



**UNIVERSIDAD EARTH**

**ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO DEL EM5 SOBRE LOS HONGOS  
*Colletotrichum* Y *Fusarium*, CAUSANTES DE LA PUDRICIÓN DE CORONA  
EN BANANO DE LA REGIÓN ATLÁNTICA DE COSTA RICA**

**Marlon Alberto Vintimilla y Laura Matilde Ávila Segura**

**Trabajo de Graduación presentado como requisito parcial para optar al título  
de Ingeniero(a) Agrónomo(a) con el grado de Licenciatura**

**Guácimo, Costa Rica**

**Diciembre, 2001**

Trabajo de Graduación presentado como requisito parcial para optar al título de  
Ingeniero(a) Agrónomo(a) con el grado de Licenciatura

Profesor Asesor

\_\_\_\_\_  
Fritz Elango, Ph. D.

Profesor Coasesor

\_\_\_\_\_  
Pánfilo Tabora, Ph. D.

Decano

\_\_\_\_\_  
Daniel Sherrard, Ph.D.

Candidato(a)

\_\_\_\_\_  
Laura Matilde Ávila Segura

Candidato(a)

\_\_\_\_\_  
Marlon A. Vintimilla Sigüenza

Diciembre, 2001

## DEDICATORIA

*Dedico el esfuerzo y cariño invertido en esta investigación a mis padres y hermanos. Gracias por su incondicional amor, apoyo y confianza.*

**Laura**

*El trabajo y tiempo empleado en este trabajo, lo dedico con todo el cariño por su apoyo incondicional a mis padres, hermano y hermanas.*

**Marlon**

## **AGRADECIMIENTO**

A Dios por brindarnos la oportunidad y los medios para realizar nuestros sueños.

Agradecemos a nuestras familias, por su apoyo durante estos cuatro años de carrera.

A nuestros profesores asesores, Fritz Elango y Pánfilo Tabora, al dirigirnos en la realización de este estudio.

Al profesor Shuichi Okumoto, por el apoyo en el establecimiento de la metodología y búsqueda de información, para analizar los resultados de la investigación.

A nuestros profesores a lo largo de estos cuatro años, quienes nos han instruido y brindado las herramientas para crecer como personas y profesionales.

A nuestros queridos amigos, por todos los momentos especiales que compartimos y no olvidaremos.

A los donates, por creer en mí y ayudarme a cumplir esta meta. – *Laura*

## RESUMEN

La pudrición de la corona, la principal enfermedad postcosecha, causante de reducción en la calidad del banano de exportación y generalmente ha sido controlada mediante fungicidas sintéticos. Este trabajo evaluó al nivel de laboratorio y postcosecha el comportamiento de tres concentraciones de una mezcla de microorganismos benéficos (EM5) con y sin una cera (Verdiol al 2.5%), sobre los hongos *Colletotrichum* y *Fusarium* causantes de la pudrición de corona en banano. Utilizando concentraciones de EM5 al 20%, 5% y 1% en el laboratorio, se obtuvo un excelente control del crecimiento del micelio, debido a la competencia por espacio físico y generación de compuestos antagónicos no identificados, sin influencia alguna del pH. Sin embargo, existió una pobre inhibición de la germinación de las esporas, alrededor de 19% de inhibición en *Fusarium* y 23% en *Colletotrichum*. En el estudio postcosecha, los tratamientos con EM5 no redujeron la aparición de lesiones y pudrición en la corona. Se recomienda profundizar en la investigación de los compuestos presentes en el EM5 y su modo acción sobre hongos patógenos.

**Palabras claves:** banano, pudrición de corona, EM5, *Colletotrichum*, *Fusarium*, laboratorio y postcosecha.

Ávila, L; Vintimilla, M. 2001. Estudio del comportamiento de EM5 sobre hongos *Colleotrichum* y *Fusarium*, causantes de la pudrición de corona en banano de la Región Atlántica de Costa Rica. Proyecto de Graduación. Guácimo, C.R., Universidad EARTH. 79 p.

## ABSTRACT

Crown rot is the main postharvest disease of bananas, and it is mostly controlled through the use of fungicides. This study evaluated three concentrations of EM5 (a mixed culture of beneficial microorganisms) with and without a wax (Verdiol 2.5%), on the control of two fungal pathogens of crown rot - *Colletotrichum* and *Fusarium*. Results showed that mycelial growth of both pathogens was inhibited by EM5 at 20%, 5% and 1% through competition for space and through the production of unidentified antagonistic compounds. Mycelial inhibition was not proven to be due to EM5's pH factor. Moreover, EM5 did not inhibit spore germination, nor did it reduce the severity of crown rot in postharvest experiments.

**Key Words:** banana, crown rot, EM5, *Colletotrichum*, *Fusarium*, laboratory and postharvest.

Ávila, L; Vintimilla, M. 2001. Estudio del comportamiento de EM5 sobre hongos *Colletotrichum* y *Fusarium*, causantes de la pudrición de corona en banano de la Región Atlántica de Costa Rica. Proyecto de Graduación. Guácimo, C.R., Universidad EARTH. 79 p.

## TABLA DE CONTENIDO

	Página
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
RESUMEN .....	v
ABSTRACT .....	vi
TABLA DE CONTENIDO.....	vii
LISTA DE CUADROS .....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE ANEXOS .....	xii
1 INTRODUCCIÓN .....	1
2 OBJETIVOS.....	2
2.1 OBJETIVO GENERAL .....	2
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	2
3 REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
3.1 POSTCOSECHA EN BANANO.....	4
3.1.1 Fisiología poscosecha .....	4
3.1.2 Enfermedades y deterioro .....	5
3.1.3 Patógenos causantes de la pudrición de corona.....	5
3.2 TRATAMIENTOS UTILIZADOS EN EL CONTROL DE LA PUDRICIÓN DE CORONA EN BANANO .....	8
3.2.1 Control convencional.....	8
3.2.2 Tratamientos hidrotérmicos .....	9
3.2.3 Remoción de flores y hojas .....	9
3.2.4 Biocontrol .....	9
3.2.5 Uso de ceras .....	11
3.3 DESCRIPCIÓN DE ALGUNOS PRODUCTOS ORGÁNICOS Y CONVENCIONALES .....	11
3.3.1 Biocto 6 .....	11

3.3.2	Verdiol .....	12
3.3.3	EM 1 .....	12
3.3.4	EM5.....	14
3.3.5	Merteck 22 SL .....	15
4	MATERIALES Y MÉTODOS .....	16
4.1	UBICACIÓN .....	16
4.2	METODOLOGÍA DE LABORATORIO.....	17
4.2.1	Obtención de los cultivos puros de hongos .....	17
4.2.1.1	Aislamiento de los agentes causales .....	18
4.2.1.2	Esterilización del tejido .....	18
4.2.1.3	Incubación de tejidos infectados .....	18
4.2.2	Estudio de patogenicidad .....	19
4.2.2.1	Preparación de la suspensión de esporas .....	19
4.2.2.2	Inoculación de coronas .....	20
4.2.2.3	Mediciones .....	20
4.2.3	Efectos de los productos sobre el crecimiento de los patógenos (% de inhibición).....	20
4.2.3.1	Preparación de EM5.....	20
4.2.3.2	Experimento .....	20
4.2.4.1.1	Mediciones .....	21
4.2.4	Mecanismo de acción del EM5.....	22
4.2.4.1	Filtración.....	22
4.2.4.2	Experimentos .....	22
4.2.4.2.1	Acción Enzimática en la germinación de esporas de Colletotrichum y Fusarium .....	22
4.3	METODOLOGÍA POSTCOSECHA .....	24
4.3.1	Evaluaciones .....	26
4.4	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	26
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	28
5.1	ESTUDIO DE PATOGENICIDAD.....	28



5.2	ANÁLISIS DE LABORATORIO .....	29
5.2.1	Crecimiento del diámetro y porcentaje de inhibición .....	29
5.2.1.1	Comportamiento de Fusarium .....	30
5.2.1.2	Comportamiento de Colletotrichum .....	34
5.2.2	Acción Enzimática en la germinación de esporas de Colletotrichum y Fusarium .....	38
5.3	ANÁLISIS POSTCOSECHA .....	41
5.3.1	Grado de Pudrición de las coronas y porcentaje de inhibición de los tratamientos. ....	41
6	CONCLUSIONES .....	48
7	RECOMENDACIONES .....	49
8	LITERATURA CITADA.....	50
9	ANEXOS .....	54

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
Cuadro 1. Tratamientos para prueba de patogenicidad .....	19
Cuadro 2. Tratamientos para controlar el crecimiento del micelio.....	21
Cuadro 3. Tratamientos para prueba de acción enzimática .....	22
Cuadro 4. Tratamientos postcosecha.....	26
Cuadro 5. Grado de infección de las coronas* expuestas a los tratamientos de <i>Colletotrichum</i> (C), <i>Fusarium</i> (F) y ambos .....	28

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1. Diagrama de flujo (obtención de cultivos puros de los hongos) .....	17
Figura 2. Interacción entre <i>Fusarium</i> y bacterias presentes en EM5 .....	29
Figura 4. Porcentaje de inhibición en <i>Fusarium</i> , después de 96 horas .....	31
Figura 5. Fotografías del crecimiento de <i>Fusarium</i> en cajas Petri, después de 96 horas .....	33
Figura 6. Crecimiento del diámetro de <i>Colletotrichum</i> (cm), desde 0 hasta 96 horas .....	34
Figura 7. Porcentaje de inhibición en <i>Colletotrichum</i> , después de 96 horas .....	36
Figura 8. Fotografías del crecimiento de <i>Colletotrichum</i> en cajas Petri, después de 96 horas .....	37
Figura 9. Germinación de las esporas de <i>Colletotrichum</i> y <i>Fusarium</i> , después de 13 horas .....	38
Figura 10. Crecimiento del tubo germinativo de las esporas de <i>Colletotrichum</i> y <i>Fusarium</i> , después de 13 horas .....	39
Figura 11. Biceptación del tubo germinativo de las esporas de <i>Colletotrichum</i> y <i>Fusarium</i> , después de 13 horas .....	40
Figura 12. Pudrición de las coronas de banano, después de inoculadas con <i>Fusarium</i> .....	41
Figura 13. Inhibición de <i>Fusarium</i> frente a los tratamientos, al finalizar la prueba de postcosecha .....	43
Figura 14. Pudrición de las coronas de banano, después inoculadas con <i>Colletotrichum</i> .....	44
Figura 15. Porcentaje de inhibición de <i>Colletotrichum</i> y distribución Duncan de los tratamientos, al finalizar la prueba de postcosecha (después de 6 días) .....	45

## LISTA DE ANEXOS

Anexo	Página
Anexo 1. Dunnett para el crecimiento de <i>Fusarium</i> en la prueba de doble capa, después de 24 horas.....	55
Anexo 2. Dunnett para el crecimiento de <i>Fusarium</i> en la prueba de doble capa, después de 48 horas.....	55
Anexo 3. Duncan para el crecimiento de <i>Fusarium</i> en la prueba de doble capa, después de 48 horas.....	55
Anexo 4. Duncan para el crecimiento de <i>Fusarium</i> en la prueba de doble capa, después de 72 horas.....	56
Anexo 5. Media de pH de los tratamientos con agar Papa Dextrosa (PDA) .....	56
Anexo 6. Dunnett para el crecimiento de <i>Colletotrichum</i> en la prueba de doble capa, después de 96 horas.....	56
Anexo 7. Duncan para el crecimiento de <i>Colletotrichum</i> en la prueba de doble capa, después de 24 horas.....	57
Anexo 8. Duncan para el crecimiento de <i>Colletotrichum</i> en la prueba de doble capa, después de 48 horas.....	57
Anexo 9. Duncan para el crecimiento de <i>Colletotrichum</i> en la prueba de doble capa, después de 96 horas.....	57
Anexo 10. Duncan para el porcentaje de <i>Fusarium</i> en la prueba de doble capa, después de 24 horas.....	58
Anexo 11. Duncan para el porcentaje de germinación de las esporas de <i>Fusarium</i> , a las 13 horas de la prueba.....	58
Anexo 12. Duncan para el porcentaje de germinación de las esporas de <i>Colletrichum</i> , a las 13 horas de la prueba.....	59
Anexo 13. Duncan para el porcentaje de biceptación de las esporas de <i>Fusarium</i> , a las 13 horas de la prueba.....	59

Anexo 14. Duncan para el porcentaje de biceptación de las esporas de <i>Colletotrichum</i> , a las 13 horas de la prueba.....	60
Anexo 15. Duncan para grado de pudrición de corona con inóculo de <i>Fusarium</i> , al cuarto día de la prueba postcosecha .....	60
Anexo 16. Duncan para la pudrición de corona con inóculo de <i>Colletotrichum</i> , al quinto día de la prueba postcosecha.....	61
Anexo 17. Duncan para el porcentaje de inhibición de los tratamientos en la pudrición de corona causada por el <i>Colletotrichum</i> , al sexto día de la prueba postcosecha .....	61
Anexo 18. Correlaciones entre las diferentes variables evaluadas en los experimentos postcosecha .....	62
Anexo 19. Escala de evaluación de grado de maduración de banano.....	63
Anexo 20. Escala de evaluación del grado de pudrición de corona de banano.....	64
Anexo 21. Imágenes capturadas (ocular 10x) en el experimento de acción enzimática en esporas de <i>Colletotrichum</i> .....	65
Anexo 22. Imágenes capturadas (ocular 10x) en el experimento de acción enzimática en esporas de <i>Fusarium</i> . .....	66

# 1 INTRODUCCIÓN

La pudrición de la corona, es una de las principales enfermedades postcosecha y causa reducción en la calidad del banano de exportación (Slabaugh y Grove 1982). En la Zona Atlántica de Costa Rica, durante la época de mayo a septiembre, se presenta mayor incidencia de esta enfermedad, debido a que es el periodo con mayor precipitación.

El cultivo de banano en Costa Rica abarca cerca de 50.000 hectáreas y representa el 1% del territorio nacional, al mismo tiempo constituye uno de los principales productos agrícolas de exportación.

La conciencia acerca de los efectos sobre el ambiente y la salud humana por el uso de agroquímicos ha aumentado. A su vez se han ampliado los nichos de mercado para el banano orgánico, principalmente en países europeos. Las proyecciones afirman que el consumo de productos orgánicos va a aumentar y por ende las tecnologías orgánicas deben refinarse.

Tradicionalmente, para el control de las pudriciones postcosecha se ha hecho uso de la refrigeración y productos químicos. El hecho de la consecución de un mercado orgánico no significa que el mismo acepte producto de mala calidad, por lo cual es necesario aplicar tecnologías orgánicas a nivel postcosecha que la mantengan.

En este proyecto se pretendió estudiar en el laboratorio y postcosecha el comportamiento de los hongos causantes de la pudrición de corona frente a diferentes concentraciones de tratamientos orgánicos.

Este estudio se reúne con otros esfuerzos realizados por la Universidad EARTH, para desarrollar exitosas estrategias sostenibles en control del nemátodo *Radopholus similis* (Ufer 1997, Dubon 1998) y la Sigatoka Negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el comportamiento del EM5 sobre los hongos *Colletotrichum* y *Fusarium* causantes de la pudrición de corona en banano, al nivel de laboratorio y postcosecha.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la acción del EM5 sobre el crecimiento del micelio de los hongos patógenos de la pudrición de corona, en condiciones de laboratorio.
- Evaluar la acción enzimática del EM5 sobre la germinación de esporas y crecimiento de tubos germinativos de *Colletotrichum* y *Fusarium*.
- Determinar el control del EM5 y la mezcla EM5 más Verdiol sobre la pudrición de corona, a nivel postcosecha con condiciones favorables para los patógenos.
- Determinar la patogenicidad del *Colletotrichum* y *Fusarium*, en la pudrición de corona de banano.

### 3 REVISIÓN DE LITERATURA

Las grandes discusiones concernientes al uso y abuso de agroquímicos en la producción agrícola, han hecho necesario la investigación en nuevas tecnologías. Estas deben ser una alternativa para el manejo de las enfermedades, de una forma más amigable con el ambiente.

Una de las principales limitantes para la adaptación de alternativas menos destructivas es la mentalidad convencional, adecuada y limitada al uso de químicos. Dicha forma de pensar no solo se presenta en el productor, también se refleja en las exigencias del mercado. Sin embargo, es el mismo consumidor quien viene solicitando el uso de productos que sean menos riesgosos para la salud y el ambiente (Ciampa 2000, Asociación Naturland 2001, Willer y Yussefi 2001).

Es necesario contar con investigación y desarrollo de tecnologías, ya que el mercado guiado hacia la compra de productos más sanos está creciendo; de la mano con el movimiento proteccionista ambiental (García 1998).

Siendo el banano uno de los productos que ha incursionado dentro la producción orgánica y siendo de difícil manejo por la gran cantidad de problemas fitopatológicos existentes en los trópicos, se decidió trabajar en el estudio de nuevas alternativas menos contaminantes, para el manejo postcosecha de la pudrición de corona de la fruta. El uso de sustancias y métodos controladores es provechoso sobre todo en la etapa de conversión hacia una agricultura orgánica (Fundación Güilombé 1993).

La pudrición de la corona es considerada la principal enfermedad que afecta al banano a nivel postcosecha (Soto 1995).

La mayoría de las pudriciones postcosecha en banano son causadas por patógenos que son acarreados desde las plantaciones, en flores secas, brácteas y el fruto en sí. Por ello, la pudrición de la corona es una enfermedad que manifiesta



síntomas a nivel postcosecha, pero cuyos agentes causales son acarreados desde el campo.

En la planta de empaque de banano, las manos son introducidas en pilas, en donde las esporas de los hongos presentes en los frutos se dispersan en el agua e inoculan el tejido, penetrando a través de la herida de la corona (Arneson 1971, Slabaugh y Grove 1982).

La pudrición de la corona consiste en un ablandamiento y ennegrecimiento del tejido superficial en el corte de la corona, el cual se propaga hacia los pedicelos (González 1997). Este complejo de microorganismos causantes de la enfermedad crece rápidamente a temperaturas tropicales (entre 25 °C a 30 °C) y disminuye su tasa de desarrollo a bajas temperaturas, como las que se usan en los barcos de transporte del producto (13,3 °C a 13,5 °C). Se dice además que el periodo de tiempo que transcurre desde la cosecha hasta el enfriamiento es muy importante en el desarrollo de la enfermedad (Finlay y Brown 1993).

Las lesiones causadas por el hongo *Colletotrichum musae* son descritas como coronas suaves, secas y fibrosas, mientras que las causadas por el *Fusarium pallidoroseum* se observan más oscuras y firmes (Finlay y Brown 1993).

### **3.1 POSTCOSECHA EN BANANO**

#### **3.1.1 Fisiología poscosecha**

Se dice que la maduración es el aspecto más importante en el control de las pudriciones postcosecha (Labavitch y Lange 1995).

Usualmente el banano de exportación se embolsa y se crea vacío. Al limitar la entrada de oxígeno a las bolsas, el CO<sub>2</sub> se concentra y el O<sub>2</sub> disminuye. Una concentración de CO<sub>2</sub> mayor de 0,03% reduce la actividad respiratoria y con esto atrasa la maduración de la fruta. El CO<sub>2</sub> se une al receptor del etileno y bloquea la entrada del mismo, por lo tanto evita que este trabaje (Demerutis 2000).

Durante la maduración ocurre la hidrólisis de los almidones de la pulpa del banano produciendo azúcares, los cuales son compuestos utilizados por los microorganismos en su desarrollo y crecimiento (Shewfelt y Prusia 1995). En el proceso de maduración se generan enzimas, como la pectinasa y posiblemente fosfofructokinasa, las cuales varían la permeabilidad de las membranas celulares, provocando pérdida de humedad (Demerutis 2000). El agua libre puede crear un medio propicio para el desarrollo de los hongos causantes de la pudrición sobre la corona.

### **3.1.2 Enfermedades y deterioro**

El ataque de hongos y bacterias a nivel postcosecha provoca daños físicos, aumenta la pérdida de agua y la respiración. Cortes en la superficie del producto o puntos de abscisión naturales, permiten la entrada de hongos al mismo (FAO 1987).

En el periodo de almacenamiento, el producto envejece y los tejidos se debilitan por una degradación de la estructura celular. El producto se vuelve poco resistente a la invasión de organismos patógenos. La antracnosis es un ejemplo típico de tales infecciones latentes.

Además, algunos patógenos producen enzimas y toxinas que degradan la pared celular, originando sabores desagradables o reduciendo la aptitud del banano para ser consumido (Labavitch y Lange, 1995).

### **3.1.3 Patógenos causantes de la pudrición de corona**

En las Islas Canarias, fueron reportados como agentes causales de la pudrición de corona en banano, los hongos *Fusarium proliferatum*, ***Colletotrichum musae***, *Ceratocystis paradoxa*, *Verticillium theobromae*, *Botryodiplodia theobromae*, *Deightoniella torulosa* y otros (Hernández *et al.* 1987, citados por López y Marrero 1998).

En Centroamérica, se ha reportado que los patógenos más comunes son la asociación de *Fusarium roseum*, *Verticillium theobromae* y *Gloeosporium musarum*. En la fruta proveniente de Colombia y Ecuador, es común hallar el hongo *T. paradoxa* (Greene y Goos 1963).

La aparición de género del hongo va a depender de las temperaturas en que se halle refrigerado el fruto y de las condiciones ambientales imperantes en la zona.

En algunos experimentos donde se ha inoculado los patógenos al fruto, se ha encontrado que el *Thielaviopsis paradoxa*, *Botryodiplodia theobromae* y *Gloeosporium musarum* causan severas pudriciones. Pudriciones moderadas se encontraron en las coronas de las frutas inoculadas con *Deightonella torulosa*. *Fusarium roseum*, *Verticillium theobromae* y *Fusarium moniliforme* y causaron una pudrición débil cuando se inocularon por separado (Greene y Goos 1963).

Según Krauss (2001) en Costa Rica el principal patógeno de la pudrición de corona es el *Colletotrichum musae*. Según Umaña, citado por Rodríguez (1999), el principal patógeno es el *Fusarium semitectum*. Marín (1997) afirma que este último es el más patogénico, según algunas investigaciones realizadas en Costa Rica.

El género *Fusarium* pertenece a la clase Hypomycetes, subdivisión Moniliales, los cuales producen esporas asexuales sobre hifas expuestas (Elango 1999). El género *Colletotrichum*, pertenece a la subdivisión Melanconiales, los cuales forman conidios asexuales en acérvulos.

El género *Fusarium* posee muchas especies parasíticas a plantas. Este género produce microconidios y macroconidios. Los macroconidios son largos, multiseptados, curvados y por lo general nacen en una hifa. Los microconidios son unicelulares, esféricos u ovalados. Algunas especies pueden producir esclerótios. El *Colletotrichum*, anamorfo del género *Glomerella*, se ve influenciado por el ambiente para producir setas (Alexopoulos *et al.* 1996).

Las hifas de Ascomycetes, Basidiomycetes y Deuteromycetes son septadas con perforaciones. Algunos Deuteromycetes presentan muchos microporos. La extensión de las hifas conlleva el alargamiento de una pared primaria y la biosíntesis de compuestos de la pared, como la quitina. El crecimiento axial de la pared se ve limitado por el ápice de la hifa, el cual posee vesículas que segregan enzimas catalizadoras y biosintéticas. Hasta que estas vesículas no colapsen no se da el crecimiento pleno de las hifas. Estos hongos además son considerados altos productores de enzimas capaces de degradar la celulosa, lignina y queratina de la materia orgánica. Además, el género *Fusarium* puede producir micotoxinas y antibióticos (Carlile y Watkinson 1994).

Se ha comprobado que los tubos geminativos se pueden torcer cuando existen cargas eléctricas en el medio (Carlile y Watkinson 1994). Se supone que la producción de ramificaciones en las hifas, ocurre cuando los ápices de las hifas no consumen todos los nutrientes producidos por la extensión de las paredes celulares. Después de que se da el engrosamiento y crecimiento de la primer pared celular, puede ocurrir la formación de una pared secundaria (Carlile y Watkinson 1994).

Cuando una espora se halla sobre un medio agar, se produce la geminación. La hifa elonga exponencialmente, pero al alcanzar su máxima extensión en  $\text{mm h}^{-1}$ , su crecimiento sigue lineal. Si surgen ramificaciones, estas seguirán este mismo patrón. Posteriormente, la hifa y sus ramificaciones se transforman en micelio, el cual llega a ser una colonia (Carlile y Watkinson 1994).

El género *Fusarium* es capaz de crecer en medios anaeróbicos. Si la concentración de solutos en el agua que rodea las células aumenta, es posible que ocurra plasmólisis, con la consecuente desecación y muerte de la célula. El crecimiento radial de las colonias de hongos depende de la zona periférica de crecimiento y el porcentaje de crecimiento de esta zona. Generalmente, la temperatura óptima para la esporulación es más baja que aquella necesaria para

su crecimiento (Carlile y Watkinson 1994). Algunos hongos necesitan carbón y nitrógeno para germinar como el *Fusarium culmorum*.

Los tubos geminativos pueden tener tres tipos de orientación. La primer orientación es autotropismo, el cual se refiere a que si dos esporas están cercanas, los tubos pueden germinar en los extremos opuestos, lo cual indica poca competencia por nutrientes o pueden germinar en los extremos más cercanos, como ocurre con algunos Deuteromycotas. Un segundo efecto en la orientación es la respuesta chemotrópica, la cual se refiere al mayor o menor crecimiento respecto al gradiente químico. El siguiente efecto es el fototropismo, en el cual los hongos crecen buscando o evitando la luz (Carlile y Watkinson 1994).

### **3.2 TRATAMIENTOS UTILIZADOS EN EL CONTROL DE LA PUDRICIÓN DE CORONA EN BANANO**

#### **3.2.1 Control convencional**

Tradicionalmente, para controlar la pudrición de la corona, se ha utilizado un producto en el agua de lavado, para coagular el látex que exuda del corte. Usualmente, este producto es sulfato amónico de aluminio o “alumbre”. Posteriormente, se ha aplicado un fungicida como el thiabendazole o benzimidazole, llamado comercialmente como “Mertec” (Díaz *et al.* 1995, citado por Rodríguez 1999).

La concentración del fungicida aplicado ha ido variando con el tiempo y sigue dependiendo del destino de exportación del banano. Para el año de 1997 se aplicaba 400 ppm de thiabendazole y 1% de alumbre para mercados en los Estados Unidos de América y 600 ppm de thiabendazole y 1% de alumbre para mercados Europeos (Soto 1995, citado por Sasaki 1997).

Estudios realizados por De Lapeyre y Mourichon (1998), indican que el hongo *Colletotrichum musae*, reportado como uno de los causantes de la pudrición de la corona, ha desarrollado resistencia al thiabendazole.

### **3.2.2 Tratamientos hidrotérmicos**

López y Marrero (1998) reportaron que temperaturas de 45 a 47,5 grados centígrados, durante 15 a 30 minutos presentan buenos resultados en el control de los hongos *Fusarium proliferatum* y *Colletotrichum musae*, causantes de la enfermedad. Sin embargo, debe tenerse cuidado ya que temperaturas por encima de los 50 °C pueden provocar oscurecimiento de la cáscara de la fruta.

### **3.2.3 Remoción de flores y hojas**

Se ha practicado la remoción de brácteas de las flores y de hojas no funcionales, como un principio de control de la enfermedad (Slabaugh y Grove 1982). Se halló que los conidios y esporas de los hongos, encuentran en estas estructuras un medio para desarrollarse (De Lapeyre y Mourichon 1998).

### **3.2.4 Biocontrol**

La bacteria *Pseudomonas syringae* y las levaduras que aparecen naturalmente en la manzana y pera, son una opción como biocontroladores contra varios hongos patógenos que ocasionan el deterioro de las frutas en los procesos postcosecha. Por ejemplo, *Pseudomonas syringae*, específicamente la cepa ESC-11 es efectiva para reducir la pudrición de la corona en banano, producida por un complejo de hongos, incluyendo *Fusarium semitectum* y *Fusarium moniliforme* (Janisiewicz 2000).

El control biológico en la etapa de postcosecha tiene ventajas significativas en relación al biocontrol bajo condiciones de campo, ya que los dos factores más importantes que tienen que ver con el éxito del biocontrol son la temperatura, la humedad relativa constantes y la facilidad de acceso. Estos factores reducen la

variabilidad en el biocontrol, haciendo que el sistema sea más sencillo en cuanto a su manejo (Janisiewicz 2000).

La eficacia del biocontrol en postcosecha puede ser influido por tratamientos como la difenilamina y la etoxiquina, las cuales son empleadas en algunas frutas para prevenir escaldaduras y desórdenes fisiológicos.

El control biológico en postcosecha puede ser integrado con otros métodos en los cuales no se usen fungicidas, como infiltraciones de calcio y tratamientos con calor.

Otro tipo de controlador biológico es el EMX, aunque Rodriguez (1999) determinó que dosis de 5% y 10% no controlaron la pudrición de corona de banano a nivel postcosecha, bajo la metodología utilizada en su estudio. Además, estableció que durante la vida anaquel, el banano orgánico aumenta su grado de maduración y el testigo químico no lo hace.

La mashua (*Tropaeolum tuberosum*), es una planta que tiene propiedades bactericidas, nematocidas, fungicidas, insecticidas y repelentes de insectos (Arbizu y Tapia 1994, citados por Krauss y Soberanis 2000)

Krauss y Soberanis (2000), reportaron que el extracto acuoso de mashua retrasó la aparición de pudriciones postcosecha, al menos durante tres semanas en rodajas de plátano, yuca y semillas de cacao secas.

Según Demerutis (2000), al utilizar un producto orgánico a partir de semillas de cítricos, comercialmente conocido como Biocto 6, se obtuvo un control eficaz del hongo *Fusarium semitectum*, causante de la pudrición de la corona en banano. Específicamente con las concentraciones de 1 mL/L Biocto + Verdiol al 2,5% /L.

### **3.2.5 Uso de ceras**

Según Sasaki (1997), las ceras a nivel postcosecha tienen la función de reducir la pérdida de humedad, maduración, transpiración e infecciones. Además de ser vehículo para aplicación de fungicidas, reguladores de crecimiento y colorantes.

Algunos estudios han demostrado que radicales de oxígeno producto del metabolismo celular, poseen crítica importancia en el progreso de la enfermedad y desarrollo de los síntomas (Andrews y Tommerup 1993).

## **3.3 DESCRIPCIÓN DE ALGUNOS PRODUCTOS ORGÁNICOS Y CONVENCIONALES**

### **3.3.1 Biocto 6**

Es un fungicida, bactericida y viricida sistémico. Es 100% orgánico, biodegradable y se aplica para el control de enfermedades al nivel pre y postcosecha. El ingrediente activo principal es el extracto de semillas de cítricos y está compuesto además por ácido cítrico, ácido ascórbico y ácidos grasos. No es tóxico para humanos, animales o plantas, no provoca impactos negativos al ambiente (Biogenéticos 2001).

Es recomendable aplicar el Biocto 6, junto con una cera que reduzca la deshidratación del fruto y su tasa de respiración. Cuando el Biocto se aplica solo, los ácidos presentes inducen un incremento de los niveles de ADP y NAD, favoreciéndose la estimulación del catabolismo de los carbohidratos. Las enzimas que degradan estos carbohidratos simplificados incrementan la maduración del banano (Seymour, citado por Demerutis 2000). En la etapa de maduración la pectinasa y posiblemente fosfofructokinasa (enzimas), varían la permeabilidad de las membranas celulares, provocando pérdida de humedad (Demerutis 2000). El agua libre puede crear un medio propicio para el desarrollo de los hongos causantes de la pudrición de la corona.



### **3.3.2 Verdiol**

Es una cera constituida por una emulsión de ácidos grasos naturales (aceite de palma y cera de abejas), que forma una delgada capa protectora en frutos y plantas, evitando la penetración de patógenos y la deshidratación. Verdiol es 100 % natural y biodegradable, no contaminante del medio ambiente, atóxico para los seres humanos, animales y plantas, evita la deshidratación de los frutos y vegetales alargando su vida verde, además de retardar la maduración (Biogenéticos, 2001).

### **3.3.3 EM 1**

El EM 1 (microorganismos eficaces y benéficos, conocidos como EM), es una de las mezclas de microorganismos, dentro de la cual destacan bacterias fotosintéticas, ácido láctico, levaduras, actinomicetes y hongos fermentativos. Esta mezcla fue desarrollada por Dr. Higa de la Universidad de Ryukyus de Japón.

La tecnología EM se basa en contener microorganismos a pH muy bajos a los cuales muchos microorganismos mueren.

Algunas de las sustancias secundarias que son producidas por los microorganismos del EM son inositol, ubiquinone, saponinas, polisacáridos de bajo peso molecular, polifenoles y quelatos. Estas sustancias pueden inhibir patógenos, pero permitir el crecimiento de las especies benéficas (Higa s.f.).

Las sustancias antioxidantes son producidas al degradar materia orgánica. Estas sustancias desionizan sustancias peligrosas, detoxifican y quelatan minerales pesados, además inducen a los microorganismos a liberar enzimas descomponedoras, como la lignina peroxidasa (Higa s.f.).

El EM no debe considerarse como un fungicida, pues es una medida biológica para suprimir o controlar patógenos, a través del incremento de la competencia y antagonismo (APNAN 1995).

Dentro de los principales grupos de microorganismos se hallan (APNAN 1995):

**Bacterias fototrópicas o fotosintéticas:** este tipo de bacterias se automantienen, a partir de secreciones de raíces, materia orgánica y gases sulfhídricos. Los aminoácidos, ácidos nucleicos, sustancias bioactivas y azúcares, producidos por las bacterias fotosintéticas incrementan su desarrollo y a la vez el desarrollo de otros organismos, como las micorrizas, debido a que facilitan compuestos nitrogenados.

Por otro lado, las bacterias fototrópicas producen ondas de resonancia con altas frecuencias de rayos X y gamma. Se ha dicho que tales ondas son capaces de transformar la energía negativa en positiva (Higa s.f.).

**Bacterias Ácido Lácticas:** este es el grupo más grande en el coctel del EM (Higa y Parr 1994, citados por Edens *et al.* 1997).

Las bacterias ácido lácticas producen sustancias inhibitorias, tales como la reuterina, la cual es fungistática e inhibe el crecimiento de otras bacterias (Edens *et al.* 1997).

Además, el ácido láctico proviene de azúcares y otros carbohidratos secretados por las bacterias fotosintéticas y levaduras. El ácido láctico es una sustancia capaz de esterilizar y suprimir microorganismos dañinos. Estas bacterias aceleran la descomposición de la materia orgánica, ya que promueven el rompimiento y fermento de la lignina y celulosa (Edens *et al.* 1997).

Las bacterias ácido lácticas tienen la habilidad de suprimir la propagación de *Fusarium*, hongo que debilita plantas perennes, permitiendo el ataque de nemátodos (Edens *et al.* 1997).

**Levaduras:** a partir de aminoácidos y azúcares secretados por bacterias fotosintéticas, materia orgánica y raíces, sintetizan sustancias antimicrobianas,

hormonas y enzimas, las cuales sirven de sustratos para bacterias ácido lácticas y actinomicetes.

**Actinomicetes:** estos producen sustancias supresoras de hongos y bacterias (como los antibióticos), a partir de los aminoácidos secretados por bacterias fotosintéticas y materia orgánica.

**Hongos fermentativos:** estos descomponen la materia orgánica en alcohol, ésteres y sustancias antimicrobianas, eliminando así el desarrollo de moscas y malos olores.

#### **3.3.4 EM5**

El EM5 es un fermento proveniente de la mezcla de EM1 al 10% (cóctel de microorganismos), vinagre natural 10%, melaza 10%, alcohol 10% y agua 60%. Este producto puede funcionar como repelente natural y tiene acción fungistática, debido a que fortalece más la barrera de protección, para evitar la invasión de patógenos, al producir fenoles, polifenoles y ésteres. Es de uso preventivo (Okumoto 2001).

El EM5 previene las enfermedades acarreadas por plagas y a las plagas mismas. Es usualmente aplicado en relación con agua 1:500 ó 1:1000. Se ha utilizado como repelente de insectos, debido a que favorece procesos de fermentación.

La literatura reporta el uso del EM5 hasta tres meses después de su preparación. En el uso contra el combate de enfermedades sobre las plantas, se prefiere como preventivo, pensando en la absorción de los compuestos antioxidantes y equilibrio del ambiente (Edens *et al.* 1997).

### 3.3.5 Merteck 22 SL

Consiste en un fungicida sistémico con acción protectora y curativa, tipo benzimidazole y thiabendazole, para el tratamiento postcosecha del banano *Musa* spp. (grupo AAA) y plátano *Musa* spp. (grupo ABB).

El Merteck actúa sobre los siguientes patógenos: *Colletotrichum musae*, *Botryodiplodia theobromae*, *Fusarium roseum*, *Verticillium theobromae*, *Ceratocystis paradoxa*, *Deighthoniella torulosa* y *Nigrospora* spp.

Este producto es compatible con la mayoría de los fungicidas e insecticidas para banano, con excepción de productos fabricados a partir de cobre y agentes oxidantes como cloratos y nitratos. Es compatible con soluciones de alumbre hasta concentraciones del 1%.

## 4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 4.1 UBICACIÓN

El material utilizado para la investigación procedió de la finca de banano de la Empresa Agrocomercial de la Universidad EARTH, ubicada en Las Mercedes de Guácimo, Limón, Zona Atlántica de Costa Rica.

La latitud del área es entre 10° 11´ Norte y 10 ° 15´ Norte y la longitud es 83° 40´ Oeste y 83° 55´ Oeste (Sancho 1989). La altitud es aproximadamente de 50 m.s.n.m.

La precipitación es constante, alrededor de 3200 mm al año. Las temperaturas máximas rondan los 30.5 °C y las mínimas 22 °C, con una humedad relativa media de 87%

La investigación del proyecto se extendió en dos áreas. Un área de tratamientos al nivel de laboratorio y otra a nivel postcosecha.

En laboratorio se aisló cultivos puros de *Colletotrichum spp.* y *Fusarium spp.*, los cuales son patógenos causantes de la pudrición de la corona, como lo indica la literatura.

Posteriormente, se realizó una prueba de patogenicidad, para verificar cuál de los hongos anteriores era el más patogénico.

Se probó la acción individual de diferentes concentraciones de EM5 y la mezcla EM5 más Verdiol (productos orgánicos), sobre el desarrollo de la enfermedad. Se investigó el mecanismo de acción de los productos citados anteriormente sobre los patógenos.

En cuanto a la metodología postcosecha, se aplicó el EM5 y la mezcla de EM5 más Verdiol (postcosecha y laboratorio), en gajos de banano. El seguimiento

comprendió el desarrollo de la enfermedad sobre la corona y el grado de maduración, a través del almacenamiento del producto sin refrigeración.

Se aplicó Verdiol, puesto que una cera puede ayudar controlar el crecimiento del micelio. Además, puede retrasar la maduración, ya que forma una película permeable que disminuye la respiración de la fruta. Al disminuirse la respiración se está disminuyendo también la producción de etileno.

## 4.2 METODOLOGÍA DE LABORATORIO

### 4.2.1 Obtención de los cultivos puros de hongos

Todos los materiales utilizados se encontraron previamente esterilizados, dentro de las condiciones que permite el Laboratorio de Ciencias Naturales de la Universidad EARTH.

Los cultivos puros son *Colletotrichum musae* (C) y *Fusarium semitectum* (F).

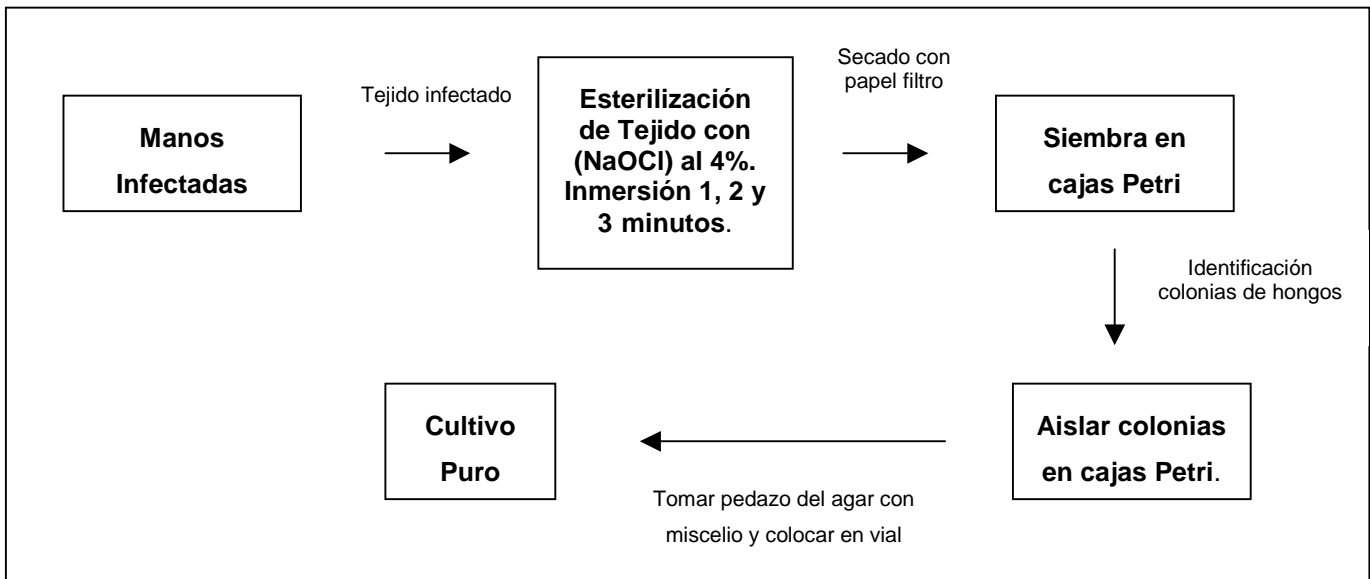


Figura 1. Diagrama de flujo (obtención de cultivos puros de los hongos)

#### **4.2.1.1 Aislamiento de los agentes causales**

Se tomaron manos de banano para exportación subgrupo Cavendish, clon “Gran Enano”, procedentes de Finca de banano de la Empresa Agrocomercial de la Universidad EARTH.

Para conseguir una rápida manifestación de los hongos presentes en el banano, se introdujo la mano en una bolsa plástica, a temperatura ambiente y con alta humedad relativa, proporcionada por un trozo de papel humedecido.

El tejido utilizado para el aislamiento provino de la frontera entre el tejido sano y el enfermo.

#### **4.2.1.2 Esterilización del tejido**

Para determinar el tiempo adecuado de esterilización, el tejido cortado se introdujo en Hipoclorito de Sodio (NaOCl) a una concentración del 4%. Los tiempos de inmersión fueron de 1, 2 y 3 minutos. Luego de la inmersión durante los tiempos respectivos, se les enjuagó en agua estéril. Luego, los trozos se secaron con papel filtro esterilizado. Posteriormente, se cortaron trozos pequeños y se sembraron en cajas Petri, previamente chorreadas con Agar Neopeptona Glucosa (ANG) y se realizó tres repeticiones para cada tiempo (Elango 2001).

#### **4.2.1.3 Incubación de tejidos infectados**

Se tomó la caja Petri donde se manifestó el crecimiento de tres o menos colonias sobre el tejido. Se extrajo una sección distal del área de crecimiento de cada hongo y se colocó en cajas Petri por separado (tres repeticiones por cada hongo), para la obtención de cultivos puros.

Luego de que los hongos poseían abundante micelio o habían esporulado, se tomó un pedazo del agar y se colocó dentro de un vial en medios inclinados de Agar Papa Dextrosa (tres repeticiones). Estos últimos se consideran como cultivos puros. Después de 4 a 5 días de crecimiento, los viales se sellaron y guardaron en la nevera a 4°C.

#### 4.2.2 Estudio de patogenicidad

Este estudio pretendió determinar cuales son los principales agentes causales de la pudrición de la corona en la producción de la Empresa Agrocomercial de la Universidad EARTH.

Se utilizaron los dos hongos aislados para realizar el estudio preliminar, ellos son el *Colletotrichum musae* (C) y *Fusarium semitectum* (F). Se realizaron dos repeticiones para cada tratamiento.

**Cuadro 1. Tratamientos para prueba de patogenicidad**

Tratamiento	Descripción
1	F
2	C
3	C + F
4	Testigo

##### 4.2.2.1 Preparación de la suspensión de esporas

Para preparar la suspensión de esporas, se sembró cada hongo en medio de ANP por 10 a 14 días. Luego, se llenaron ambas cajas con 10 mL de agua esterilizada y se raspó con un asa estéril las esporas; esa suspensión fue decantada en un beaker. Se realizó un conteo de esporas mediante el uso de un hemacitómetro marca Bright Line de la Compañía Hausser Scientific y un microscopio compuesto Serie 150 de la marca Reichert – Jung (Elango 1999).

Para la inoculación de los tejidos se utilizó de aproximadamente  $10^5 - 10^6$  esporas/mL, ajustándose esta concentración a través de diluciones de la suspensión.



#### **4.2.2.2 Inoculación de coronas**

En este ensayo, se tomaron manos de banano y se limpió la corona al realizar un corte fino de tejido, con el fin de exponer la herida nuevamente. Un mililitro de una suspensión con una concentración de  $10^5$  esporas provenientes de cultivos puros, fue inoculado sobre la herida y distribuida con un pincel. Además, para asegurar excelentes condiciones a los hongos, se introdujo la mano dentro de una bolsa, a temperatura ambiente y se colocó algodón con agua, ambos previamente esterilizados.

#### **4.2.2.3 Mediciones**

Se observó el desarrollo de la sintomatología, para determinar el hongo más patógeno. Esto se llevó a cabo durante 10 días, utilizando como herramienta la escala de grado de infección planteada por Rodríguez (1999).

### **4.2.3 Efectos de los productos sobre el crecimiento de los patógenos (% de inhibición)**

#### **4.2.3.1 Preparación de EM5**

Los materiales para la preparación del EM5 estaban en las siguientes proporciones: EM1 10%, melaza 10%, alcohol (35°) 10%, vinagre 10% y agua limpia sin cloro 60% de la mezcla total. Primeramente, se diluyó la melaza en una pequeña parte del agua, después se agregó el vinagre, alcohol y EM1 a la mezcla. Luego, se añadió el agua faltante y se dejó fermentar bajo condiciones anaeróbicas por dos semanas (Okumoto 2001).

#### **4.2.3.2 Experimento**

Para esta prueba, se preparó medios mezclando Agar Papa Dextrosa con cada tratamiento (ver Cuadro 2). Se chorrearon con estos medios cajas Petri y 24 horas más tarde se chorreó una capa de Agar Papa Dextrosa sobre los tratamientos solidificados (Castro *et al.*1996).

Se tomó por separado, discos de 7 mm de diámetro del cultivo puro de *Fusarium* y *Colletotrichum* y se colocaron con el micelio hacia arriba, sobre el medio de cultivo. Además, se estableció un testigo de agar sin producto. Se incubó por 96 horas a 27 grados centígrados.

**Cuadro 2. Tratamientos para controlar el crecimiento del micelio**

Tratamiento	Descripción
1	EM5 (1%)
2	EM5 (5 %)
3	EM5 (20 %)
4	Control Comercial (Biocto 1ml/L)
5	Testigo con Inóculo
6	Control pH EM5 1%
7	Control pH EM5 5%

#### 4.2.4.1.1 Mediciones

Para cada tratamiento se midió el diámetro de crecimiento del micelio en centímetros (French y Hebert, 1982). Se tomó fotos de los tratamientos, con una cámara electrónica marca e – VID Video Camera de la empresa Low Scientific

Se realizaron cuatro mediciones del crecimiento del micelio: a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas después de establecido el tratamiento.

El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{Media del diámetro del testigo} - \text{Media del diámetro del tratamiento} \times 100}{\text{Media del diámetro del testigo}}$$

#### 4.2.4 Mecanismo de acción del EM5

Se pretendió entender el mecanismo de acción del EM5, frente a los hongos, utilizándose el mismo EM5 de la prueba de inhibición.

##### 4.2.4.1 Filtración

Se filtró EM5 con el uso de filtros y membranas con miliporos de 22 micras, capaces de excluir bacterias, obteniendo así 250 mL de filtrado.

##### 4.2.4.2 Experimentos

###### 4.2.4.2.1 Acción Enzimática en la germinación de esporas de *Colletotrichum* y *Fusarium*

El filtrado del EM5 se dividió en dos viales. Uno se hirvió por un minuto, en un microondas marca Menumaster Comercial, con el fin de desnaturalizar mediante calor las enzimas que pueden ser producidas por las bacterias. El otro se mantuvo sin hervir.

Siguiendo con el proceso, se realizaron las diluciones del EM en agua estéril (ver Cuadro 3).

**Cuadro 3. Tratamientos para prueba de acción enzimática**

Tratamiento	Descripción
1	EM5 (1%) Hervido
2	EM5 (5 %) Hervido
3	EM5 (20 %) Hervido
4	Testigo Comercial (Biocto 1ml/L)
5	EM5 (1%) Sin hervir
6	EM5 (5 %) Sin hervir
7	EM5 (20 %) Sin hervir
8	Testigo Absoluto (Agua estéril)

Los tratamientos y los patógenos fueron inoculados sobre un porta - objeto, cubierto con “agar - agua” como medio de cultivo. Dicho porta - objeto se colocó dentro de una caja Petri de vidrio, la cual estaba preparada con papel de germinación en el fondo y grapas metálicas para evitar el contacto entre el porta - objeto y el papel.

Se colocaron 0.01 mL de la suspensión de esporas de cada hongo y posteriormente 0.01 mL de cada tratamiento en la superficie de la suspensión de esporas. Para tal se utilizó una micropipeta. El experimento se incubó a temperatura ambiente (24-27 °C).

Se midió la germinación y el crecimiento de los testigos cada 4 horas, ya que el tubo germinativo de la espora podía extenderse hasta el punto de no permitir la medición. Así que fue necesario determinar el punto donde se podía ver la mayor germinación del testigo e identificar claramente el tubo germinativo de cada espora. Este lapso de tiempo fue de 13 horas, a partir de la preparación de la suspensión de esporas.

A las 13 horas, las esporas y tubos germinativos se tiñeron con azul de algodón en lactofenol.

#### **4.2.3.2.1.1. Mediciones.**

Se midió porcentaje de germinación de esporas, presencia de varios tubos germinativos (biceptación), longitud del tubo germinativo más largo de la conidia.

Para evaluar la germinación se observó en el microscopio compuesto cada porta-objeto, midiendo 5 campos al azar, con al menos 20 esporas. Además, se anotó si existían biceptaciones y tubos germinativos en las esporas germinadas. Se midió la longitud de 10 tubos germinativos mediante un micrómetro.

El porcentaje de biceptación fue calculado contando para cada tratamiento cuantas de las esporas germinadas presentaban más de un tubo germinativo. Se

calculó el porcentaje que representaban esas esporas biceptadas, del total de esporas germinadas.

Se observó además la apariencia del tubo germinativo, tomándose fotografías para cada tratamiento, con una cámara electrónica marca e – VID Video Camera de la empresa Low Scientific.

Se replicó cada tratamiento cinco veces y se aplicó la prueba Duncan y Dunnet por tiempos, para análisis estadístico de los resultados de germinación, crecimiento de los tubos germinativos y biceptación de las hifas.

#### **4.3 METODOLOGÍA POSTCOSECHA**

Se procedió a la recolección de las manos de banano de exportación en la planta de empaque de la Empresa Agrocomercial de la Universidad EARTH. El banano procedía de plantaciones convencionales.

Los tratamientos consistieron en manos de banano de 4 dedos, los cuales permitieron identificar claramente el avance del patógeno (*Colletotrichum* y *Fusarium*) sobre el tejido de la corona.

Los hongos fueron inoculados, asperjando las coronas con soluciones de  $10^5$  esporas por mililitro.

Además, se colocó papel humedecido sobre la corona y dentro de la bolsa, creando un microclima favorable para el desarrollo de los patógenos.

Posteriormente, las manos fueron embolsadas. Las bolsas son utilizadas para exportar manos de banano y poseen dieciocho orificios, a través de los cuales permiten el paso del etileno en la cámara de maduración.

Los tratamientos en este experimento eran las concentraciones del EM5 y EM5 más Verdiol. La concentración de Verdiol utilizada fue 2.5%, la misma utilizada para el control comercial (Biocto + Verdiol), recomendada en estudios

previos, realizados para la Empresa Agrocomercial de la Universidad EARTH (Demerutis 2000). Las variables de este estudio fueron Grado de Pudrición y Grado de madurez, para cada tratamiento contra los dos hongos.

Las concentraciones de los tratamientos se hallan descritas para las pruebas de porcentaje de inhibición del crecimiento de los hongos (ver Cuadro 4), exceptuando el tratamiento de Biocto + Verdiol. Además, se contó con un testigo absoluto, o sea sin ningún tratamiento.

Para la maduración de las manos, se colocaron en una cámara de maduración del Centro de Procesamiento de Alimentos de la Universidad EARTH, donde el etileno fue inyectado a una concentración de 300 a 500 ppm, durante 14 horas cada día, por dos días. La temperatura de la cámara de maduración fue de 16°C, con una humedad relativa de 85 a 90%. Cada día transcurrido dentro de la cámara representó el cambio en un grado de coloración (maduración). Al tercer día (en grado dos), el banano se retiró y almacenó en una cámara a temperatura ambiente promedio de 26,2 °C y 89,8% de Humedad Relativa, hasta observar el máximo desarrollo del hongo.

#### **Cuadro 4. Tratamientos postcosecha**

<b>Tratamiento</b>	<b>Descripción</b>
1	EM5 (1%)
2	EM5 (5 %)
3	EM5 (20 %)
4	EM5 (1%) + Verdiol (2.5%)
5	EM5 (5%) + Verdiol (2.5%)
6	EM5 (20%) + Verdiol (2.5%)
7	Verdiol (2.5%)
8	Testigo Comercial (Biocto 1ml/L + Verdiol 2.5%)
9	Testigo Absoluto
10	Testigo con Inóculo

#### **4.3.1 Evaluaciones**

Las evaluaciones se realizaron mediante el uso de dos escalas visuales. Para maduración de banano: una escala visual de evaluación del color (Anexo 19), diseñada por Turbana Corporation (1994). Y para el desarrollo de la pudrición de la corona, la escala visual desarrollada por Rodríguez (1999), para pudrición de corona en banano (ver Anexo 20).

#### **4.4 DISEÑO EXPERIMENTAL**

La unidad experimental en las evaluaciones postcosecha estuvo compuesta por una mano de banano con cuatro dedos, procedentes de la finca de banano para exportación de la Empresa Agrocomercial de la Universidad EARTH. Se realizó una etapa, con diez repeticiones por tratamiento.

Se aplicaron análisis estadísticos a todos los resultados, provenientes de los tratamientos (laboratorio y postcosecha). Se analizaron medias, correlaciones, diferencia significativa, pruebas Duncan y Dunnett.

Se procesó la información con el programa estadístico The SAS System for Windows Release 6.12 y se graficaron los resultados utilizando el programa Microsoft Excel 2000.



## 5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 ESTUDIO DE PATOGENICIDAD

El hongo que mostró mayor patogenicidad en banano verde (ver Cuadro 5), manejado a temperatura ambiente fue el de *Colletotrichum* (Finlay y Brown 1993), seguido por el *Fusarium*. El tratamiento de *Colletotrichum* + *Fusarium*, mostró menos desarrollo del micelio y menor esporulación; esto puede deberse a que ambos hongos compiten y se inhiben entre sí. El testigo absoluto no presentó ningún desarrollo de micelio. Este experimento fue llevado a cabo en el mes de junio, el cual es reportado como inicio de la estación alta en incidencia de pudrición de la corona en banano (Krauss y Johanson 1999).

**Cuadro 5. Grado de infección de las coronas\* expuestas a los tratamientos de *Colletotrichum* (C), *Fusarium* (F) y ambos**

Tratamiento	Descripción	Grado de infección
1	F	Grado 5
2	C	Grado 6
3	C + F	Grado 5
4	Testigo	Grado 1

\*Escala de evaluación para el grado de infección sugerido por Rodríguez (1999).

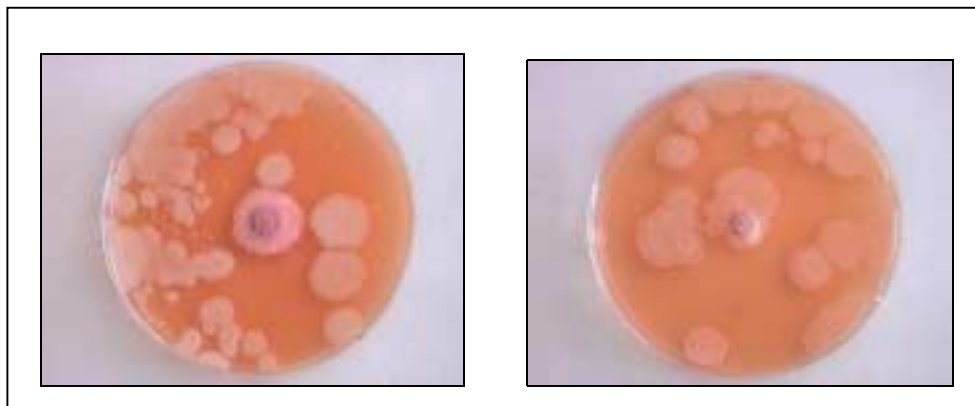
## 5.2 ANÁLISIS DE LABORATORIO

### 5.2.1 Crecimiento del diámetro y porcentaje de inhibición

La prueba de doble capa evaluó el comportamiento de los hongos patógenos (*Fusarium* y *Colletotrichum*) bajo la acción de distintos tratamientos.

Se midió el crecimiento y el porcentaje de inhibición en ambos hongos. El porcentaje de inhibición se refiere a el control de los tratamientos en el crecimiento del hongo, respecto al crecimiento del testigo con inóculo.

En la metodología, se establecieron controles para el pH de los tratamientos con EM5, esto tenía como fin identificar si la acidez de los mismos influía en el crecimiento del micelio de los patógenos. Sin embargo, no fue posible establecer un control de pH para el tratamiento EM5 concentración 20%, debido a que a su pH de 3.52 el PDA no solidifica (ver Anexo 5).

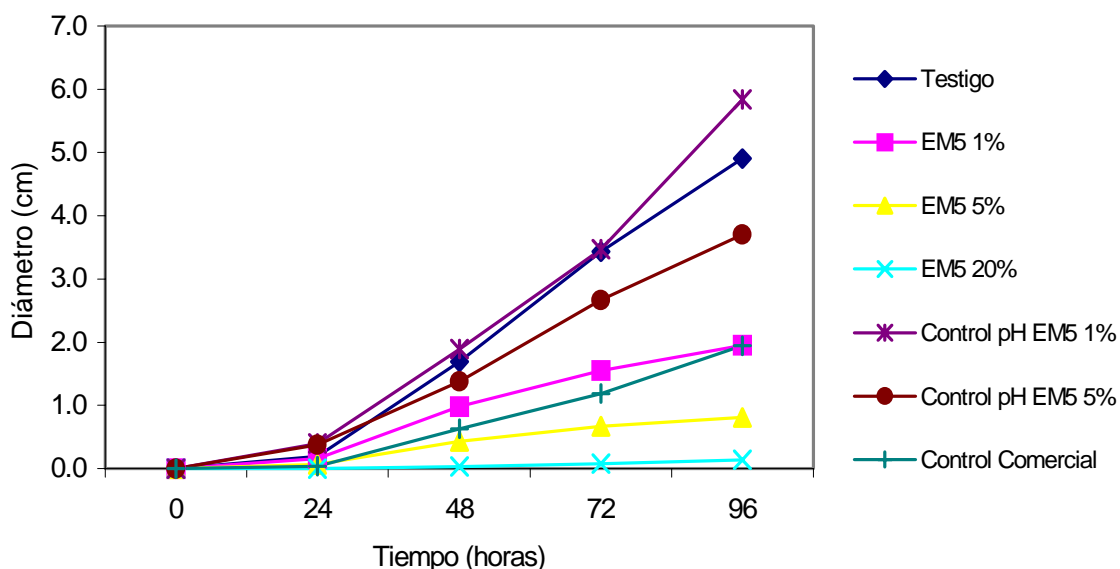


**Figura 2. Interacción entre *Fusarium* y bacterias presentes en EM5**

En cuanto a la inhibición en las Cajas Petri, pudo observarse la presencia de bacterias en la superficie de la segunda capa de agar, como se reporta en otro estudio realizado (Wood s.f.). En algunos casos, fue imposible limitar las bacterias a la primer capa, ya que a las 24 horas, estas se habían expandido en los tratamientos con EM5, dificultando ver la acción antagónica. En algunas

repeticiones, pudo observarse que el micelio del *Fusarium* detenía su crecimiento al ponerse en contacto con una colonia bacteriana, como se puede observar en la Figura 2. Bajo esta experiencia, se recomienda para experimentos futuros, chorrear la segunda capa de agar antes de transcurridas 24 horas de haber colocado la primera capa con tratamiento

### 5.2.1.1 Comportamiento de *Fusarium*



**Figura 3. Crecimiento de *Fusarium* (cm), desde 0 hasta 96 horas**

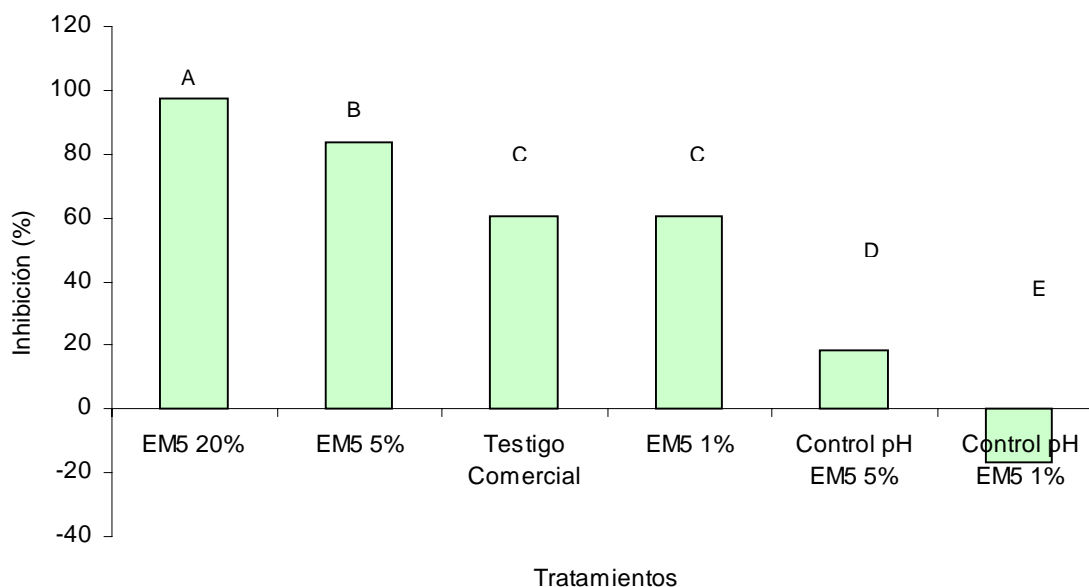
Según el Análisis Dunnet, para *Fusarium*, después de 24 horas (ver Anexo 1) ningún tratamiento fue diferente al testigo. A partir de las 48 horas todos los tratamientos eran significativamente diferentes al testigo (ver Anexo 2). Desde ese periodo el EM5 al 20% detuvo el crecimiento del patógeno (ver Figura 3). Se supone que por su alta concentración actuó con un antagonismo temprano.

Los datos estadísticos de la prueba Duncan (ver Anexos 3 y 4), muestran que a las 48 horas el EM5 al 5% y a las 72 horas el EM5 al 1%, ejercían un control similar al del testigo comercial. Estos resultados sugieren, que las colonias de

microorganismos presentes en el EM5 incrementan su población y concentración de sustancias antagonicas con el paso del tiempo. Esto conlleva a la supresión del desarrollo miceliar del patógeno. Las bacterias ácido lácticas producen sustancias inhibitorias tales como la reuterina, la cual es fungistática e inhibe el crecimiento de otras bacterias (Edens *et al.*, 1997).

Los controles de pH, en las pruebas Duncan, no presentan relación significativa con los tratamientos de EM5 al 1% y 5%. A partir de las 24 horas estos controles no inhibieron el crecimiento de *Fusarium*, pero después de 48 horas, el control de pH del EM5 al 1% estimuló más el crecimiento respecto al otro control de pH. Este último resultado indica que este patógeno se desarrolla mejor a pH de 4.64 (ver Anexo 5).

La inhibición de ambos hongos no se da por la acidez de los tratamientos con EM5, sino por el incremento de la competencia y antagonismo, como es reportado por APNAN (1995).



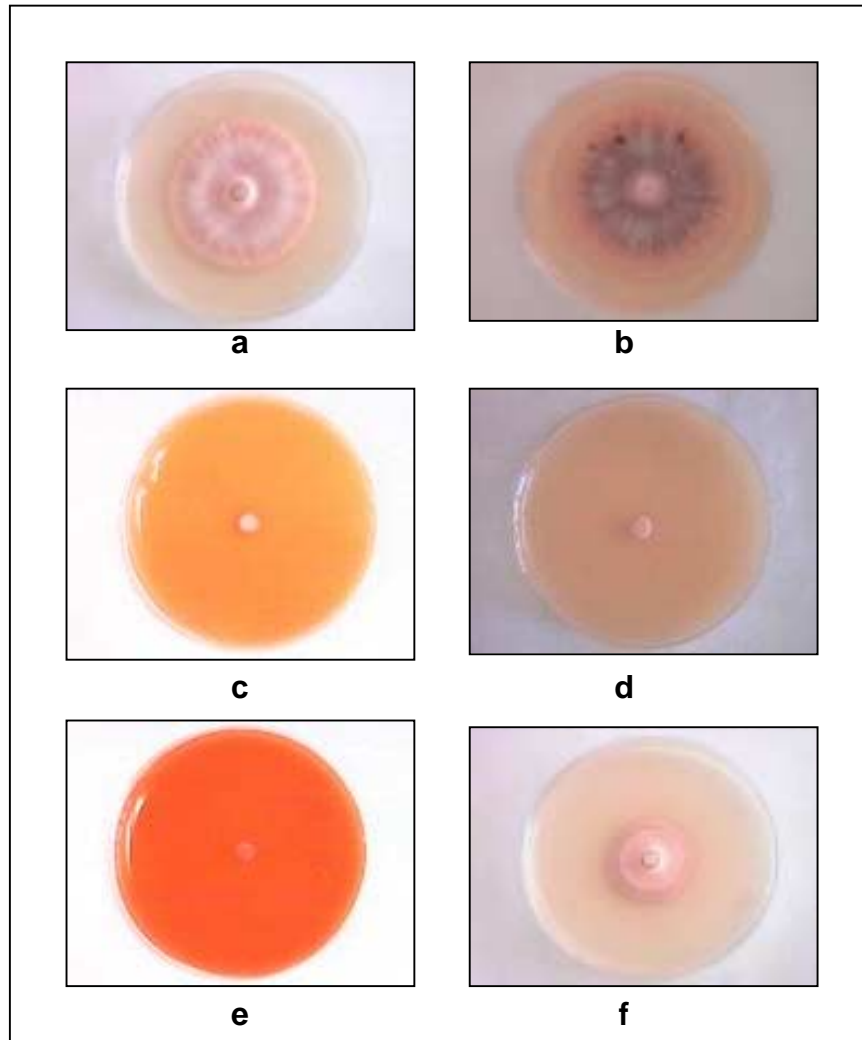
**Figura 4. Porcentaje de inhibición en *Fusarium*, después de 96 horas**

En cuanto al porcentaje de inhibición del *Fusarium* (ver Anexo 10), a las 24 horas, todos los tratamientos eran similares y los controles de pH eran diferentes a estos. A pesar de esto, las medias estadísticas de los tratamientos mostraban al EM5 20% superior sobre las otras concentraciones, seguido por el testigo comercial.

A las 48 horas y 72 horas, los análisis estadísticos mostraron diferencia significativa entre todos los tratamientos. El EM5 al 20% continuó siendo el mejor inhibidor del crecimiento del micelio. Posteriormente se ubicaron el EM5 al 5% y el testigo comercial.

Se tomó el tiempo de 96 horas para concluir acerca de la efectividad de los tratamientos. Como se presenta en la Figura 4, en el último periodo el EM5 al 20% inhibía el hongo en 97,14% y el EM5 al 5% en 83,5%. Dichos tratamientos superaron el porcentaje de inhibición del testigo comercial. El EM5 al 1% inhibió un poco menos que este último.

Estos datos corroboran la hipótesis de que el incremento de la población microbiana y sustancias antagónicas con el paso del tiempo tienen un efecto fungistático. Todos los porcentajes de inhibición de los tratamientos con EM5 incrementaron al avanzar las horas y alcanzaron en algún momento al testigo comercial. Por ejemplo, a las 48 horas el EM5 al 5% acrecentó su acción respecto a las 24 horas, a las 96 horas el EM5 al 1% alcanzó el efecto del testigo comercial.



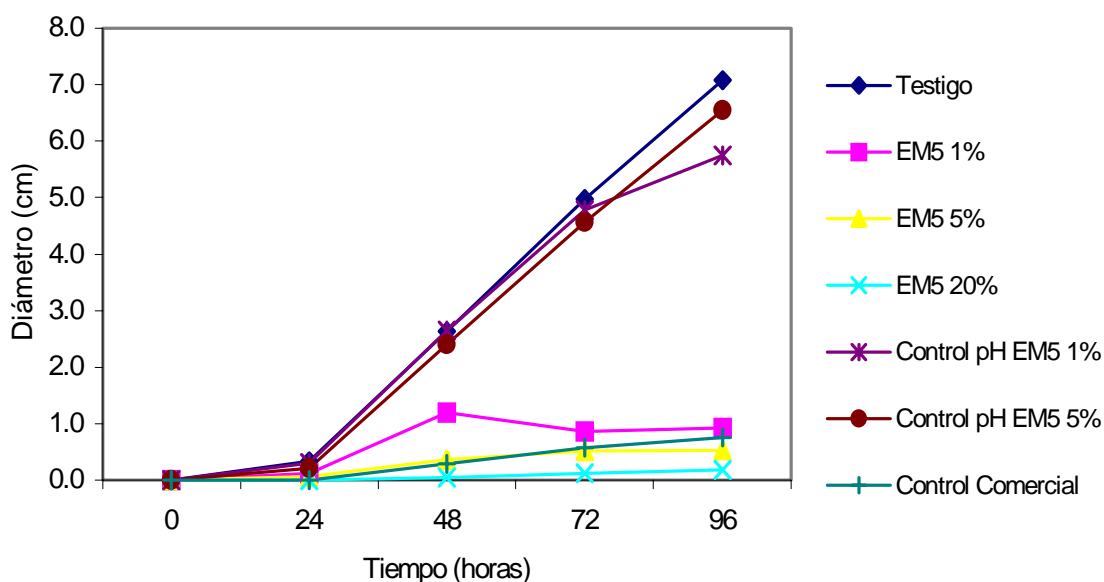
Testigo Absoluto = a; Control pH EM5 al 1% = b; EM5 al 5% = c;  
EM5 al 1% = d; EM5 al 20% = e; Testigo Comercial = f.

**Figura 5. Fotografías del crecimiento de *Fusarium* en cajas Petri, después de 96 horas**

Al final de 96 horas de evaluación, las cajas Petri con tratamientos y el patógeno se observaban como lo detalla la Figura 5. Es una evidencia del control ejercido por los tratamientos de EM5.

La diferencia en colores de las cajas se debe a las concentraciones del EM5, ya que este posee un color marrón oscuro. Conforme se añadió mayor cantidad de EM5 al agar, el tono de la caja Petri es más oscuro. Lo mismo sucedió con los experimentos para el hongo *Colletotrichum* (ver Figura 8).

### 5.2.1.2 Comportamiento de *Colletotrichum*



**Figura 6. Crecimiento del diámetro de *Colletotrichum* (cm), desde 0 hasta 96 horas**

El crecimiento del testigo *Colletotrichum* en las cajas Petri fue superior al crecimiento del *Fusarium* (ver Figuras 3 y 6). Este comportamiento es similar al observado en las pruebas preliminares con manos de banano, donde el mayor grado de pudrición fue causado por *Colletotrichum*. Finlay y Brown (1993) encontraron que el *Colletotrichum* era más agresivo que el *Fusarium*.

Transcurridas 24 horas después de inoculado el hongo *Colletotrichum* en las cajas Petri, el crecimiento del micelio fue similar en los todos los tratamientos (ver Figura 6). No obstante, según el análisis Duncan (ver Anexo 7), los tratamientos con diferencia representativa son el testigo inóculo y los controles de pH.

Las medias Duncan, de los tratamientos después de 48 horas, indicaron que de mayor a menor efecto, el EM5 al 20%, testigo comercial y EM5 al 5%, disminuyeron el crecimiento del patógeno, pero fueron iguales estadísticamente (ver Anexo 8).

Después de 72 horas, se observó que el EM5 al 5% superó al testigo comercial en inhibir el crecimiento del micelio, a causa del incremento de la población microbiana y posible síntesis compuestos antagónicos.

El crecimiento miceliar después de las 96 horas (ver Figura 6), mostró que el tratamiento que mejor controló el crecimiento del patógeno *Colletotrichum* fue el EM5 al 20%. El EM5 al 5%, el control comercial y el EM5 al 1% le siguieron en control. Estos fueron estadísticamente diferentes al testigo con inóculo (ver Anexo 6), pero no fueron distintos entre si (ver Anexo 9).

Los tratamientos con EM5 al 20%, 5% y 1% ejercieron un control satisfactorio.

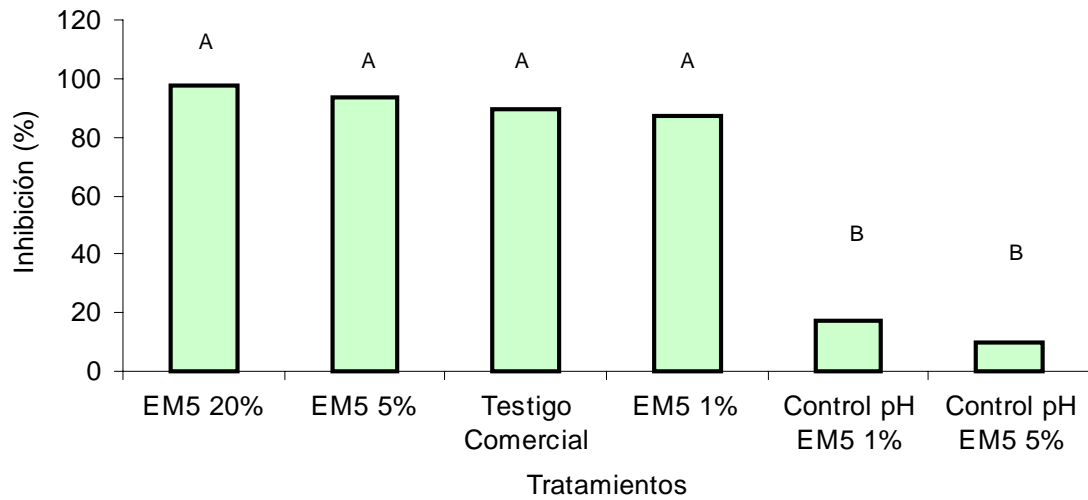
El desarrollo del *Colletotrichum* en los controles de pH de los tratamientos con EM5 al 1%, 5% y el testigo absoluto con inóculo fue similar. Después de 48 horas existió una ligera diferencia significativa en el control de pH del EM5 al 1%. Esto quiere decir, que entre pH 4.64 y 3.83 (ver Anexo 5), este patógeno tiene buen crecimiento, similar al testigo.

En algunos casos, el *Colletotrichum* fue inhibido por los tratamientos con EM5, el micelio no avanzó y hubo esporulación masiva (ver Figura 8-d). Esto pudo darse como respuesta al estrés, según lo sugiere Okumoto<sup>1</sup> (2000)

---

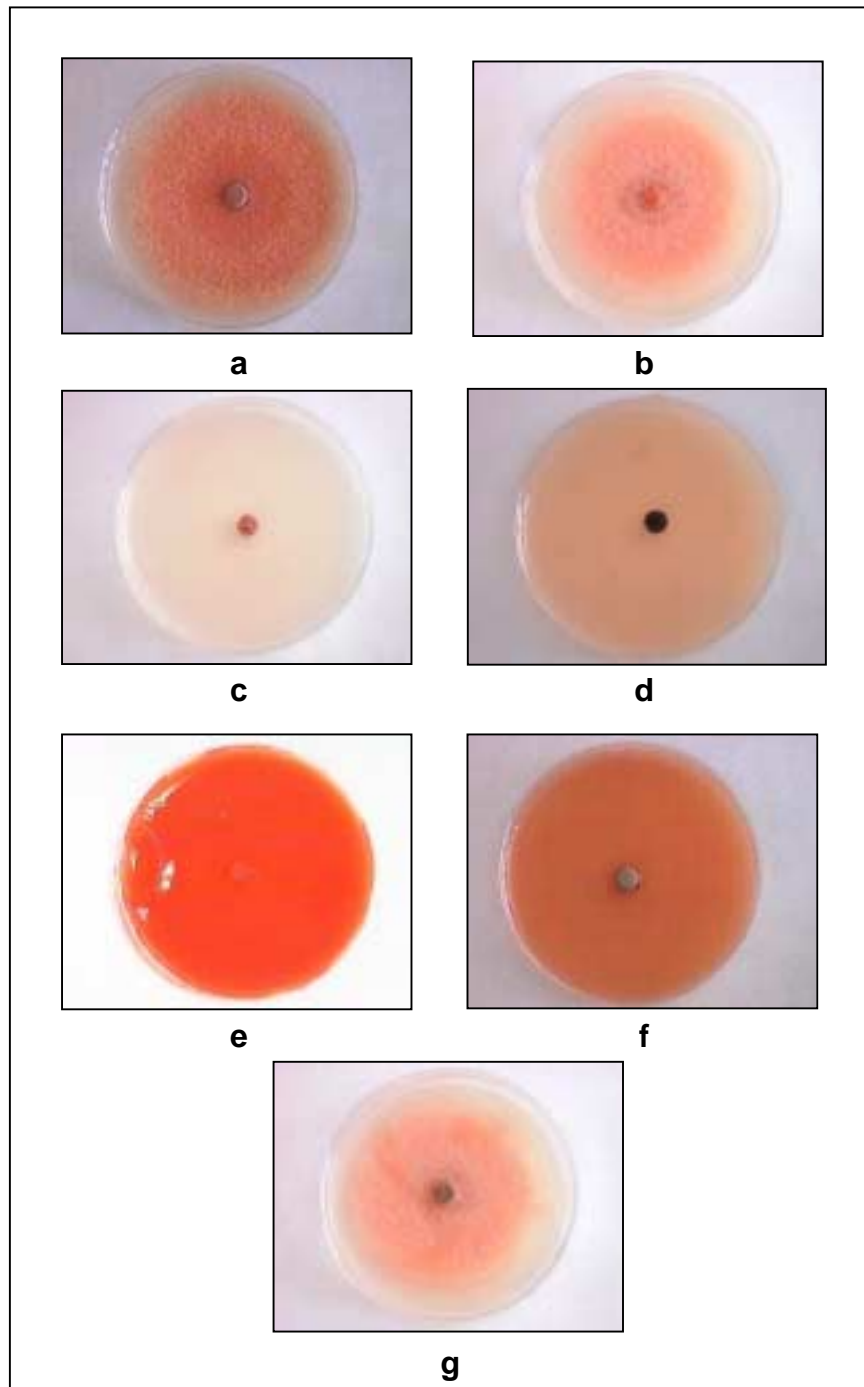
<sup>1</sup> Okumoto, S. 2001. Comunicación personal.





**Figura 7. Porcentaje de inhibición en *Colletotrichum*, después de 96 horas**

La Figura 7, indica que no existe diferencia estadística entre los tratamientos con EM5 y el testigo comercial. Sin embargo, las medias sugieren que el EM5 al 20 % y 5% son los mejores inhibidores del crecimiento del micelio en las cajas Petri. El EM5 al 1% presentó un incremento de la inhibición conforme avanzó el tiempo, ya que al final de las mediciones alcanzó un control similar al del EM5 20%.

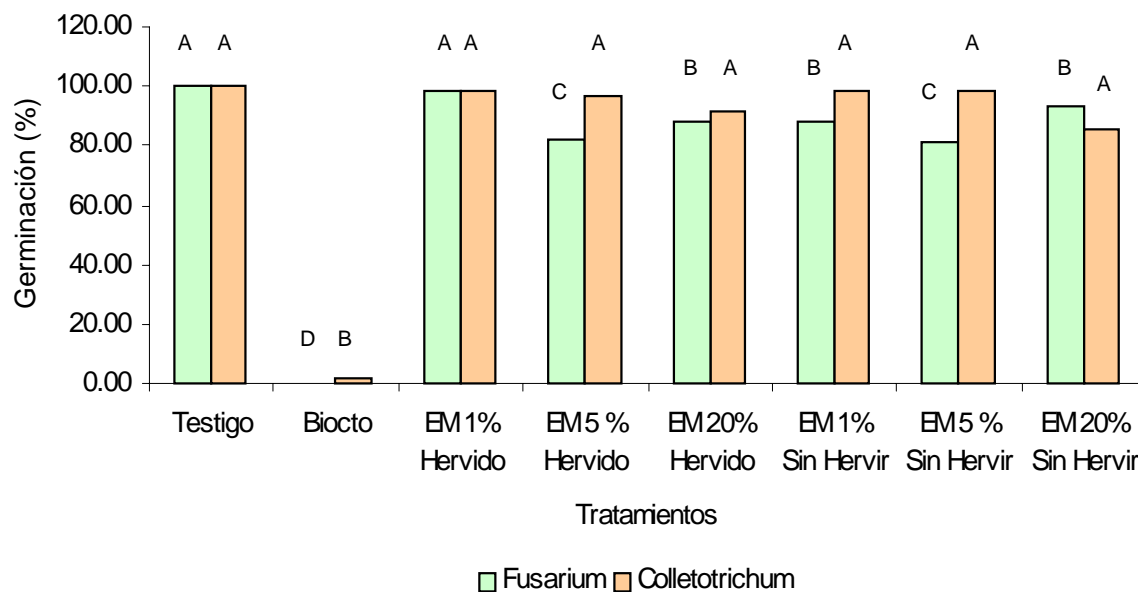


Testigo Absoluto = a; Control pH EM5 al 1% = b; Testigo Comercial = c;  
 EM5 al 1% = d; EM5 al 20% = e; EM5 al 5% = f; Control pH EM5 al 5%  
 = g.

**Figura 8. Fotografías del crecimiento de *Colletotrichum* en cajas Petri, después de 96 horas**

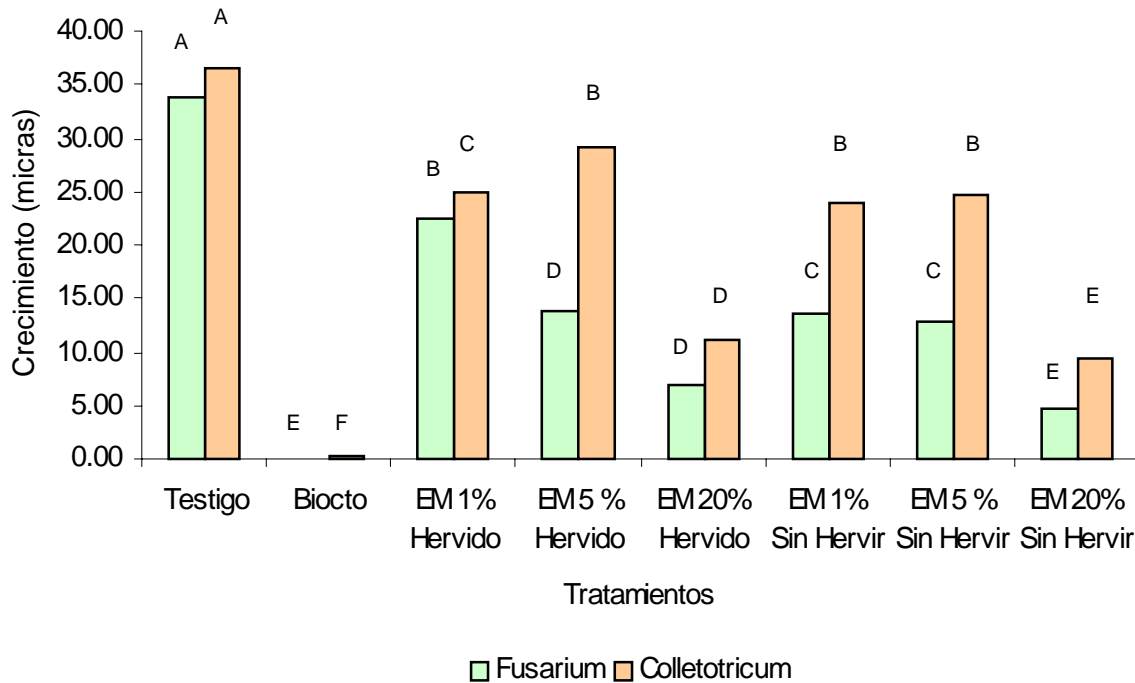
Al final de 96 horas de evaluación la Figura 8, refleja el efecto de los tratamientos de EM5 sobre el patógeno.

### 5.2.2 Acción Enzimática en la germinación de esporas de *Colletotrichum* y *Fusarium*



**Figura 9. Germinación de las esporas de *Colletotrichum* y *Fusarium*, después de 13 horas**

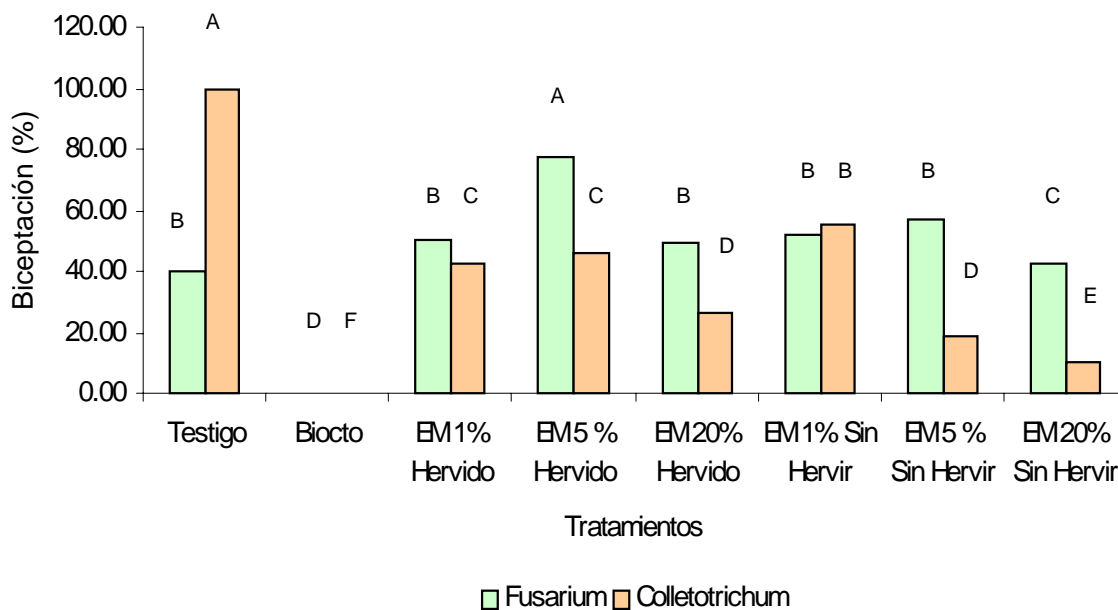
Todos los tratamientos con EM5 utilizados sobre el inóculo *Fusarium*, germinaron en un alto porcentaje. Sin embargo, estadísticamente se pudo hallar que el EM5 al 5% hervido y sin hervir tuvieron un mejor desempeño respecto a los otros tratamientos. En cuanto al hongo *Colletotrichum*, ninguno de los tratamientos presentó diferencia significativa entre si, ni respecto al testigo, lo cual quiere decir que no existe inhibición en la germinación. El testigo comercial (Biocto), inhibió en 100% la germinación de *Fusarium* y en 98% la de *Colletotrichum*.



**Figura 10. Crecimiento del tubo germinativo de las esporas de *Colletotrichum* y *Fusarium*, después de 13 horas**

Al final de las trece horas, el testigo comercial presentó inhibición en el crecimiento del tubo germinativo del *Fusarium* y *Colletotrichum*, seguido por el EM5 al 20% sin hervir y hervido. Esto indica que posiblemente las sustancias antagónicas no identificadas, producidas por los microorganismos pueden ser termorresistentes, soportando altas temperaturas.

Comparando el desarrollo de los tubos germinativos del *Fusarium* y el *Colletotrichum*, es posible observar que este último crece más rápido.



**Figura 11. Biceptación del tubo germinativo de las esporas de *Colletotrichum* y *Fusarium*, después de 13 horas**

La biceptación de las hifas indica el punto en que los ápices no consumen todos los nutrientes producidos por la extensión de las paredes celulares (Carlile & Watkinson, 1994). Sin embargo, en el caso de este experimento, el testigo inóculo se bifurcó creciendo sobre un medio inerte como lo es el agar de agua.

Según la Figura 11, el EM5 al 5% hervido estimuló la biceptación del *Fusarium*. El testigo comercial y el EM5 al 20% sin hervir, presentaron los menores porcentajes de biceptación.

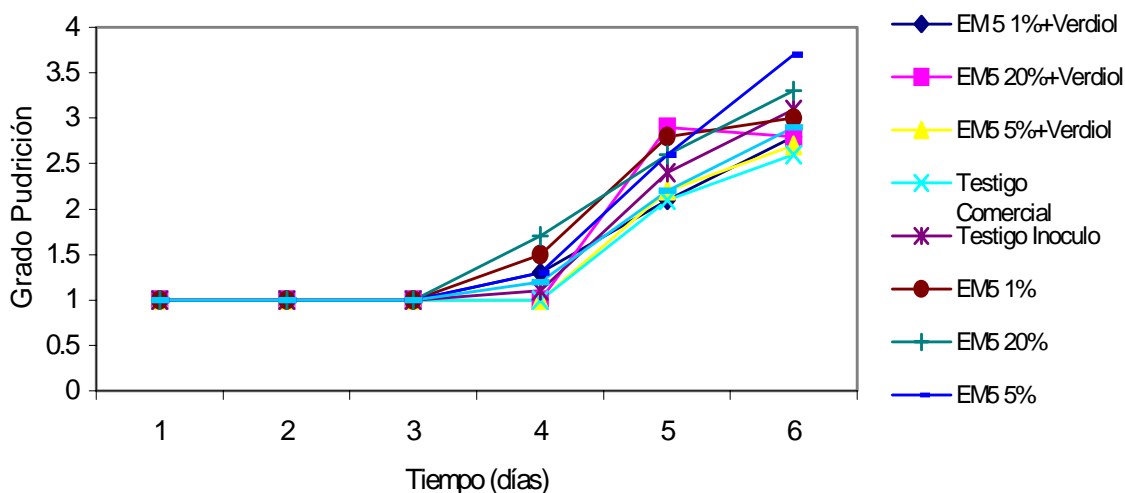
En el caso del *Colletotrichum*, este mostró menor biceptación en el testigo comercial. En cuanto a los tratamientos con EM5, la concentración al 20% y 5% sin hervir y 20% hervido controlaron mejor la biceptación. La biceptación fue más alta en el *Colletotrichum* que en el *Fusarium* (ver Anexos 13 y 14) y el porcentaje de inhibición de la germinación fue mayor en el último (ver Anexos 11 y 12).

En los Anexos 21 y 22, se observa las fotografías microscópicas de la germinación de esporas, crecimiento y biceptación de los tubos germinativos de *Colletotrichum* y *Fusarium*.

### 5.3 ANÁLISIS POSTCOSECHA

#### 5.3.1 Grado de Pudrición de las coronas y porcentaje de inhibición de los tratamientos.

Es importante considerar que las manos de banano se expusieron a condiciones ambientales y aún así los testigos absolutos (sólo inoculados con agua estéril) no presentaron ningún indicio de infección. Esto indica que cualquier resultado se debe al efecto de los tratamientos y a escasa influencia de los otros microorganismos contaminantes, presentes en el ambiente.



**Figura 12. Pudrición de las coronas de banano, después de inoculadas con *Fusarium***

En cuanto al *Fusarium*, en el cuarto día de evaluación se encontró que el EM5 al 1% y al 20% promovieron la pudrición (ver Anexo 15). Pareciera que los

microorganismos del EM5, como las bacterias ácido lácticas o las sustancias producidas por estas ayudaron a la degradación de los tejidos de la corona, promoviendo el rompimiento y fermento de la celulosa. Esto fue observado también por Edens *et al.* (1997). Cabe recordar que este resultado es diferente de lo que se observó en el laboratorio, donde el EM5 ejerció control del *Fusarium*.

En el quinto día, se observó un aumento el grado de pudrición en relación al cuarto día (ver Figura 12). Según las medias de la prueba Duncan, los tratamientos que presentaron mayor pudrición que el testigo con inóculo fueron el EM5 al 20% + Verdiol y las tres concentraciones de EM5. Es posible aseverar que el EM5 degradó el tejido, creando condiciones para el mejor desarrollo del patógeno. Al final de la prueba como se observa la Figura 12, el tratamiento que manifestó mayor pudrición fue el EM5 al 5%.

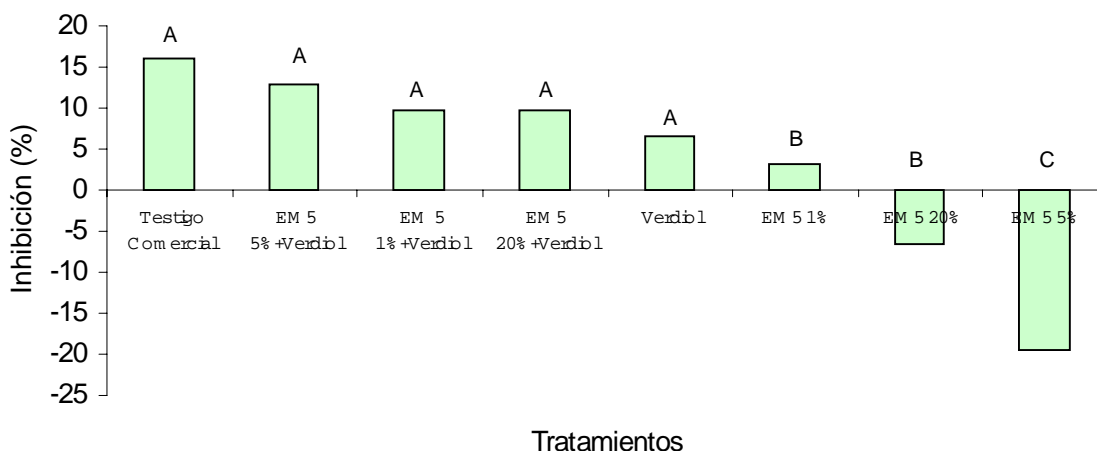
Las concentraciones de EM5 con Verdiol (cera), el Verdiol y el testigo comercial son similares estadísticamente, aún el testigo comercial presentó el menor grado de infección.

Quizás las ceras disminuyeron la actividad enzimática de la propia fruta, a través de la reducción de la respiración y el incremento del dióxido de carbono, como lo reportaron Krauss y Johanson (2000). Al disminuirse el agua libre sobre la corona los patógenos avanzaron lentamente.

El testigo comercial no poseía ningún organismo que produjera la descomposición de la celulosa, por lo cual el hongo avanzó con menor rapidez. El producto comercial posee ácido cítrico y quilol, los cuales provocan oxidaciones que rompen la pared y el citoplasma de la célula de los patógenos (Biogénicos, 2000).

El *Fusarium* es un hongo necrótrofo (Okumoto<sup>2</sup> 2001) y al parecer el EM5 sin combinarse con una cera como el Verdiol, favoreció el deterioro del tejido y el crecimiento de este hongo.

Durante los seis días de evaluación, ningún tratamiento provocó el detenimiento de la maduración. Los tratamientos fueron colocados los dos primeros días en la cámara de maduración, para disparar el pico de producción de etileno de las manos. Después de esto el proceso de maduración para frutos climatéricos, como el banano, es irreversible (Demerutis 2000).



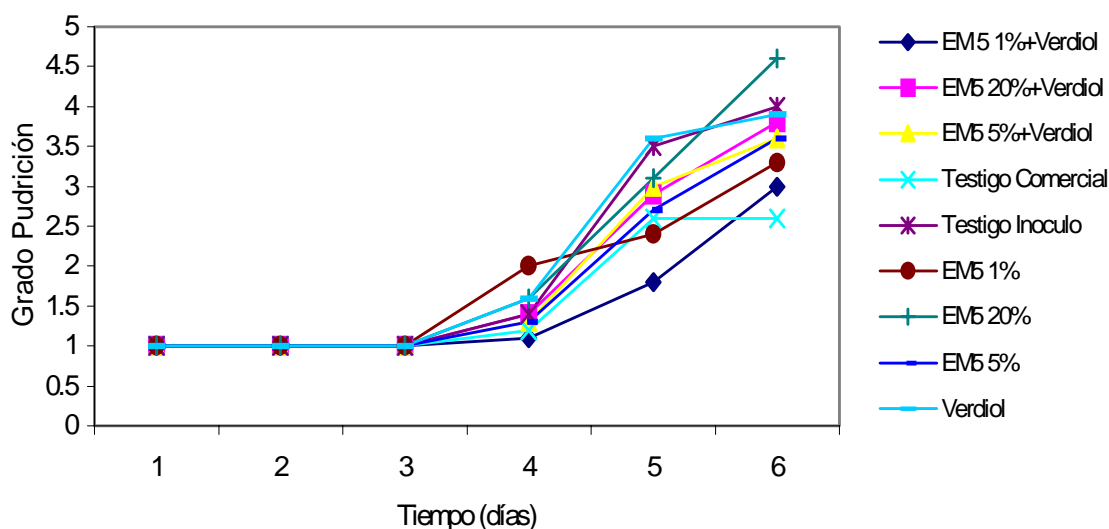
**Figura 13. Inhibición de *Fusarium* frente a los tratamientos, al finalizar la prueba de postcosecha**

El porcentaje de inhibición de la pudrición alcanzado por todos los tratamientos fue muy bajo, aunque el testigo comercial y los tratamientos con EM5 + Verdiol controlaron en algún nivel, posiblemente la cera generó una barrera alrededor de la corona. Cuando no se aplicó el Verdiol el control fue casi nulo o estimuló el crecimiento del patógeno. El mejor tratamiento del EM5, fue el de la

<sup>2</sup> Okumoto, S. 2001. Comunicación personal.



concentración 5% + Verdiol (casi 15% de inhibición). Quizá la concentración del 20% + Verdiol no funcionó mejor porque la alta cantidad de microorganismos y sus compuestos metabólicos degradaron los ácidos grasos de la cera. Es posible que la concentración EM5 1% + Verdiol no poseía la suficiente cantidad de microorganismos y sustancias antagónicas para competir con el patógeno e inhibirlo eficientemente.



**Figura 14. Pudrición de las coronas de banano, después inoculadas con *Colletotrichum***

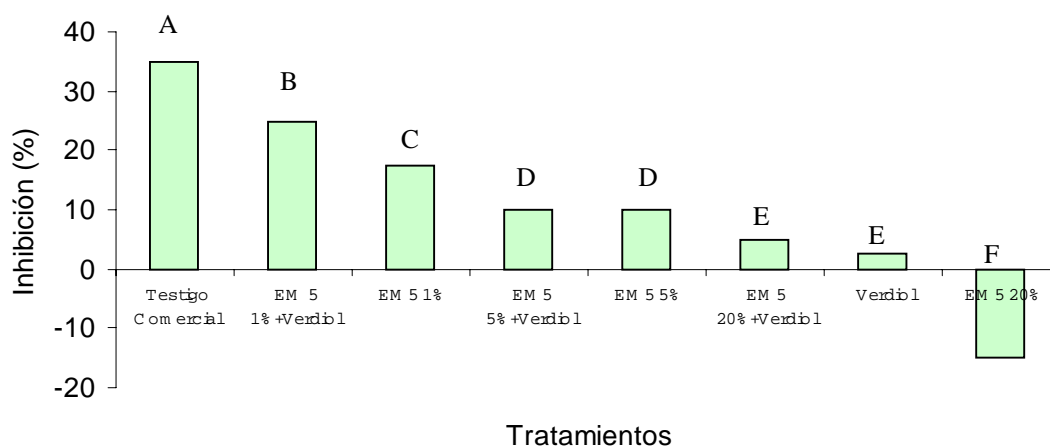
La Figura 14 muestra que el *Colletotrichum* se ve ligeramente inhibido por los tratamientos con EM5 1% y 5%, o sea es más susceptible a las sustancias antagónicas producidas por los organismos del EM5.

Las variaciones en el comportamiento de un día al otro son muy notorias, lo cual sugiere un amplio espectro de relaciones entre los microorganismos presentes en el EM5 y el tejido de la corona. Sin embargo, se presume que el EM5 al 1% con y sin Verdiol, controló en alguna medida al *Colletotrichum*, ya que su

baja concentración no degradó significativamente el tejido de la corona, desfavoreciendo el desarrollo del hongo.

Después del quinto día, el control del EM5 al 1% disminuyó y el único tratamiento que no permitió el avance del patógeno fue el testigo comercial (ver Anexo 16).

El testigo comercial quizá estabilizó su control gracias al efecto de los ácidos grasos sobre el micelio del patógeno, tales compuestos estaban contenidos en el Biocto y Verdiol. Estas sustancias no permiten la maduración del micelio, imposibilitando la reproducción y atrofiando las estructuras proticas fundamentales del hongo (Biogénicos, 2000).



**Figura 15. Porcentaje de inhibición de *Colletotrichum* y distribución Duncan de los tratamientos, al finalizar la prueba de postcosecha (después de 6 días)**

El porcentaje de inhibición de estos tratamientos fue mayor que el alcanzado para el patógeno *Fusarium*. al igual que ocurrió con la bifurcación en las pruebas de laboratorio. Como lo indica la Figura 15, el EM5 1% con Verdiol alcanzó alrededor de un 25% de inhibición, versus un 35% logrado por el testigo

comercial (ver Anexo 17). Tal vez, el *Colletotrichum* se inhibió por sustancias o compuestos producidas en el EM5 y la baja concentración de microorganismos (1%) no favoreció la degradación del tejido de la corona. Otra vez, el EM5 al 20% favoreció el desarrollo del hongo y al contrario de los experimentos practicados sobre coronas inoculadas con *Fusarium*, el Verdiol tuvo un pobre desempeño. Esto indica que quizá el hongo *Colletotrichum* no se ve afectado por el microclima creado por la cera.

En general, existió un grado de correlación positiva entre el avance de la pudrición y el incremento de la madurez, con valores de 0.79 para *Colletotrichum* y de 0.73 para *Fusarium*. Además, el incremento en la maduración posee una alta correlación con el transcurrir de los días, alrededor de 0.98 en ambos hongos (ver Anexo 18).

El EM5 no controló las pudriciones de la corona de la fruta. Aunque en el laboratorio el *Colletotrichum* germina y crece más rápido que el *Fusarium*, en los experimentos postcosecha, los tratamientos con EM5 estimularon un avance más rápido de la pudrición en coronas inoculadas con *Fusarium*, respecto a las que poseían *Colletotrichum*.

Las diferencias entre las respuestas en el laboratorio y experimentos postcosecha, mostraron que condiciones controladas, tanto para los patógenos como para los organismos presentes en el EM5, no son iguales a las condiciones en el medio libre, en donde la temperatura, humedad y luz afectan el desempeño del producto.

Los resultados obtenidos en la prueba postcosecha no deben quitar mérito al control ejercido por el EM5 al nivel de laboratorio. Los experimentos en laboratorio permiten afirmar que el EM5 es un excelente supresor de ambos patógenos *Colletotrichum* y *Fusarium*. Aunque en este experimento no ha sido efectivo en la prevención del desarrollo de pudriciones en la corona de banano en

condiciones para exportación, se debe buscar otras opciones para lograr el control como se ha experimentado en el laboratorio.

## 6 CONCLUSIONES

Las tres concentraciones de EM5 utilizadas en el laboratorio mostraron una exitosa inhibición del micelio de *Colletotrichum* y *Fusarium*, causantes principales de la pudrición de corona en banano. Las concentraciones de EM5 que mejor controlaron fueron el 20% y 5%.

El control del crecimiento del micelio al usar EM5 en condiciones controladas (laboratorio), se basa en la competencia por espacio físico y compuestos antagónicos no identificados. Se descarta que la inhibición del patógeno se debiera a la acción del pH de los tratamientos.

Al excluir los microorganismos del EM5, se comprobó que no existió acción enzimática significativa sobre la germinación de las esporas de ambos hongos. No obstante, el crecimiento del tubo germinativo de las esporas de *Colletotrichum* y *Fusarium* fue alterado al utilizar concentraciones de EM5 al 20%.

La prueba postcosecha en condiciones adecuadas para el crecimiento de los patógenos, indicó que los tratamientos con EM5 propiciaron el desarrollo de la pudrición, especialmente cuando el patógeno presente fue *Fusarium*.

Concentraciones de EM5 más una cera que reduzca la tasa respiratoria de la fruta y la pérdida de humedad, disminuyeron el avance de la pudrición sobre la corona del banano. El mejor de los tratamientos con EM5 fue el 20% más Verdiol. Sin embargo, el mejor controlador fue el testigo comercial (Biocto más Verdiol).

A través de los experimentos al nivel de laboratorio y postcosecha, para analizar el comportamiento del EM5, se determinó que el hongo *Colletotrichum* es más patogénico que el *Fusarium*. En coronas de banano donde el patógeno era *Colletotrichum*, bajas concentraciones de EM5 no estimularon la degradación del tejido. Sin embargo, el EM5 no controló la pudrición causada por éste.

## 7 RECOMENDACIONES

Se recomienda profundizar en el análisis químico del EM5, para determinar cuáles son los compuestos antagónicos a *Fusarium* y *Colletotrichum*.

Además, se recomienda detallar en las observaciones microscópicas del efecto de los compuestos, sobre las estructuras de ambos patógenos, a fin de entender mejor el mecanismo de acción de este biocontrolador.

Se recomienda estudiar la causa de la esporulación y detenimiento del crecimiento del micelio del *Colletotrichum* a nivel de laboratorio, ante concentraciones de EM5.

Es recomendable analizar la relación entre la tasa de crecimiento del *Fusarium* y su patogenicidad sobre las coronas de banano.

## 8 LITERATURA CITADA

- Alexopoulos, C; Mims C; Blackwell M. 1996. Introductory mycology. 4 ed. E.U.A., John Wiley & Sons, Inc. 869 p.
- Andrews, J; Tommerup, I. 1993. Advances in plant pathology. San Diego, E.U.A., Academic Press INC. v. 10, 347 p.
- Arneson, P. 1971. Sensitivity of Postharvest Rot Fungi of Bananas to Chlorine. *Phytopathology* 61:344-345.
- Asia - Pacific Natural Agriculture Network (APNAN). 1995. EM Application Manual for APNAN countries. (en línea). Holanda. Consultado el 12 de Septiembre del 2001. Disponible en <http://www.agriton.nl/apnanman.html>
- Asociación Naturland. 2001. Los consumidores tienen en sus manos el cambio de la agricultura. (en línea). Holanda. Última actualización 12 de marzo del 2001. Consultado el 6 de noviembre del 2001. Disponible en [http://www.naturland.de/spanisch/n1/seite1\\_1.html](http://www.naturland.de/spanisch/n1/seite1_1.html)
- Carlile M; Watkinson S. 1994. *The Fungi*. California, E.U.A., Academic Press Limited. 482 p.
- Castro, C; Motta, S; Akiba, F; Ribeiro, R. 1996. Potential use of EM for Control of Phytopathogenic Fungi and Bacteria. *In* Third International Conference Kyusei Natural Farming (1993, California, E.U.A.). Washington, Editorial U.S.D.A. – A.R.S/U.S.A.I.D. p. 236 – 237.
- Ciampa, L. 2001. The Organic Debate: Healthier or not. (en línea). Estados Unidos de América. CNN Organic Foods. Consultado el 6 de noviembre del 2001. Disponible en <http://www.cnn.com/FOOD/specials/2000/organic.debate.ciampa/index.html>
- De Lapeyere, L; Mourichon, X. 1998. The Biology of *Colletotrichum musae* and its relation to control of banana Anthracnose. *Acta Hortícola* 490: 297- 303.
- Demerutis, C. 2000. Eficacia Biológica del fungicida y bactericida Biocto 6 en el control postcosecha de la pudrición de la corona (*Fusarium semitectum*) en banano. Guácimo, CR, EARTH. 8 p. (Consultoría en Sistemas Postcosecha: Informe Técnico del Proyecto de Investigación).
- Demerutis, C. 2000. Procesos Fisiológicos y Sistemas de Postcosecha. Guácimo, CR, EARTH. 121 p.

- Dubón, G. 1998. Control biológico del nemátodo del volcamiento (*Radopholus similis*) en el cultivo del banano (Musa AAA). Trabajo de Graduación. Guácimo, C.R., EARTH. 76 p.
- Edens F; Parkhurst C; Casas I; Dobrogosz W. 1997. Principles of ex ovo competitive exclusion and in ovo administration of *Lactobacillus reuteri*. (en línea). Poultry Science Association: 179-196. (en línea) Poultry Production and Research Using EM Technologies. Consultado el 9 de Septiembre del 2001. Disponible en <http://emtrading.com/em/htmlpapers/poultryrepf.html>
- Elango, F. 1999. Manual de laboratorio del curso de manejo de plagas y enfermedades. Uso de un hematócmetro. EARTH, C.R. s.p.
- FAO. 1987. Manual para el mejoramiento del manejo postcosechas de frutas y hortalizas. Serie Tecnología Postcosecha 6. Traducido al español del original en inglés: Improvement of Post-harvest Fresh Fruits and Vegetables Handling - A Manual. Santiago, Chile, Oficina Regional de la FAO, para América Latina y El Caribe. Santiago, Chile. Consultado 13 mayo 2001. Disponible en <http://www.fao.org/inpho/vlibrary/x0055s/X0055S02.htm>
- Finlay, A; Brown, E. 1993. The relative importance of *Colletotrichum musae* as a crown - rot pathogen on Windward Island bananas. Plant Pathology (1993) 42, 67 – 74. Reino Unido.
- Folleto informativo. Mertect 22 SL.
- Fokkema, N. 1973. The role of Saprophytic Fungi in antagonism against *Dreschlera sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*) on agar plates and on rye leaves with pollen. Physiological Plant Pathology 1973(3), 195 – 205.
- French, E; Hebert, T. 1982. Métodos de investigación Fitopatológica. San José, CR., Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). 290 p.
- Fundación Guilombé.1993. Principios y Prácticas de la Agricultura en el Trópico. San José, CR, 128 p.
- García, J. 1998. La Agricultura Orgánica en Costa Rica. San José, C.R, EUNED. 100 p.
- Green, L; Goos, R. 1963. Fungi asociated with crown rot of boxed bananas. Phytopathology 53: 271- 275.
- González, M. 1987. Enfermedades del cultivo del banano. San José (C.R) Programa de Educación Agrícola de la Universidad de Costa Rica. 102 p.



- Janisiewicz, W. 2000. *Pseudomonas syringae* (saprophytic strain) and "Fruit Yeasts". Cornell University, E.U.A. Última actualización 24 de enero del 2000. Consultado 11 abril 2001. Disponible en [www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/pseudomonas\\_s.html](http://www.nysaes.cornell.edu/ent/biocontrol/pathogens/pseudomonas_s.html)
- Higa, T. sf. *The Technology of Effective Microorganisms – Concept and Philosophy*. Okinawa (Japan), University of the Ryukyus. Consultado el 9 de Septiembre del 2001. <http://www.royagcol.ac.uk/research/conferences/higa.htm>
- Krauss, U; Soberanis, W. 2000. Control de pudriciones postcosecha con extracto de mashua (*Tropaeolum tuberosum*). *Manejo Integrado de Plagas* 57: 23-28. C.R., Proyecto CABI –CATIE.
- Arbizu C; Tapia M. 1994. Andean Tubers. *In Neglected Crops: 1942 from a Different Perspective* (Roma, Italia, FAO). *Plant Production and Protection* 26: 149 –163.
- Labavitch, J; Lange, D. 1995. To Rot or Not to Rot, That is the Question. *Integrated Pest Management* 9: 27-29.
- López, J; Marrero, A. 1998. Use of hot water dips to control the incidence of banana crown rot. *Acta Hortícola* 490: 563 –569. Tenerife, España.
- Hernández, J; Sala, L; Gallo, L. 1987. Podrredumbre de la corona ("crown rot") y otros daños. 1era parte. *Fruticultura profesional*. 52-56 p.
- Hernández, J; Sala, L; Gallo, L. 1987. Podrredumbre de la corona ("crown rot") y otros daños. 2da parte. *Fruticultura profesional*. 64-67 p.
- Mendoza, I; Beltré, J. 2000. Control de la pudrición de la corona en plátano, en la Región Atlántica de Costa Rica. Trabajo de Graduación. Las Mercedes de Guácimo, CR, EARTH. 60 p.
- Marín, D. 1997. Hongos Asociados a la pudrición de la corona del banano. *In Informe Anual Corporación Bananera Nacional (CORBANA)* (1996, San José, C.R.). Costa Rica, Dirección de Investigaciones y Servicios Agrícolas. 67 p.
- Productos Biogénicos. 2001. Bioto 6, fungicida y bactericida botánico. San José (C.R.), Producto Biogénicos S.A. (Boletín Técnico).
- Productos Biogénicos. 2000. Bioto 6: Fungicida y Bactericida para el control de enfermedades en cutivos pre y poscosecha. San José, C.R. Producto Biogénicos S.A. 4 p. (Boletín Técnico).

- Productos Biogénicos. 2001. Verdiol, cera protectante orgánica para frutos y plantas. San José, C.R., Producto Biogénicos S.A. (Boletín Técnico).
- Okumoto, S. 2001. Uso de EM5 para la agricultura natural. Preparación de EM5. EARTH. Las Mercedes de Guácimo, CR. s. p.
- Rodríguez, G. 1999. Manejo de la pudrición de la corona en banano orgánico. Trabajo de Graduación. Las Mercedes de Guácimo, CR, EARTH. 37 p.
- Díaz, J; Carmona, G; Castro, M. 1995. Instructivo básico de manejo postcosecha de plátano. San José (C.R), CONAPRO. 23 p.
- Umaña, G. 1996. Control de las Enfermedades postcosecha de frutas. *In X Congreso Nacional Agronómico*. San José, C.R., IICA. p. 63-67.
- Sancho, M.1989. Estudios de Suelos de la Finca EARTH, Guácimo, Limón. San José, CR. 151p.
- Slabaugh, W; Grove, M. 1982. Postharvest diseases of bananas and their Control. *Plant Disease* 66 (8). p 746 – 750.
- Sasaki, J. 1997. Alternativos para sustituir el uso de fungicidas en el tratamiento postcosecha, de la pudrición de corona en banano (*Musa AAA*). Trabajo de Graduación. Guácimo, CR, EARTH. 48 p.
- Shewfelt, R; Prusia, S. 1995. Challenges in handling fresh fruits and vegetables. In postharvest handling. California, E.U.A., Accademic Press, Inc. 358 p.
- Soto, M. 1995. Bananas: Cultivo y comercialización. San José, C.R., Editorial LIL S.A. 619 p.
- Ufer, C. 1997. Control biológico de nemátodos en banano (*musa AAA*) usando *Paecilomyces lilacinus*. Trabajo de Graduación. Guácimo, C.R., EARTH. 52 p.
- Willer, H; Yussefi, M. 2001. Organic Agriculture Worldwide 2001: Statistics and Future Prospects. (en línea). Consultado el 6 de noviembre del 2001. Königstein, Holland, Stiftung Ökologie and Landbau (SÖL). 134 p. Disponible en [http://www.soel.de/inhalte/publikationen/s\\_74\\_02.pdf](http://www.soel.de/inhalte/publikationen/s_74_02.pdf)
- Wood R. s.f. The Control of diseases of Lettuce by the use of antagonistic organisms. The Control of *Botrytis cinerea* Pers. England, Imperial College of Science and Technology. 203 – 208 p.

## **9 ANEXOS**

**Anexo 1. Dunnett para el crecimiento de *Fusarium* en la prueba de doble capa, después de 24 horas**

Comparación entre tratamientos	Diferencia Medias	Simultáneo 95%		Significancia
		Límite de confianza		
5-1	0.29	0.05	0.53	-
6-1	0.19	-0.05	0.43	-
2-1	-0.03	-0.27	0.21	-
3-1	-0.13	-0.37	0.11	-
7-1	-0.15	-0.39	0.09	-
4-1	-0.19	-0.43	0.05	-

Testigo con Inóculo = 1; EM5 1% = 2; EM5 5% = 3; EM5 20% = 4; Control de pH EM5 1% = 5; Control de pH EM5 5% = 6; Testigo Comercial = 7.

**Anexo 2. Dunnett para el crecimiento de *Fusarium* en la prueba de doble capa, después de 48 horas**

Comparación entre tratamientos	Diferencia Medias	Simultáneo 95%		Significancia
		Límite de confianza		
5-1	0.20	-0.25	0.65	-
6-1	-0.31	-0.76	0.14	-
2-1	-0.71	-1.16	-0.26	Sí
3-1	-1.06	-1.51	-0.61	Sí
7-1	-1.26	-1.71	-0.81	Sí
4-1	-1.66	-2.11	-1.21	Sí

Testigo con Inóculo = 1; EM5 1% = 2; EM5 5% = 3; EM5 20% = 4; Control de pH EM5 1% = 5; Control de pH EM5 5% = 6; Testigo Comercial = 7.

**Anexo 3. Duncan para el crecimiento de *Fusarium* en la prueba de doble capa, después de 48 horas**

Agrupación Duncan	Media	Tratamiento
A	1.89	5
B	1.69	1
C	1.38	6
D	0.98	2
E	0.63	7
F	0.43	3

Testigo con Inóculo = 1; EM5 1% = 2; EM5 5% = 3; EM5 20% = 4; Control de pH EM5 1% = 5; Control de pH EM5 5% = 6; Testigo Comercial = 7.

**Anexo 4. Duncan para el crecimiento de *Fusarium* en la prueba de doble capa, después de 72 horas**

Agrupación Duncan	Media	Tratamiento
A	3.47	5
A	3.43	1
B	2.67	6
C	1.55	2
C	1.19	7
D	0.67	3
E	0.08	4

Testigo con Inóculo = 1; EM5 1% = 2; EM5 5% = 3; EM5 20% = 4; Control de pH EM5 1% = 5; Control de pH EM5 5% = 6; Testigo Comercial = 7.

**Anexo 5. Media de pH de los tratamientos con agar Papa Dextrosa (PDA)**

Tratamientos en Agar PDA	pH
Testigo Inóculo (Agar PDA)	5.70
Control pH EM5 1%	4.64
Control pH EM5 5%	3.83
Control pH EM5 20%	3.52
Testigo Comercial (Biocto)	5.37

**Anexo 6. Dunnett para el crecimiento de *Colletotrichum* en la prueba de doble capa, después de 96 horas**

Comparación entre tratamientos	Diferencia Medias	Simultáneo 95% Límite de confianza		Significancia
6-1	-0.53	-1.45	0.40	-
5-1	-1.33	-2.26	-0.40	Sí
2-1	-6.17	-7.09	-5.24	Sí
7-1	-6.33	-7.26	-5.40	Sí
3-1	-6.55	-7.48	-5.62	Sí
4-1	-6.90	-7.83	-5.97	Sí

Testigo con Inóculo = 1; EM5 1% = 2; EM5 5% = 3; EM5 20% = 4; Control de pH EM5 1% = 5; Control de pH EM5 5% = 6; Testigo Comercial = 7.

**Anexo 7. Duncan para el crecimiento de *Colletotrichum* en la prueba de doble capa, después de 24 horas**

Agrupación Duncan	Media	Tratamiento
A	0.54	5
B	0.34	1
C	0.21	6
D	0.12	2
E	0.06	3
E	0.00	7

Testigo con Inóculo = 1; EM5 1% = 2; EM5 5% = 3; EM5 20% = 4; Control de pH EM5 1% = 5; Control de pH EM5 5% = 6; Testigo Comercial = 7.

**Anexo 8. Duncan para el crecimiento de *Colletotrichum* en la prueba de doble capa, después de 48 horas**

Agrupación Duncan	Media	Tratamiento
A	2.64	5
A	2.63	1
A	2.41	6
B	1.19	2
C	0.37	3
C	0.28	7
C	0.04	4

Testigo con Inóculo = 1; EM5 1% = 2; EM5 5% = 3; EM5 20% = 4; Control de pH EM5 1% = 5; Control de pH EM5 5% = 6; Testigo Comercial = 7.

**Anexo 9. Duncan para el crecimiento de *Colletotrichum* en la prueba de doble capa, después de 96 horas**

Agrupación Duncan	Media	Tratamiento
A	7.08	1
A	6.56	6
B	5.75	5
C	0.92	2
C	0.75	7
C	0.53	3
C	0.18	4

Testigo con Inóculo = 1; EM5 1% = 2; EM5 5% = 3; EM5 20% = 4; Control de pH EM5 1% = 5; Control de pH EM5 5% = 6; Testigo Comercial = 7.

**Anexo 10. Duncan para el porcentaje de *Fusarium* en la prueba de doble capa, después de 24 horas**

Agrupación Duncan	Media	Tratamiento
A	100.00	3
A	78.95	6
A	65.79	2
A	15.79	1
B	-100.00	5
B	122.22	4

Control de pH EM5 1% = 4; Control de pH EM5 5% = 5; EM5 5% = 2; EM5 1% = 1; EM5 20% = 3; Testigo Comercial = 6.

**Anexo 11. Duncan para el porcentaje de germinación de las esporas de *Fusarium*, a las 13 horas de la prueba**

Agrupación Duncan	Media	Tratamiento
A	100.00	1
A	98.63	5
B	93.28	4
B	87.72	2
B	84.96	7
B	84.72	6
C	80.78	3
D	0	8

Testigo con Inóculo= 1; EM5 1% sin Hervir= 2; EM5 5% sin Hervir= 3; EM5 20% sin Hervir = 4; EM5 1% Hervido= 5; EM5 5% Hervido= 6; EM5 20% Hervido = 7; Testigo Comercial= 8.

**Anexo 12. Duncan para el porcentaje de germinación de las esporas de *Colletrichum*, a las 13 horas de la prueba**

Agrupación Duncan	Media	Tratamiento
A	100.00	1
A	98.65	3
A	98.08	2
A	96.66	6
A	85.04	4
A	78.45	5
A	76.20	7
B	1.95	8

Testigo con Inóculo= 1; EM5 1% sin Hervir= 2; EM5 5% sin Hervir= 3; EM5 20% sin Hervir = 4; EM5 1% Hervido= 5; EM5 5% Hervido= 6; EM5 20% Hervido = 7; Testigo Comercial= 8.

**Anexo 13. Duncan para el porcentaje de biceptación de las esporas de *Fusarium*, a las 13 horas de la prueba**

Agrupación Duncan	Media	Tratamiento
A	77.10	6
B	56.75	3
B	54.35	7
B	52.25	2
B	50.09	5
B	40.00	1
C	33.72	4
D	0.00	8

Testigo con Inóculo = 1; EM5 1% sin Hervir = 2; EM5 5% sin Hervir = 3; EM5 20% sin Hervir = 4; EM5 1% Hervido = 5; EM5 5% Hervido = 6; EM5 20% Hervido = 7; Testigo Comercial = 8.



**Anexo 14. Duncan para el porcentaje de biceptación de las esporas de *Colletotrichum*, a las 13 horas de la prueba**

Agrupación Duncan	Media	Tratamiento
A	100.00	1
B	54.98	2
C	45.79	6
D	33.99	5
E	22.09	7
F	18.45	3
F	10.57	4
G	0.00	8

Testigo con Inóculo= 1; EM5 1% sin Hervir= 2; EM5 5% sin Hervir= 3; EM5 20% sin Hervir = 4; EM5 1% Hervido= 5; EM5 5% Hervido= 6; EM5 20% Hervido = 7; Testigo Comercial= 8.

**Anexo 15. Duncan para grado de pudrición de corona con inóculo de *Fusarium*, al cuarto día de la prueba postcosecha**

Agrupación Duncan	Media	Tratamiento
A	1.70	4
B	1.50	2
C	1.30	5
C	1.30	3
C	1.20	8
D	1.10	1
D	1.00	7
D	1.00	6
D	1.00	9

Testigo con Inóculo = 1; EM5 1% = 2; EM5 5% = 3; EM5 20% = 4; EM5 1%+Verdiol = 5; EM5 5%+Verdiol = 6; EM5 20%+Verdiol = 7; Verdiol = 8; Testigo Comercial = 9.

**Anexo 16. Duncan para la pudrición de corona con inóculo de *Colletotrichum*, al quinto día de la prueba postcosecha**

Agrupación Duncan	Media	Tratamiento
A	3.60	8
B	3.50	1
C	3.10	4
D	3.00	6
E	2.90	7
F	2.70	3
F	2.60	9
G	2.40	2
H	1.80	5

Testigo con Inóculo = 1; EM5 1% = 2; EM5 5% = 3; EM5 20% = 4; EM5 1%+Verdiol = 5; EM5 5%+Verdiol = 6; EM5 20%+Verdiol = 7; Verdiol = 8; Testigo Comercial = 9.

**Anexo 17. Duncan para el porcentaje de inhibición de los tratamientos en la pudrición de corona causada por el *Colletotrichum*, al sexto día de la prueba postcosecha**

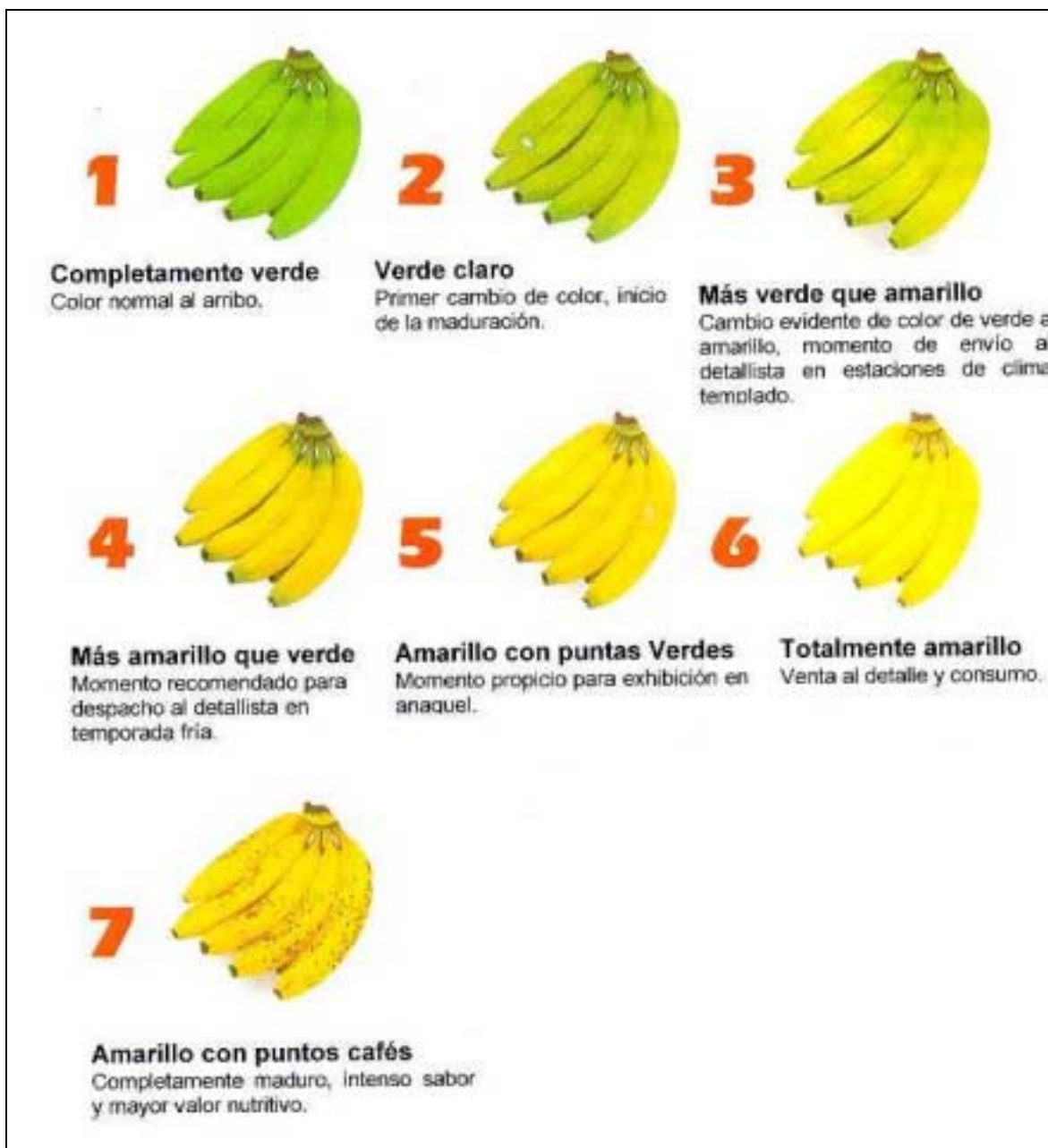
Agrupación Duncan	Media	Tratamiento
A	35.00	1
B	25.00	2
C	17.50	3
D	10.00	4
D	10.00	5
E	5.00	6
E	2.5	7
F	-15.00	8

Testigo comercial = 1; EM5 1% + Verdiol = 2; EM5 1% = 3; EM5 5% = 4; EM5 5% + Verdiol = 5; EM5 20% + Verdiol = 6; Verdiol = 7; EM5 20% = 8.

**Anexo 18. Correlaciones entre las diferentes variables evaluadas en los experimentos postcosecha**

	<b>Días</b>	<b>Pudrición <i>Colletotrichum</i></b>	<b>Pudrción <i>Fusarium</i></b>	<b>Maduración <i>Colletotrichum</i></b>	<b>Maduración <i>Fusarium</i></b>
<b>Días</b>	1.00	0.80	0.75	0.98	0.98
		<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
<b>Pudrición <i>Colletotrichum</i></b>	0.80	1.00	0.79	0.81	0.77
	<0.0001		<0.0001	<0.0001	<0.0001
<b>Pudrición <i>Fusarium</i></b>	0.75	0.79	1.00	0.74	0.74
	<0.0001	<0.0001		<0.0001	<0.0001
<b>Maduración <i>Colletotrichum</i></b>	0.98	0.80	0.74	1.00	0.97
	<0.0001	<0.0001	<0.0001		<0.0001
<b>Maduración <i>Fusarium</i></b>	0.98	0.77	0.74	0.97	1.00
	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001	

## Anexo 19. Escala de evaluación de grado de maduración de banano



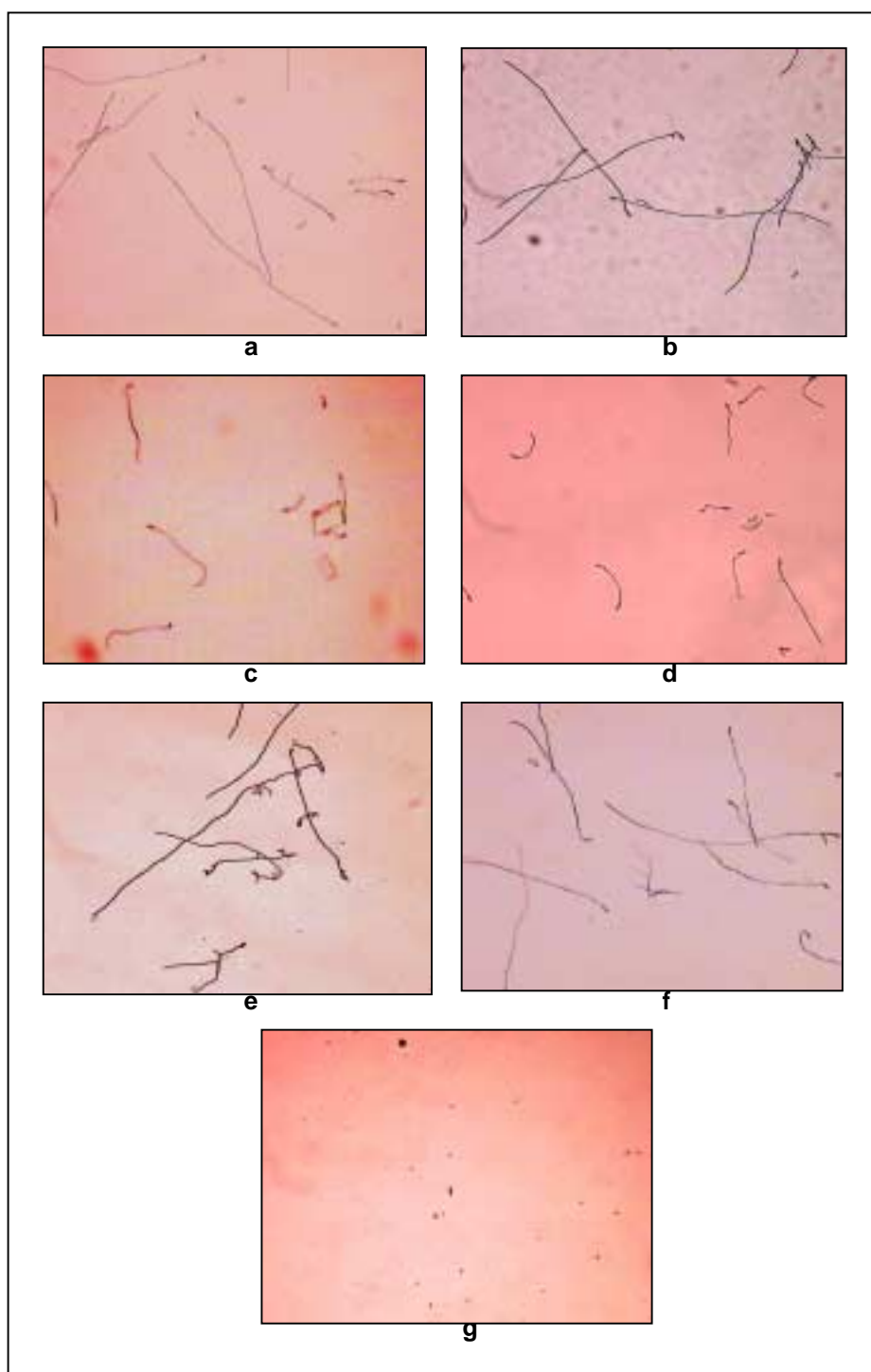
Fuente: Turbana Corporation (1994).

## Anexo 20. Escala de evaluación del grado de pudrición de corona de banano



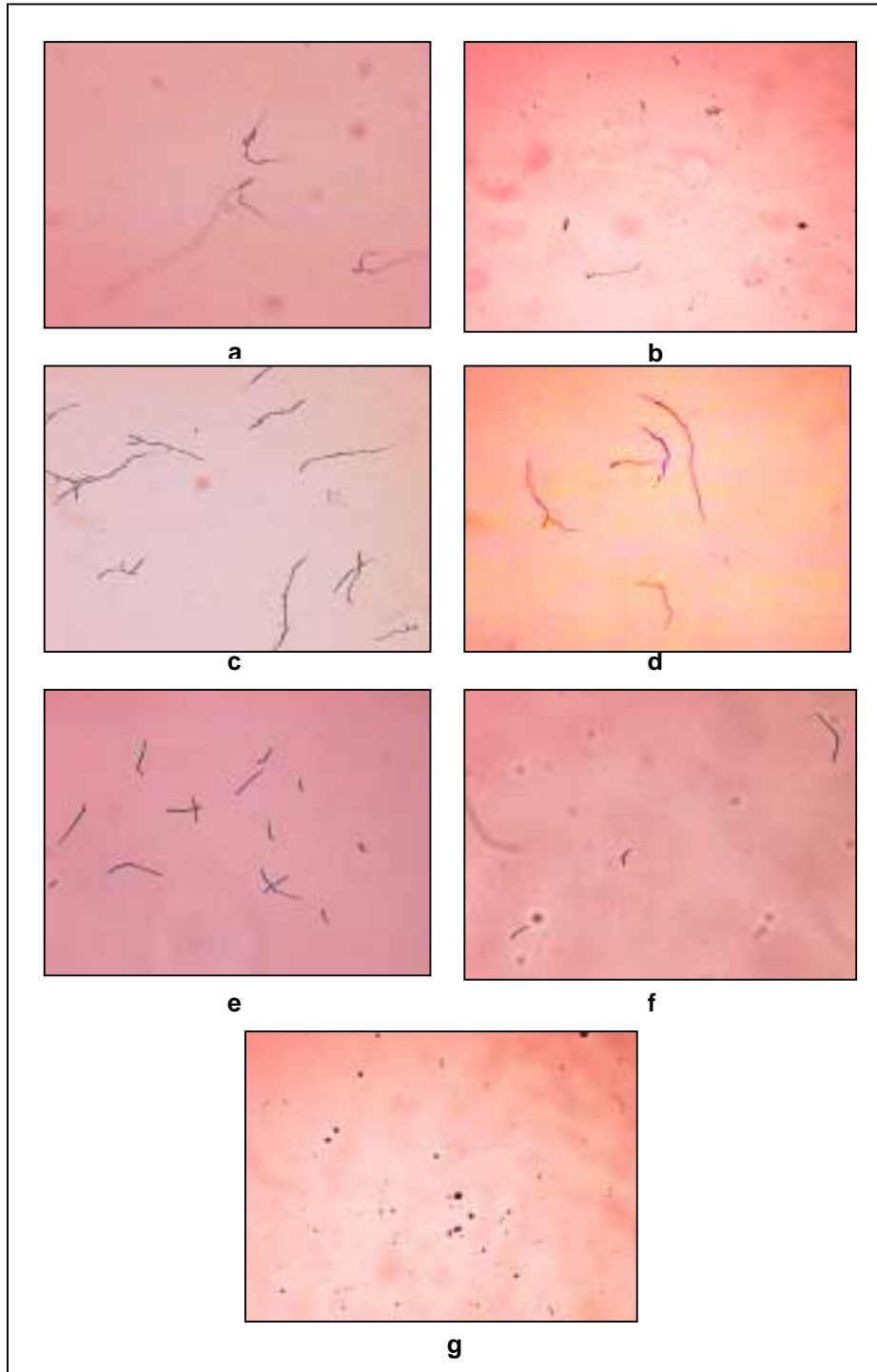
Fuente: Rodríguez (1999).

**Anexo 21. Imágenes capturadas (ocular 10x) en el experimento de acción enzimática en esporas de *Colletotrichum***



EM5 1% Hervido = a; EM5 1% sin Hervir = b; EM5 20% Hervido = c; EM5 20% sin Hervir = d;  
EM5 5% Hervido = e; EM5 5% sin Hervir = f; Testigo Comercial = g.

**Anexo 22. Imágenes capturadas (ocular 10x) en el experimento de acción enzimática en esporas de *Fusarium*.**



EM5 1% Hervido = a; EM5 1% sin Hervir = b; EM5 5% Hervido = c; EM5 5% sin Hervir = d;  
EM5 20% Hervido = e; EM5 20% sin Hervir = f; Testigo Comercial = g