17] D. T. Kaplan & E. L. Davis, "Improved nematode extraction from carrot disk culture", *Journal of Nematology*, vol.22, no.3, pp. 399, 1990.
- [18] T. O. Powers & T. S. Harris, "A polymerase chain reaction method for identification of five major *Meloidogyne* species", *Journal of Nematology*, vol.25, no.1, pp. 1-6, 1993.
- [19] K. R. Barker, "Nematode extraction and bioassays. An advanced treatise on *Meloidogyne*", en K. R. Barker, C. C. Carter, & J. N. Sasser (Edits.), *Dept. of plant pathology*, North Carolina State University, 1985.
- [20] A. A. Mokbel & A. A. Alharbi, "Suppressive effect of some microbial agents on root-knot nematode, *Meloidogyne javanica* infected eggplant", *Australian Journal of Crop Science*, vol.8, no.10, pp. 1428-1434, 2014.
- [21] B. K. Goswami & A. Mittal, "Management of root-knot nematode infecting tomato by *Trichoderma viride* and *Paecilomyces lilacinus*", *Indian Phytopathology*, vol.57, no.2, pp. 235-236, 2004.
- [22] R. Hermosa *et al.*, "Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes", *Microbiology*, vol.158, no.1, pp. 17-25, 2012.

- [23] T. Benítez *et al.*, "Biocontrol mechanism of *Trichoderma* strains", *International Microbiology*, vol.7, no.4, pp. 249-260, 2004.
- [24] Z. Yang *et al.*, "Nematicidal effect of volatiles produced by *Trichoderma* sp.", *Journal of Asia-Pacific Entomology*, vol.15, no.4, pp. 647-560, 2012.
- [25] K. M. Andersson *et al.*, "Characterization of the proteome of the nematode-trapping cells of the fungus *Monacrosporium haptotylum*", *Applied and environmental microbiology*, vol.79, no.16, pp. 4993-5004, 2013.
- [26] F. E. Soares *et al.*, "In vitro activity of a serine protease from *Monacrosporium thaumasium* fungus against first-stage larvae of *Angiostrongylus vasorum*", *Parasitology Research*, vol.110, no.6, pp.2423-2427, 2012.
- [27] H. R. Kwon *et al.*, "Nematicidal activity of bikaverin and fusaric acid isolated from *Fusarium oxysporum* against pine wood nematode, *Bursaphelenchus xylophilus*", *The Plant Pathology Journal*, vol.23, no.4, pp. 318-321, 2007.
- [28] A. Shimada *et al.*, "Nematicidal activity of beauvericin produced by the fungus *Fusarium bulbicola*", *Journal of biosciences*, vol.65, no.3, pp. 207-210, 2010.
- [29] A. A. Dababat & R. A. Sikora, "Influence of the mutualistic endophyte *Fusarium oxysporum* 162 on *Meloidogyne incognita* attraction and invasion", *Nematology*, vol.9, no.6, pp. 771-776, 2007.
- [30] S. Kiewnick & R. A. Sikora, "Evaluation of *Paecilomyces lilacinus* strain 251 for the biological control of the northern root-knot nematode *Meloidogyne hapla* Chitwood", *Nematology*, vol.8, no.1, pp. 69-78, 2006.
- [31] Y. Xiujuan *et al.*, "Chitinases by *Paecilomyces lilacinus* and its studies in biocontrol of plant parasitic nematodes", *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, vol.22, no.1, pp. 86-89, 2000.
- [32] G. Li *et al.*, "Nematicidal substances from fungi", *Recent Patents on Biotechnology*, vol.1, no.3, pp. 212-233, 2007.
- [33] J. Y. Dong *et al.*, "Nematicidal epipolysulfanyldioxopiperazines from *Gliocladium roseum*", *Journal of natural products*, vol.68, no.10, pp. 1510-1513, 2005.
- [34] N. Nwe & W. F. Stevens, "Production of fungal chitosan by solid substrate fermentation followed by enzymatic extraction", *Biotechnology letters*, vol.24, no.2, pp. 131-134, 2002.
- [35] E. Pathak *et al.*, "Use of real-time PCR to discriminate parasitic and saprophagous behaviour by nematophagous fungi", *Fungal biology*, vol.116, no.5, pp. 563-573, 2012.
- [36] J. Yang *et al.*, "Genomic and proteomic analyses of the fungus *Arthrobotrys oligospora* provide insights into nematode-trap formation", *PLoS pathogens*, vol.7, no.9, pp. 1-12, 2011.