

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
CAMPUS TECNOLÓGICO LOCAL SAN CARLOS
ESCUELA DE AGRONOMÍA**

**EVALUACIÓN DE AGENTES PARA EL COMBATE BIOLÓGICO DE
ENFERMEDADES POSCOSECHA EN BANANO (*Musa* AAA) Y
FACTORES QUE AFECTAN SU DESEMPEÑO**

Trabajo Final de Graduación presentado a la Escuela de Agronomía como
requisito parcial para optar al grado de Licenciatura en Ingeniería en Agronomía

ANTOINE NIEUWENHUYSE GORDON



Carrera de Ingeniería en Agronomía
Campus Tecnológico Local
San Carlos
2019 - 2023

SAN CARLOS, 2022

DERECHOS RESERVADOS © 2022 ANTOINE NIEUWENHUYSE GORDON

EVALUACIÓN DE AGENTES PARA EL COMBATE BIOLÓGICO DE ENFERMEDADES POSCOSECHA EN BANANO (*Musa* AAA) Y FACTORES QUE AFECTAN SU DESEMPEÑO

ANTOINE NIEUWENHUYSE GORDON

Aprobado por los miembros del Tribunal Evaluador:

Ing. Biot. Fabián Echeverría Beirute, Ph.D

Asesor Interno

Ing. Agr. Claudiana Carr Rodríguez, M.Sc

Asesora Externa

Ing. Agr. Ricardo Villalta Bresciani, M.Sc

Jurado

Ing. Agr. Carlos Ramírez Vargas, Ph.D

Coordinador
Trabajos Finales de Graduación

Ing. Agr. Milton Villarreal Castro, Ph.D

Director
Escuela de Agronomía

2022

DEDICATORIA

A mis padres, Kathia y Andreas, por brindarme todo el amor, apoyo y entendimiento que me impulsaron a culminar con éxito esta etapa.

AGRADECIMIENTOS

A Dios y a mi familia, por hacerme sentir acompañado.

A la Corporación Bananera Nacional S.A. (CORBANA) por abrirme sus puertas y darme la oportunidad de realizar la presente investigación.

De manera especial, a la M.Sc. Claudiana Carr Rodríguez por su dedicación, tiempo y conocimientos invertidos para apoyarme durante este trabajo, por siempre estar dispuesta a escucharme y aconsejarme.

Asimismo, al Ph.D. Fabian Echeverría Beirute por su amable ayuda, consejos y acompañamiento que me brindó desde un inicio para llevar por buen camino esta investigación.

A los profesionales de investigación M.Sc. Fabiola Alfaro Alvarado y M.Sc. Ricardo Villalta Bresciani por su invaluable colaboración.

Al M.Sc. Mauricio Guzmán Quesada, por sus importantes aportes y conocimientos transmitidos.

Al Ph.D. Jorge Sandoval Fernández por la ayuda brindada en un inicio.

A los asistentes y personal del Laboratorio de Control Biológico y Fitopatología de CORBANA que me ayudaron, incluyeron y me hicieron sentir parte de la familia.

A los profesores del Tecnológico de Costa Rica y compañeros que fueron parte de esta etapa. Por su amistad y vivencias juntos, a Vinicio Barquero, Gerald Sánchez, Aaron Salas, Jeffry Valverde, Álvaro Quesada, Raúl García, Paula Chacón, Rebeca Villalobos, Ignacio Bermúdez, Alejandro Gutiérrez, David Salas, Brayan Chavarría, Juan Mena, Jorge Abarca, Antonio Umaña y Gustavo Mora.

A todos, gracias.

CONTRIBUYENTES Y FUENTES DE FINANCIAMIENTO

Este proyecto de investigación es de interés para los objetivos de la Dirección de Investigaciones de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA S.A.), por lo que fue financiado en su totalidad por dicha institución.

ÍNDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA.....	i
AGRADECIMIENTOS	ii
CONTRIBUYENTES Y FUENTES DE FINANCIAMIENTO	iii
ÍNDICE DE CONTENIDO.....	iv
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xiii
1.CAPÍTULO I: ENFERMEDADES POSCOSECHA DEL CULTIVO DE BANANO (<i>Musa</i> AAA) Y EL COMBATE BIOLÓGICO COMO UNA ALTERNATIVA DE CONTROL.....	18
1.1. RESUMEN.....	18
1.2. ABSTRACT	19
1.3. INTRODUCCIÓN.....	20
1.4. REVISIÓN DE LITERATURA	23
1.4.1. Enfermedades poscosecha de importancia en banano	23
1.4.1.1. Pudrición de la corona.....	23
a. Agentes causales.....	23
b. Síntomas.....	25
1.4.1.2. Antracnosis.....	26
a. Agente causal	26
b. Síntomas.....	27
1.4.1.3. Etiología de las enfermedades poscosecha del banano	28
1.4.2. Manejo de enfermedades poscosecha en banano	30
1.4.2.1. Control cultural/	30
1.4.2.2. Control químico	31
1.4.2.3. Control biológico.....	32
a. Evaluación de <i>Bacillus</i> spp. en el combate biológico de enfermedades poscosecha del banano	35

b. Evaluación de <i>Streptomyces</i> spp. en el combate biológico de enfermedades poscosecha del banano	37
c. Evaluación de <i>Trichoderma</i> spp. en el combate biológico de enfermedades poscosecha del banano	39
d. Evaluación de ACB en combinación con otras alternativas de control..	41
1.5. CONCLUSIONES.....	43
1.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
2.CAPÍTULO II. EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DE LA EFICACIA BIOLÓGICA, BIOCOMPATIBILIDAD Y FACTORES QUE AFECTAN LA EFICACIA DE MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS EN EL COMBATE DE ENFERMEDADES POSCOSECHA DEL BANANO.....	53
2.1. RESUMEN.....	53
2.2. ABSTRACT	54
2.3. INTRODUCCIÓN.....	55
2.4. MATERIALES Y METODOS	57
2.4.1. Localización y periodo de estudio	57
2.4.2. Colección de microorganismos	57
2.4.2.1. Microorganismos seleccionados	57
2.4.2.2. Reactivación de microorganismos.....	58
2.4.2.3. Preparación de cultivos puros	58
2.4.2.4. Crioconservación de microorganismos.....	59
2.4.3. Cuantificación de microorganismos mediante espectrofotometría	60
2.4.3.1. Preparación de suspensiones microbianas y medición de absorbancias.....	60
2.4.3.2. Conteo de unidades formadoras de colonia (UFC)	61
2.4.3.3. Análisis estadístico	61
2.4.4. Identificación de microorganismos	61
2.4.4.1. Identificación molecular	61
2.4.4.1. Prueba Analytical Profile Index (API®).....	62

2.4.5. Etapa I. Evaluación de la eficacia biológica <i>in vitro</i> de los ACB contra <i>Colletotrichum musae</i> y <i>Fusarium proliferatum</i>	63
2.4.5.1. Prueba de antagonismo mediante cultivo dual con ACB en crecimiento activo.....	63
a. Material y diseño experimental	63
b. Metodología para cultivo dual con ACB en crecimiento activo.....	64
c. Evaluación.....	64
2.4.5.2. Prueba de antagonismo mediante cultivo dual con biofermentos y extractos crudos	65
a. Evaluación de la producción de enzimas líticas	65
b. Preparación de biofermentos	66
c. Preparación de extractos crudos.....	68
d. Material y diseño experimental	68
e. Metodología del cultivo dual con biofermentos y extractos crudos	69
f. Evaluación	70
2.4.5.3. Evaluación de extractos crudos sobre la germinación de conidios de <i>Colletotrichum musae</i> y <i>Fusarium proliferatum</i>	71
a. Material y diseño experimental	71
b. Preparación del inóculo.....	72
c. Metodología para prueba sobre la germinación de conidios de <i>C. musae</i> y <i>F. proliferatum</i> con extractos crudos	72
d. Evaluación	73
2.4.5.4. Análisis de muestras mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) y microscopía electrónica de transmisión (MET).....	74
a. Antagonismo del hongo LVQ-02 y efecto del extracto crudo de las bacterias PS-83 y CRB-15 sobre hifas y la morfología externa de conidios de <i>Colletotrichum musae</i> y <i>Fusarium proliferatum</i> observado mediante MEB.....	75
b. Efecto del extracto crudo de las bacterias PS-83 y CRB-15 sobre la morfología interna de conidios de <i>Colletotrichum musae</i> y <i>Fusarium proliferatum</i> observado mediante MET	76
2.4.6. Etapa II. Evaluación <i>in vitro</i> de la biocompatibilidad entre los ACB	77
2.4.6.1. Material experimental y tratamientos.....	77
2.4.6.2. Metodologías para prueba de biocompatibilidad entre ACB.....	77

a. Combinaciones bacteria-bacteria, bacteria-actinomiceto y actinomiceto-actinomiceto	77
b. Combinaciones bacteria-hongo, actinomiceto-hongo y hongo-hongo .	78
2.4.6.3. Evaluación.....	79
2.4.7. Etapa III. Evaluación <i>in vitro</i> de factores poscosecha del banano que afectan la eficacia de los ACB	79
2.4.7.1. Prueba de compatibilidad entre ACB y sulfato de aluminio y amonio (alumbre) al 1%.....	80
a. Material y diseño experimental	80
b. Metodología para prueba de compatibilidad entre ACB y alumbre al 1 %.....	80
c. Evaluación.....	81
2.4.7.2. Evaluación de la capacidad de inhibición del látex exudado de la corona sobre el crecimiento de ACB	81
a. Preparación de suspensiones microbianas.....	81
b. Extracción de látex.....	81
c. Metodología para evaluar capacidad antimicrobiana del látex.....	82
d. Evaluación	82
2.4.7.3. Evaluación de la capacidad de crecimiento de los ACB y patógenos poscosecha del banano a 14 °C.....	83
2.4.8. Etapa IV. Selección de ACB con mayor potencial antagonista para pruebas <i>in vivo</i> poscosecha.....	83
2.4.9. Análisis estadístico.....	85
2.5. RESULTADOS	87
2.5.1. Identificación de microorganismos	87
2.5.2. Etapa I. Evaluación de la eficacia biológica <i>in vitro</i> de los ACB contra <i>Colletotrichum musae</i> y <i>Fusarium proliferatum</i>	88
2.5.2.1. Prueba de antagonismo mediante cultivo dual con ACB en crecimiento activo.....	88
2.5.2.2. Prueba de antagonismo mediante cultivo dual con biofermentos y extractos crudos	89
a. Cultivo dual con biofermentos.....	89

b. Cultivo dual con extractos crudos	92
2.5.2.3. Evaluación de extractos crudos sobre la germinación de conidios de <i>Colletotrichum musae</i> y <i>Fusarium proliferatum</i>	96
2.5.2.4. Análisis de muestras mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) y microscopía electrónica de transmisión (MET).....	99
a. Efecto antagonista de <i>Trichoderma</i> sp. sobre hifas de <i>Colletotrichum musae</i> y <i>Fusarium proliferatum</i> observado mediante MEB.....	99
b. Efecto del extracto crudo de <i>Bacillus subtilis</i> sobre la morfología externa e interna de conidios de <i>Colletotrichum musae</i> y <i>Fusarium proliferatum</i> observado mediante MEB y MET.	101
2.5.3. Etapa II. Evaluación <i>in vitro</i> de la biocompatibilidad entre ACB.....	103
2.5.4. Etapa III. Evaluación <i>in vitro</i> de factores poscosecha del banano que afectan el desempeño de los ACB.....	105
2.5.4.1. Prueba de biocompatibilidad de ACB con sulfato de aluminio y amonio (alumbre) al 1%.....	105
2.5.4.2. Evaluación de la capacidad de inhibición del látex exudado de la corona sobre el crecimiento de ACB.	106
2.5.4.3. Evaluación <i>in vitro</i> de la capacidad de crecimiento de los ACB a 14 °C.....	107
2.5.5. Etapa IV. Selección de ACB mayor alto potencial antagonista para pruebas <i>in vivo</i> poscosecha.....	108
2.6. DISCUSIÓN.....	110
2.6.1. Evaluación de la eficacia biológica <i>in vitro</i> de los ACB contra <i>Colletotrichum musae</i> y <i>Fusarium proliferatum</i>	110
2.6.2. Evaluación <i>in vitro</i> de la biocompatibilidad entre ACB.	114
2.6.3. Evaluación <i>in vitro</i> de factores poscosecha del banano que afectan el desempeño de los ACB.	115
2.7. CONCLUSIONES.....	117
2.8. RECOMENDACIONES.....	119
2.9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120

3.CAPÍTULO III. EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i> DE LA EFICACIA BIOLÓGICA DE MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS EN EL COMBATE DE ENFERMEDADES POSCOSECHA DEL BANANO.....	128
3.1. RESUMEN.....	128
3.2. ABSTRACT	129
3.3. INTRODUCCIÓN.....	130
3.4. MATERIALES Y METODOS	131
3.4.1. Localización y período de estudio.....	131
3.4.2. Evaluación <i>in vivo</i> de ACB seleccionados para el combate de enfermedades poscosecha del banano.	131
3.4.2.1. Material y diseño experimental.....	131
a. Experimento 1	132
b. Experimento 2.....	132
3.4.2.2. Preparación del inóculo.....	133
3.4.2.3. Preparación de tratamientos	133
a. Experimento 1	134
b. Experimento 2.....	134
c. Tratamientos testigo.....	135
3.4.2.4. Obtención de mini gajos.....	135
3.4.2.5. Aplicación de tratamientos	137
3.4.2.6. Manejo poscosecha	137
3.4.2.7. Evaluación.....	139
3.4.3. Análisis estadístico.....	141
3.5. RESULTADOS	142
3.5.1. Experimento 1	142
3.5.1.1. Profundidad de la pudrición de la corona y pudre del pedúnculo .	142
3.5.1.2. Pudrición de la corona y moho en la corona	144
3.5.1.3. Antracnosis y maduración	145
3.5.2. Experimento 2.....	146

3.5.2.1. Profundidad de la pudrición de la corona	146
3.5.2.2. Pudrición de la corona y moho en la corona	148
3.5.2.3. Antracnosis, pudre del pedúnculo y maduración	149
3.6. DISCUSIÓN.....	151
3.7. CONCLUSIONES	154
3.8. RECOMENDACIONES.....	155
3.9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	156
4. ANEXOS	160

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Microorganismos seleccionados y su origen para las evaluaciones <i>in vitro</i>	58
Cuadro 2. Tratamientos evaluados contra <i>Colletotrichum musae</i> y <i>Fusarium proliferatum</i> en prueba de antagonismo <i>in vitro</i> mediante enfrentamiento en cultivo dual con ACB en crecimiento activo.....	64
Cuadro 3. Medios de cultivo líquidos seleccionados para cada aislamiento.....	67
Cuadro 4. Tratamientos evaluados contra <i>Colletotrichum musae</i> y <i>Fusarium proliferatum</i> en prueba de antagonismo mediante cultivo dual con biofermentos y extractos crudos.....	69
Cuadro 5. Tratamientos evaluados contra <i>Colletotrichum musae</i> y <i>Fusarium proliferatum</i> en prueba de germinación de conidios con extractos crudos al 5 % y 10 % (v/v).....	71
Cuadro 6. Escalas de distribución de puntos de pruebas <i>in vitro</i> para la selección de los ACB evaluados en las pruebas <i>in vivo</i> poscosecha.	85
Cuadro 7. Identificación molecular de microorganismos utilizados para pruebas <i>in vitro</i>	87
Cuadro 8. Porcentajes de inhibición promedio del crecimiento de dos patógenos asociados a enfermedades poscosecha, según agente de control biológico aplicado.	88
Cuadro 9. Porcentajes de inhibición del crecimiento de <i>Colletotrichum musae</i> y <i>Fusarium proliferatum</i> promediados según tres medios de cultivo líquidos para la fermentación de los ACB.	90
Cuadro 10. Porcentajes de inhibición de biofermentos elaborados en tres medios de cultivo líquidos sobre el crecimiento de <i>Colletotrichum musae</i> y <i>Fusarium proliferatum</i>	91
Cuadro 11. Interacción entre agentes de combate biológico que demuestra su biocompatibilidad.	104

Cuadro 12. Porcentajes de biocompatibilidad entre los ACB y alumbre al 1 % evaluados a 5 y 30 minutos de contacto.	106
Cuadro 13. Puntajes obtenidos y selección de ACB para pruebas <i>in vivo</i> contra <i>Colletotrichum musae</i> y <i>Fusarium proliferatum</i> , agentes causales de enfermedades poscosecha del banano.	109
Cuadro 14. Tratamientos y dosis de los biofermentos y productos evaluados en el primer experimento <i>in vivo</i> con los ACB seleccionados con mayor potencial.	132
Cuadro 15. Tratamientos y dosis de los biofermentos y productos evaluados en el segundo experimento <i>in vivo</i> con los ACB seleccionados con mayor potencial.	133
Cuadro 16. Frecuencias relativas de las variables pudre del pedúnculo (PC) y moho en la corona (MC) encontradas en fruta tratada con biofermentos producidos por tres ACB aplicados individualmente al 10 %, en combinación con alumbre al 1 % y almacenada por 25 días a 14 °C.	145
Cuadro 17. Frecuencias relativas de la variable antracnosis encontradas en fruta tratada con biofermentos producidos por tres ACB aplicados individualmente al 10 %, en combinación con alumbre al 1 % y almacenada por 25 días a 14 °C.	146
Cuadro 18. Frecuencias relativas de las variables pudre de la corona (PC) y moho en la corona (MC) encontradas en fruta tratada con tres activadores metabólicos aplicados individualmente al 1 %, en combinación con dos biofermentos al 10 % y almacenada por 25 días a 14 °C.	148
Cuadro 19. Frecuencias relativas de la variable antracnosis encontradas en fruta tratada con tres activadores metabólicos aplicados individualmente al 1 %, en combinación con dos biofermentos al 10 % y almacenada por 25 días a 14 °C.	149
Cuadro 20. Frecuencias relativas de la variable pudre del pedúnculo encontradas en fruta tratada con tres activadores metabólicos aplicados individualmente al 1 %, en combinación con dos biofermentos al 10 % y almacenada por 25 días a 14 °C.	150

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características morfológicas de <i>Fusarium proliferatum</i> . A. crecimiento micelial en PDA después de 8 días de incubación a 27 °C. B. macro y microconidios hialinos, sin septos y con formas elípticas u ovaladas (40X). C. clamidosporas dispuestas en cadena. D. microconidio germinado por ambos extremos observado mediante MEB (1900X). Fuente: propia.....	25
Figura 2. Síntomas típicos de la pudrición de la corona y pedúnculo en banano (<i>Musa</i> AAA, subgrupo Cavendish). Fuente: propia.	26
Figura 3. Características morfológicas de <i>Colletotrichum musae</i> . A. crecimiento micelial en PDA después de 8 días de incubación a 27 °C con presencia de acérvulos (círculo rojo). B. conidios hialinos, sin septos, con formas elípticas, cilíndricas u ovalados y con extremos redondeados (60X). C. grupo de conidios germinados observado mediante microscopia electrónica de barrido (1900X). Fuente: propia.....	27
Figura 4. Patogenicidad de <i>Colletotrichum musae</i> en bananos (<i>Musa</i> AAA) del subgrupo Cavendish. A. síntomas de antracnosis en fruta artificialmente inoculada. B. lesión de antracnosis con aspecto necrótico y hundido. C. daño mecánico en esquina angular del fruto colonizado por <i>C. musae</i> . D. masa de esporas color naranja (25X). Fuente: propia.	28
Figura 5. Flores y restos de pseudotallo en descomposición que cumplen la función de ser fuente de inóculo para patógenos que causan enfermedades poscosecha del banano. Fuente: propia.....	29
Figura 6. Colección de aislamientos y patógenos crioconservada por medio del método CRYOBANK™.	60
Figura 7. Ejemplo de evaluación para prueba de antagonismo contra <i>C. musae</i> y <i>F. proliferatum</i> , mediante cultivo dual con ACB en crecimiento activo. R1: sin ACB. R2: con ACB.....	65

Figura 8. Procesos de filtrado de los fermentos microbianos con bomba de vacío y biorreactor a través de membranas millipore 0,2 µm para la obtención de extractos crudos libres de células.....	68
Figura 9. Ejemplo de evaluación para prueba de antagonismo contra <i>C. musae</i> y <i>F. proliferatum</i> mediante cultivo dual con biofermentos y extractos crudos.	70
Figura 10. Ejemplo de evaluación para prueba sobre la germinación de conidios de <i>C. musae</i> y <i>F. proliferatum</i> con extractos crudos. Cada punto representa una repetición.....	73
Figura 11. Diferentes tipos de respuesta en la germinación de conidios por efecto de los extractos crudos. A. <i>Colletotrichum musae</i> . B. <i>Fusarium proliferatum</i> . 1. no germinados (testigo). 2. germinados normales. 3. no germinados. 4. tubos cortos. 5. Distorsionados. 6. tubos cortos y distorsionados.	74
Figura 12. Ejemplo de evaluación (patrón en cruz) para prueba biocompatibilidad entre bacteria-bacteria, bacteria-actinomiceto y actinomiceto-actinomiceto.	78
Figura 13. Ejemplo de evaluación para prueba de biocompatibilidad entre bacteria-hongo y actinomiceto-hongo.	79
Figura 14. Proceso de extracción de látex para prueba de biocompatibilidad entre ACB y látex exudado de frutos de banano con 12 semanas de edad (floración-cosecha).	82
Figura 15. Efecto antagonista de ACB en crecimiento activo sobre el crecimiento de dos patógenos asociados a enfermedades poscosecha del fruto de banano.....	89
Figura 16. Efecto antagonista de biofermentos sobre el crecimiento de dos patógenos asociados a enfermedades poscosecha del fruto de banano.....	92
Figura 18. Efecto antagonista de extractos crudos producidos por ACB sobre el crecimiento de dos patógenos asociados a enfermedades poscosecha del fruto de banano.	95
Figura 19. Porcentaje de conidios de <i>Colletotrichum musae</i> (A) y <i>Fusarium proliferatum</i> (B) obtenidos en la categoría de referencia frente a extractos crudos de	

ACB producidos en tres medios de cultivo líquidos. **F.** medio de fermentación. **Y.** medio YEGK. **L.** medio de actividad lítica. 97

Figura 20. Efecto *in vitro* de diferentes tratamientos evaluados al 10 % sobre la germinación de conidios de *Colletotrichum musae* después de 15 horas de incubación. **A.** no germinados (60X). **B.** germinación normal (10X). **C.** PS-83 medio fermentación (40X). **D.** CRB-15 medio fermentación (40X). **E.** PS-83 medio YEGK (40X). **F.** ACT-123 medio YEGK (40X). **G.** AQ-115 medio actividad lítica (20X). **H.** HQ-35 medio actividad lítica (40X)..... 98

Figura 21. Efecto *in vitro* de diferentes tratamientos evaluados al 10 % sobre la germinación de conidios de *Fusarium proliferatum* después de 15 horas de incubación. **A.** no germinados (60X). **B.** germinación normal (10X). **C.** PS-83 medio fermentación (60X). **D.** CRB-15 medio fermentación (60X). **E.** PS-83 medio YEGK (60X). **F.** ACT-123 medio YEGK (60X). **G.** AQ-112 medio YEGK (60X). **H.** AQ-115 medio actividad lítica (40X). 99

Figura 22. Interacción entre *Trichoderma* sp. (LVQ-02) y *C. musae* (CM) observada mediante MEB. **A.** crecimiento de LVQ-02 en paralelo a CM. **B.** estructura en forma de “gancho” (flecha negra) y deposición de material fibrilar (flecha blanca). **C.** depresión causado por LVQ-02 en hifa de CM (flecha negra) y deposición de material fibrilar (flecha blanca). **D.** conidios de LVQ-02 (flecha negra) y CM (flecha blanca). 100

Figura 23. Interacción entre *Trichoderma* sp. (LVQ-02) y *F. proliferatum* (FP) observada mediante MEB. **A.** estructura en forma de “gancho” (flecha negra) y pérdida de turgencia en hifa de FP (flecha blanca). **B.** estructura en forma de “gancho” (flecha negra) y crecimiento de LVQ-02 en paralelo a FP (flecha blanca). **C.** depresión causado por LVQ-02 en hifa de FP (flecha negra). **D.** hifa de LVQ-02 con material fibrilar..... 101

Figura 24. Micrografías con MEB y TEM de conidios de *C. musae* tratados con extractos crudos de PS-83 y CRB-15 (*B. subtilis*) producidos en medio de cultivo líquido de fermentación. **A.** conidio testigo (MEB). **B.** efectos de extracto crudo de PS-83 sobre conidios (MEB). **C.** conidios tratados con extracto crudo de CRB-15

(MEB). **D.** corte transversal de conidio testigo (TEM). **E.** corte transversal de conidio tratado con extracto crudo de PS-83 (TEM). **F.** corte transversal de conidio tratado con extracto crudo de CRB-15 (TEM). **V:** vacuola. 102

Figura 25. Micrografías con MEB y TEM de conidios de *F. proliferatum* tratados con extractos crudos de PS-83 y CRB-15 (*B. subtilis*) producidos en medio de cultivo líquido de fermentación. **A.** conidio testigo (MEB). **B.** efectos de extracto crudo de PS-83 sobre conidios (MEB). **C.** conidios tratados con extracto crudo de CRB-15 (MEB). **D.** corte longitudinal de conidio testigo (TEM). **E.** corte transversal de conidio tratado con extracto crudo de PS-83 (TEM). **F.** corte transversal de conidio tratado con extracto crudo de CRB-15 (TEM). **N:** núcleo. **V:** vacuola. **S:** septo..... 103

Figura 26. Crecimiento en conjunto de agentes de combate biológico que demuestra su biocompatibilidad..... 105

Figura 27. Efecto de discos impregnados con látex exudado de coronas de gajos de banano sobre el crecimiento de ACB utilizados para el control *in vitro* de enfermedades poscosecha. 107

Figura 28. Efecto de la temperatura de almacenamiento comercial del banano (14 °C) sobre el crecimiento de ACB utilizados para el control *in vitro* de enfermedades poscosecha, después de 8 y 5 días de incubación. 108

Figura 29. Preparación de las mezclas con biofermentos al 10 % y activadores metabólicos al 1 %, utilizadas en la segunda prueba *in vivo* poscosecha. 135

Figura 30. Proceso de obtención de mini gajos para pruebas *in vivo* poscosecha, simulando a pequeña escala el procedimiento convencional de una planta empacadora. **A.** lavado de manos de banano. **B.** conformación de mini gajos de banano. **C.** deslataxado y limpieza final de mini gajos. **D.** Secado e identificación de tratamientos. 136

Figura 31. Aplicación de tratamientos sobre la corona y cascara de mini gajos de banano (**A**) y bomba manual de 500 ml de capacidad total para aplicación (**B**). 137

Figura 32. Manejo poscosecha brindado a las pruebas *in vivo* realizadas, simulando el procedimiento de empaque y las condiciones para un envío transoceánico. **A.**

empaques de fruta en cajas de cartón modificadas. B. rotulado y bolsa tipo Banavac® de alta densidad. C. acomodo de unidades experimentales. D. cámara de maduración.	138
Figura 33. Metodología utilizada por CORBANA para el cálculo del porcentaje de pudre de corona en la prueba de mini gajos (Sánchez 2018).	140
Figura 34. Escala para la evaluación de la maduración de la fruta del banano (Chacón <i>et al.</i> 1987).	140
Figura 35. Efecto sobre la variable profundidad de pudrición de la corona encontrado en fruta tratada con biofermentos producidos por tres ACB aplicados individualmente al 10 %, en combinación con alumbre al 1 % y almacenada por 25 días a 14 °C.	143
Figura 36. Profundidad de pudrición de la corona observada en fruta tratada con biofermentos producidos por tres ACB aplicados individualmente al 10 %, en combinación con alumbre al 1 % y almacenada por 25 días a 14 °C.	143
Figura 37. Efecto sobre la variable pudrición del pedúnculo encontrado en fruta tratada con biofermentos producidos por tres ACB aplicados individualmente al 10 %, en combinación con alumbre al 1 % y almacenada por 25 días a 14 °C.	144
Figura 38. Efecto sobre la variable profundidad de pudrición de la corona encontrado en fruta tratada con tres activadores metabólicos aplicados individualmente al 1 %, en combinación con dos biofermentos microbianos al 10 % y almacenada por 25 días a 14 °C.	147
Figura 39. Profundidad de pudrición de la corona observada en fruta tratada con tres activadores metabólicos aplicados individualmente al 1 %, en combinación con dos biofermentos microbianos al 10 % y almacenada por 25 días a 14 °C.	147

1. CAPÍTULO I: ENFERMEDADES POSCOSECHA DEL CULTIVO DE BANANO (*Musa AAA*) Y EL COMBATE BIOLÓGICO COMO UNA ALTERNATIVA DE CONTROL

1.1. RESUMEN

Las enfermedades causadas por hongos son una de las principales limitantes en la producción y comercialización del banano (*Musa AAA*) en Costa Rica, siendo la pudrición de la corona y la antracnosis los problemas fitopatológicos poscosecha de mayor incidencia e importancia. Los principales agentes causales de estas enfermedades son los hongos *Colletotrichum musae* y *Fusarium* spp., cuyas esporas son transportadas desde el campo a las pilas de lavado de la fruta. Durante el deslatexado inicia el proceso de infección mediante la penetración en la herida expuesta en la corona. El manejo convencional de estas se ha basado en la aplicación de fungicidas sintéticos durante el proceso de empaque, sin embargo, existe una tendencia mundial hacia la reducción del uso de estos productos. Como alternativa al control químico, surge el interés por usar agentes de combate biológico (ACB), bajo el concepto de manejo integrado de enfermedades. Bacterias del género *Bacillus* y *Streptomyces*, así como hongos del género *Trichoderma*, tienen la capacidad de brindar un control parcial de las enfermedades poscosecha del banano. Sin embargo, la mayoría de los tratamientos biológicos individuales siguen sin alcanzar el nivel de control de los productos químicos. Ante esto, el control biológico con ACB se ha combinado con otras alternativas de control para potenciar su acción antifúngica mediante efectos sinérgicos o aditivos. El objetivo de este capítulo fue realizar una revisión de la literatura sobre las enfermedades poscosecha en banano y los diferentes métodos de control, con énfasis en el combate biológico mediante microorganismos antagonistas.

Palabras clave: pudrición de la corona, antracnosis, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Trichoderma*.

1.2. ABSTRACT

Diseases caused by fungi are one of the main limitations in the production and marketing of bananas (*Musa AAA*) in Costa Rica, with crown rot and anthracnose being the postharvest phytopathological problems with the highest incidence and importance. The main causal agents of these diseases are the fungi *Colletotrichum musae* and *Fusarium* spp., whose spores are transported from the field to the fruit washing tanks. During delatexing, the infection process begins by penetrating the exposed wound in the crown. Conventional management of banana postharvest diseases has been based on the application of synthetic fungicides during the packing process, however, there is a global trend towards reducing the use of these products. As an alternative to chemical control, there is interest in using biological combat agents (BCAs), under the concept of integrated disease management. Bacteria from the genus *Bacillus* and *Streptomyces*, as well as fungi of the genus *Trichoderma*, can provide partial control of banana post-harvest diseases. However, however, most biological treatments applied individually still do not equalize chemical fungicides. For this reason, biological control with BCAs has been combined with other control alternatives to enhance its antifungal action through synergistic or additive effects. The objective of this chapter was to review the literature on postharvest diseases in bananas and the different control methods, with emphasis on biological combat through antagonistic microorganisms.

Key words: crown rot, anthracnose, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Trichoderma*.

1.3. INTRODUCCIÓN

El banano (*Musa AAA*) es una de las frutas más cultivadas y consumidas en todo el planeta (Soto 2014). Costa Rica es uno de los mayores productores y exportadores a nivel mundial, siendo los países miembros de la Unión Europea (UE) y Estados Unidos (EEUU) los principales destinos de la fruta nacional (CORBANA 2019). Durante el 2019, la UE adquirió el 53,2 % de la fruta nacional y EEUU un 32,2 % de la exportación bananera (FAO 2020). Durante ese mismo año, el país exportó aproximadamente 121 millones de cajas de banano, representando un 36,3 % de participación en las exportaciones del sector agrícola y aportando más de 1.000 millones de dólares anuales al país, además, este cultivo genera alrededor de 40.000 empleos directos y 100.000 indirectos, convirtiéndolo en una importante fuente de divisas para el país (CORBANA 2019).

Esta y el creciente interés en lograr una producción amigable con el medio ambiente son motivos para destinar esfuerzos y recursos para encontrar maneras más eficientes de producción y desarrollar paquetes tecnológicos más respetuosos con el ambiente. Sin embargo, aún existen algunos factores que limitan la producción y comercialización de la fruta, siendo las enfermedades causadas por hongos uno de los principales. La pudrición de la corona y la antracnosis son las enfermedades poscosecha con mayor incidencia en banano, causadas por un complejo de hongos (Soto 2015). Estas enfermedades pueden ocasionar pérdidas de un 10 % hasta un 60 % en frutos sometidos al control químico (Krauss y Johanson 2000) y más de un 80 % en un sistema de producción sin tratamiento químico (Alvindhia *et al.* 2000).

Las enfermedades poscosecha tomaron relevancia en el momento que el Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1) obligó a la sustitución del clon Gros Michel por clones del subgrupo Cavendish, naturalmente resistentes a esta enfermedad. Sin embargo, los frutos del cultivar Cavendish presentaron la desventaja de ser altamente susceptibles a daños mecánicos en la cáscara provocados durante el transporte, razón por la cual se pasó de exportar racimos enteros a manos y gajos empacados en cajas de cartón. A la hora de preparar los gajos, las manos se deben separar del raquis por medio de un corte en la corona.

Esto genera heridas expuestas con las condiciones ideales para la colonización de los patógenos (Lukezic *et al.* 1967, Slabaugh y Grove 1982, Lassois y de Lapeyre de Bellaire 2014).

La aplicación de fungicidas sintéticos durante el proceso de empaque es el tratamiento de mayor uso para el control de las enfermedades poscosecha en banano (Lassois y de Lapeyre de Bellaire 2014). Sin embargo, el constante uso de productos químicos para el control de la Sigatoka negra (*Pseudocercospora fijiensis*) que comparten molécula con algunos fungicidas sintéticos usados en el control poscosecha, ha favorecido la selección de ciertas poblaciones de hongos resistentes (Johanson y Blazquez 1992, Krauss y Johanson 2000, Salazar *et al.* 2012). Esto ocasiona una disminución en la eficiencia de las aplicaciones químicas y obliga a los productores a mezclar fungicidas y aumentar las dosis para lograr la efectividad esperada en periodos de alta presión de inóculo (Villalta *et al.* 2006).

Adicionalmente, en los últimos años se ha generado un interés global en la reducción del uso de fungicidas en la agricultura en general y el manejo poscosecha en frutas no es la excepción, a causa de la preocupación por la salud humana y ambiental (Alvindia *et al.* 2000). Debido a esto, normas internacionales como EPA, CODEX y U.E. han establecido los Límites Máximos de Residuos (LMR) permitidos de plaguicidas que pueden detectarse en el banano de exportación, los cuales son cada vez más rigurosos (Sánchez 2018). Por estas razones, durante los últimos años CORBANA ha investigado diferentes alternativas para el control de las enfermedades poscosecha en banano, tales como el combate biológico, uso de extractos botánicos, ceras vegetales, atmósferas modificadas y tratamientos térmicos, que ayuden a disminuir el uso y la dependencia a estos productos químicos.

El combate biológico poscosecha es una potencial alternativa al control químico. El sitio de infección limitado en la fruta y las condiciones ambientales definidas y estables durante el almacenamiento podrían hacer de esta alternativa algo viable de implementar (Lassois *et al.* 2010). Sin embargo, la eficacia de este método de combate ha resultado limitada y variable contra enfermedades poscosecha en

banano y otras frutas (Hernández-Lauzardo et al. 2007); en algunas pruebas realizadas con agentes de combate biológico (ACB) a nivel de transporte, bajo las condiciones de manejo poscosecha utilizadas en Costa Rica, no se encontró ningún aporte en el control de enfermedades poscosecha del banano (Rivas 2016). Esto podría estar influenciado por factores ajenos a los microorganismos, tales como la temperatura de almacenamiento, producción de látex del fruto, materiales de empaque o a la escasez de fuentes de energía para los ACB (Krauss y Johanson 2000, Rivas 2016, Vargas *et al.* 2017).

Debido a la baja eficacia obtenida en las pruebas *in vivo* desarrolladas con ACB contra las enfermedades poscosecha, a los problemas de comercialización de fruta ocasionados por pudres y al posible impacto negativo de los productos químicos sobre la salud humana y el ambiente, surge la necesidad de desarrollar una investigación que profundice en los factores que puedan estar limitando el desempeño de los ACB y con esto aumentar su eficacia en poscosecha. El objetivo de este capítulo fue realizar una revisión de la literatura sobre las enfermedades poscosecha en banano y sus diferentes métodos de control, con énfasis en el control biológico mediante microorganismos antagonistas.

1.4. REVISIÓN DE LITERATURA

1.4.1. Enfermedades poscosecha de importancia en banano

Hasta la década de 1960, el banano Gros Michel fue la principal variedad comercial cultivada por sus buenas características agronómicas. Estas cualidades incluían cierta resistencia a los daños mecánicos provocados durante el empaque y transporte de la fruta, lo cual permitía la exportación en racimos ya que era el método más práctico y económico. No obstante, su alta susceptibilidad a la enfermedad del Mal de Panamá causada por *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* raza 1, ocasionó la sustitución a clones de banano del subgrupo Cavendish. Estos clones presentaron excelente resistencia al Mal de Panamá, sin embargo, resultaron ser altamente susceptibles a los daños poscosecha por manipulación (Krauss y Johanson 2000, Jones 2018).

Por esta razón fue necesario cambiar el procedimiento de empaque; se pasó de exportar racimos enteros a cajas con bananos conformados en manos y gajos. Para preparar la fruta, las manos se separan de los racimos mediante cortes con cuchillo y posteriormente se sumergen en agua para eliminar la suciedad y el látex. El corte realizado genera una vía de entrada directa para los microorganismos patógenos que se encuentran suspendidos en el agua que contienen los tanques de lavado y deslataxado. Dando inicio a las enfermedades poscosecha más importantes y extendidas en los países productores y consumidores de banano, dentro de las cuales se encuentra la pudrición de la corona y la antracnosis (Krauss y Johanson 2000, Jones 2018).

1.4.1.1. Pudrición de la corona

a. Agentes causales

Esta enfermedad es causada por un complejo de hongos que varían según la época del año, la ubicación geográfica y donde destacan *Colletotrichum musae* y varias especies de *Fusarium* incluyendo *F. proliferatum*, *F. pallidoroseum*, *F. semitectum* y *F. verticillioides*, como principales agentes causales por su agresividad y capacidad de iniciar infección con bajos niveles de inóculo. Además, patógenos

como *Thielaviopsis paradoxa*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Verticillium theobromae* y otros hongos de los géneros *Acremonium*, *Ceratocystis*, *Aspergillus*, *Monilia*, *Mucor*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Nigrospora*, *Deightoniella*, *Myrothecium*, *Pestalotia*, *Cladosporium*, *Curvularia* y *Trichoderma* también han sido aislados e identificados de coronas afectadas por la enfermedad (Lukezic et al. 1967, Wallbridge 1981, Slabaugh y Grove 1982, Johanson y Blazquez 1992, Alvindia et al. 2000, Krauss y Johanson 2000, Anthony et al. 2004).

De acuerdo con un estudio realizado por Marín *et al.* (1996) donde aislaron e identificaron los hongos asociados con la pudrición de la corona en bananos de Latinoamérica, encontraron que las especies de *Fusarium* más frecuentes en plantaciones de banano de Costa Rica fueron *F. semitectum* y *F. moniliforme*. Con respecto a esta última especie, en los últimos años se ha determinado que *F. moniliforme* es un conjunto de múltiples especies, incluyendo *F. proliferatum*, y *F. verticillioides* (Proctor *et al.* 2010); por lo que la mayoría de los aislamientos de estas especies han sido identificados como *F. moniliforme* en investigaciones anteriores (Leslie y Summerell 2006). Además, Umaña (2009) encontró que los hongos aislados con mayor frecuencia de coronas de bananos producidos en un sistema convencional en el Caribe costarricense fueron *F. proliferatum*, *F. semitectum*, *F. graminearum*.

Fusarium spp. se encuentra entre los géneros de hongos de mayor importancia económica en el mundo por su capacidad fitopatogénica para causar marchitez vascular y pudriciones en raíces, tallos, frutas y semillas (Agris 2004). Este hongo produce macro y microconidios los cuales se unen a un conidióforo mediante fiálides, además, genera estructuras de resistencia a condiciones desfavorables llamadas clamidosporas (Figura 1. Características morfológicas de *Fusarium proliferatum*. **A.** crecimiento micelial en PDA después de 8 días de incubación a 27 °C. **B.** macro y microconidios hialinos, sin septos y con formas elípticas u ovaladas (40X). **C.** clamidosporas dispuestas en cadena. **D.** microconidio germinado por ambos extremos observado mediante MEB (1900X). Fuente: propia.) (Leslie y Summerell 2006). Aunque la mayoría de las especies de *Fusarium* son hongos que

habitan en el suelo, sus conidios pueden ser dispersados por el agua o viento, y su estilo de vida hemibiótrofo permite que también se puedan encontrar en cualquier tejido vivo de la planta (Rampersad 2020). Su temperatura óptima de crecimiento está entre los 27-30 °C, presentando un desarrollo limitado por debajo de los 18 °C y por encima de los 33 °C (Agris 2004).



Figura 1. Características morfológicas de *Fusarium proliferatum*. **A.** crecimiento micelial en PDA después de 8 días de incubación a 27 °C. **B.** macro y microconidios hialinos, sin septos y con formas elípticas u ovaladas (40X). **C.** clamidosporas dispuestas en cadena. **D.** microconidio germinado por ambos extremos observado mediante MEB (1900X). Fuente: propia.

b. Síntomas

Los síntomas de la enfermedad inician con un ablandamiento superficial y la formación de una capa de micelio esponjoso de color blanco o gris que puede cubrir la superficie cortada de la corona (moho en la corona), seguido de una podredumbre firme, de color oscuro, que se expande a través de la corona y que puede penetrar en el pedúnculo de los dedos individuales (pudre del pedúnculo) (Figura 2). En casos severos, cuando los dedos presentan pudre del pedúnculo, pueden llegar a debilitarse al punto de desprenderse de la corona. Si la descomposición continua, es capaz de llegar a la pulpa y afectar toda la fruta. Estos síntomas no son visibles a la hora del empaque ya que los mismos se desarrollan en el transcurso del transporte y almacenamiento en los países consumidores. Por otro lado, el tejido necrótico y estresado a causa de la enfermedad, provoca un incremento en los niveles de etileno liberado, lo que estimula la maduración temprana de la fruta durante el transporte (Lassois y de Lapeyre de Bellaire 2014, Jones 2018).

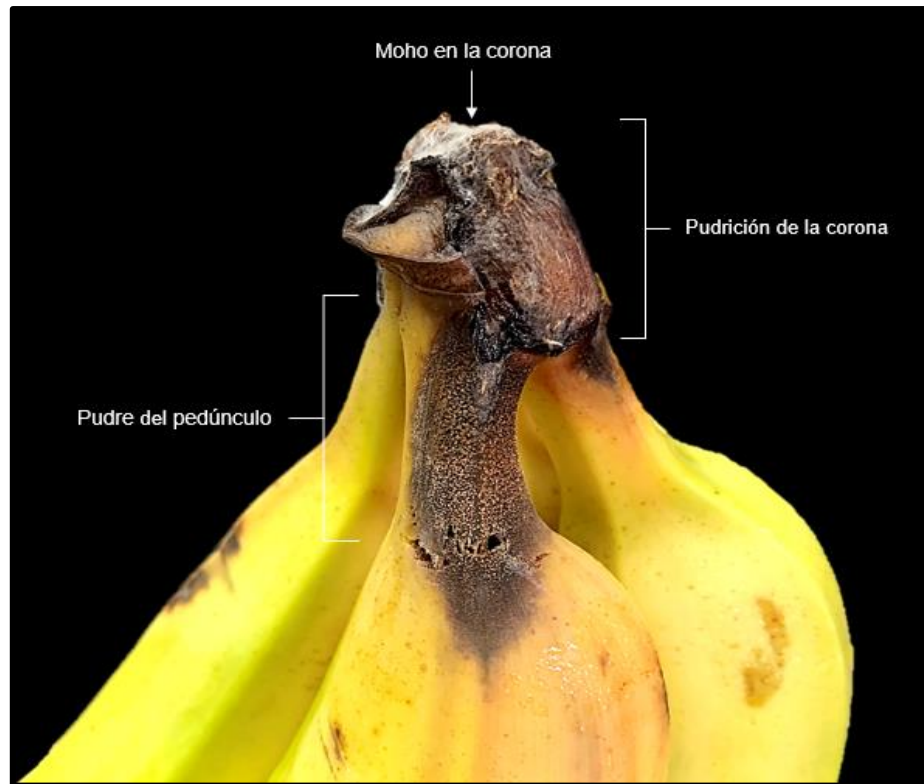


Figura 2. Síntomas típicos de la pudrición de la corona y pedúnculo en banano (*Musa* AAA, subgrupo Cavendish). Fuente: propia.

1.4.1.2. Antracnosis

a. Agente causal

La antracnosis es causada por el hongo *Colletotrichum musae*, el cual es un patógeno especializado de las musáceas y junto con la pudrición de la corona representan las enfermedades poscosecha más importantes en el banano. Este hongo produce conidios en conidióforos que surgen en acérvulos, los cuales se encuentran principalmente en frutos, pero también pueden aparecer en raquis, pseudopécíolos y hojas. La temperatura óptima de crecimiento y esporulación para *C. musae* es de 27 - 30 °C, presentándose poco crecimiento por debajo de los 15 °C (Ploetz *et al.* 2003, Nelson 2008, Jones 2018).

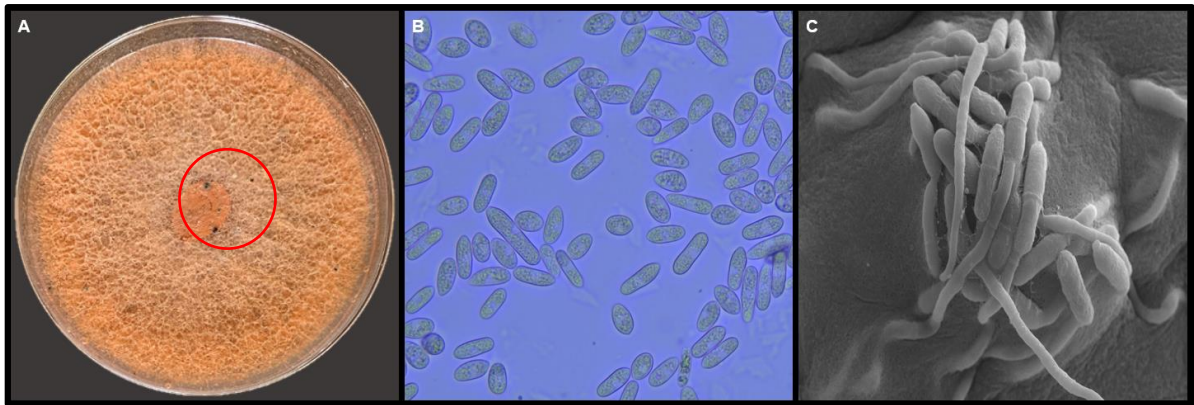


Figura 3. Características morfológicas de *Colletotrichum musae*. **A.** crecimiento micelial en PDA después de 8 días de incubación a 27 °C con presencia de acérvulos (círculo rojo). **B.** conidios hialinos, sin septos, con formas elípticas, cilíndricas u ovalados y con extremos redondeados (60X). **C.** grupo de conidios germinados observado mediante microscopia electrónica de barrido (1900X). Fuente: propia.

b. Síntomas

Los síntomas de esta enfermedad se manifiestan como lesiones necróticas en la cáscara de la fruta durante el transporte, almacenamiento y maduración (Figura 4). Conforme avanza la maduración de la fruta, las lesiones aumentan de tamaño y se fusionan para formar áreas extensas de tejido necrótico hundido con masas de esporas de color naranja (acérvulos). Las lesiones de antracnosis se desarrollan en el cuerpo principal de la fruta, en bananos comerciales los daños generalmente se dan en las esquinas angulares de la fruta que a menudo se raspan, rayan o magullan durante la manipulación y empaque; sin embargo, el patógeno también es capaz de causar lesiones en bananos sanos. Estas imperfecciones restan valor al aspecto general de la fruta y pueden causar la devolución de un contenedor a su puerto de origen (Ploetz *et al.* 2003, Nelson 2008, Jones 2018, Souza-Pollo y Goes 2020).

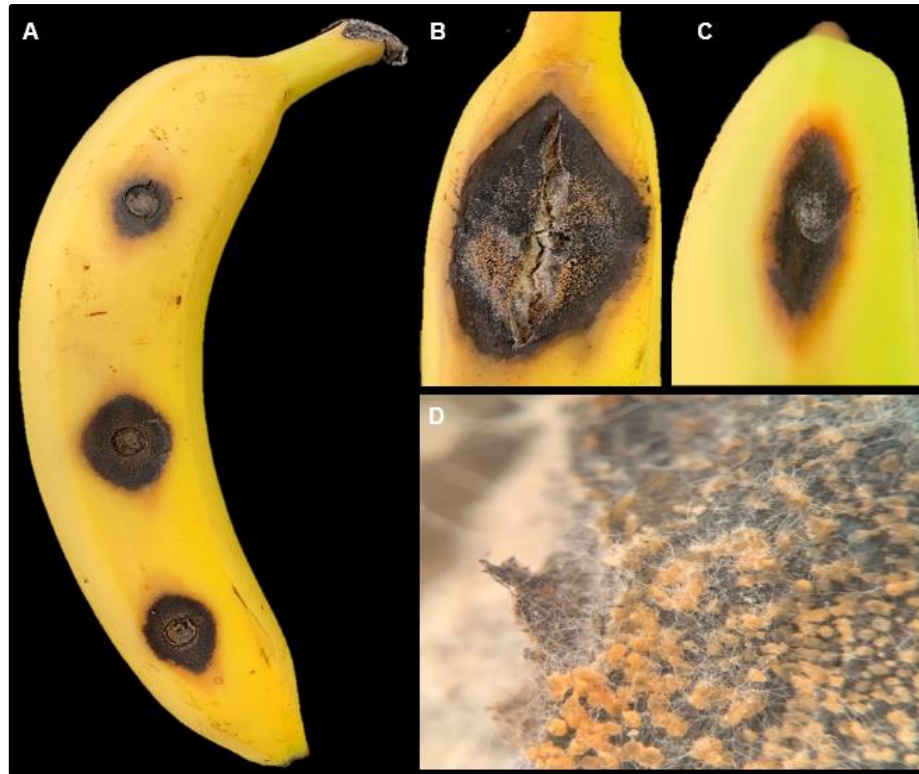


Figura 4. Patogenicidad de *Colletotrichum musae* en bananos (*Musa* AAA) del subgrupo Cavendish. **A.** síntomas de antracnosis en fruta artificialmente inoculada. **B.** lesión de antracnosis con aspecto necrótico y hundido. **C.** daño mecánico en esquina angular del fruto colonizado por *C. musae*. **D.** masa de esporas color naranja (25X). Fuente: propia.

1.4.1.3. Etiología de las enfermedades poscosecha del banano

La gran cantidad de patógenos involucrados en el complejo y el hecho de que las características de cada especie difieren, complica los estudios sobre la pudrición de la corona en la fruta del banano. Se sabe que los hongos causales de estas enfermedades son componentes de la microflora de las plantaciones, los cuales viven saprófitamente en hojas senescentes, pseudotallo, pedúnculos, brácteas y flores en descomposición de la planta de banano, siendo esta última considerada como la principal fuente de inóculo (Figura 5) (Krauss y Johanson 2000, Jones 2018). Según Meredith (1962) citado por Krauss y Johanson (2000), *C. musae* y algunas especies de *Fusarium* son capaces de formar estructuras infectivas cuando los órganos de la planta anteriormente mencionados se encuentran verdes; pero, no es hasta cuando dichas partes se encuentran en un estado de senescencia que los hongos son capaces de esporular (Lassois y de Lapeyre de Bellaire 2014).



Figura 5. Flores y restos de pseudotallo en descomposición que cumplen la función de ser fuente de inóculo para patógenos que causan enfermedades poscosecha del banano. Fuente: propia.

Las esporas de los hongos se depositan sobre los racimos de banano gracias al viento, lluvia o al agua de riego y son capaces de permanecer viables durante meses en el campo bajo condiciones extremas de humedad relativa y temperatura; por lo que sobrevivir un tiempo en frutos verdes no es problema (Krauss y Johanson 2000, Jones 2018). Por esta razón, la fruta cosechada transporta una gran carga de inóculo que se traslada al agua de los tanques de lavado y deslatajeado y el corte de las manos para conformar los gajos de banano les concede a los propágulos de los hongos una herida accesible para iniciar el proceso infeccioso (Slabaugh y Grove 1982, Krauss y Johanson 2000). El avance de la enfermedad a partir de este punto depende de varios factores, principalmente de la cantidad de inóculo, época del año, estado fisiológico de la fruta (estímulo nutricional), y las condiciones ambientales antes y después de la maduración (Lukezic *et al.* 1967, Krauss y Johanson 2000, Umaña 2009, Lassois y de Lapeyre de Bellaire 2014).

1.4.2. Manejo de enfermedades poscosecha en banano

1.4.2.1. Control cultural

El saneamiento en campo mediante la eliminación de hojas senescentes y brácteas en el momento del embolsado de la fruta es el punto de partida para el control de enfermedades poscosecha en el cultivo de banano (Slabaugh y Grove 1982). Estos materiales son una importante fuente de inóculo de los agentes causales de la pudre de la corona, y su eliminación podría contribuir a reducir la presión de inóculo y el posterior desarrollo de la enfermedad (Lassois y de Bellaire de Bellaire 2014). Además, se ha demostrado que el embolsado de los racimos puede reducir la incidencia de *C. musae* en más del 80 % (Lassois *et al.* 2010), de manera que se liberan menos esporas en el agua de lavado durante las operaciones de empaque.

Los restos florales de los frutos son considerados otra fuente significativa de inóculo para *C. musae*, *Fusarium* spp. y otros patógenos asociados (Lassois *et al.* 2010), por lo que su eliminación también es un paso importante para limitar la contaminación del agua de lavado y posteriormente, la fruta. La labor de desflora consiste en eliminar manualmente el periantio, los estambres y el estilo terminal que persisten adheridos al fruto, ya sea de manera temprana en campo o tardía en la planta empacadora (Soto 2017). Sin embargo, en una investigación desarrollada por Carr *et al.* (2014) descartaron que alguno de los dos métodos lograra eliminar o reducir de manera diferencial la presencia de hongos fitopatógenos asociados a enfermedades poscosecha del banano; pero indican que el lavado de los racimos con agua a presión, antes de que los frutos ingresen a las pilas, sí contribuye sustancialmente a reducir la carga fungosa presente en el racimo.

Por otro lado, controlar el desarrollo del racimo mediante la edad y el grado (grosor de los dedos) ayuda a reducir la susceptibilidad de los frutos a enfermedades poscosecha. Forret (2008) encontró que los frutos más jóvenes son menos susceptibles a la pudrición de la corona que los frutos de mayor edad y del mismo grado, demostrando que la sensibilidad de los frutos evoluciona linealmente con la edad fisiológica de la fruta. Esto podría estar relacionado con que los frutos jóvenes presentan una mayor concentración de metabolitos secundarios (compuestos

antimicóticos) responsables de un cierto nivel de resistencia a las enfermedades poscosecha, sin embargo, hacen falta trabajos investigativos que profundicen en el tema.

El tiempo que la fruta cosechada se mantiene a temperatura ambiente y la rapidez con la que se elimina el calor de campo también son factores importantes en el control de la pudrición de la corona. Según Krauss y Johanson (2000), la incidencia y la gravedad de la enfermedad crece a medida que aumenta el tiempo de exposición de la fruta a temperaturas superiores a 16 °C, viéndose favorecido el control de la pudrición de la corona por intervalos de cosecha a refrigeración de menos de 48 horas. Además, realizar procedimientos adecuados para la conformación de las manos, evitando cortes bruscos, y mantener un flujo de agua limpia y abundante en los tanques de lavado y deslataje junto con la adición de cloro, son métodos de control que ayudan a reducir la exposición a los hongos patógenos (Slabaugh y Grove 1982, Jones 2018).

1.4.2.2. Control químico

El tratamiento convencional de enfermedades poscosecha en banano con fungicidas es el método más utilizado comercialmente por su alta eficiencia (Lassois y de Lapeyre de Bellaire 2014). Esta estrategia se introdujo a finales de la década de 1960 con el descubrimiento de fungicidas sistémicos derivados del benzimidazol, como lo son el tiabendazol, carbendazim y benomil (Slabaugh y Grove 1982); después de un tiempo, se introdujeron otros fungicidas que inhiben la biosíntesis de ergosterol y la respiración mitocondrial, como el imazalil, bitertanol, miclobutanil y azoxystrobin (Lassois y de Lapeyre de Bellaire 2014). Según Jones (2018), los métodos de aplicación varían en cada finca comercial, incluyendo inmersión, aspersión, tratamiento en cascada y con brocha, pero, en todos los casos los frutos deben humedecerse completamente para asegurar la eficacia del tratamiento químico.

Actualmente, la mayoría de las fincas comerciales en Costa Rica asperjan mezclas de fungicidas (tiabendazol + azoxystrobin) para el control de enfermedades poscosecha, junto con la aplicación de alumbre para la coagulación del látex,

favorecer la cicatrización de los cortes en la corona y aumentar la lustrosidad en la fruta¹. Villalta *et al.* (2006) mencionan que el mezclar dos fungicidas de diferente modo de acción tiene considerables ventajas, como la reducción de las dosis, una mayor efectividad para controlar los patógenos y el posible retardo en el desarrollo de resistencia.

Este último aspecto es importante ya que se han reportado casos de poblaciones de *C. musae* y *Fusarium* spp. con poca sensibilidad al tiabendazol e imazalil (Johanson y Blazquez 1992, Marin *et al.* 1996, Leite *et al.* 2020). Además, el uso del azoxistrobin sin mezclar no es aconsejable debido a que los hongos pueden generar rápidamente resistencia a este tipo de fungicidas y su constante uso aéreo para el control de la Sigatoka negra aumenta ese riesgo (Villalta *et al.* 2006). Por lo que las mezclas de fungicidas para el control de enfermedades poscosecha en banano constituyen una herramienta importante para el manejo de resistencia y la detección de residuos químicos en los puertos de destino, debido a la reducción de las dosis.

1.4.2.3. Control biológico

El control o combate biológico de enfermedades es la reducción de la densidad de un patógeno, en su estado activo o latente, mediante la manipulación del hospedero y la utilización de microorganismos antagonistas (Blakeman y Fokkema 1982, van den Bosch *et al.* 1982, Campbell 1989). A esta definición se le suma la implementación de biopesticidas producto de fermentos microbianos y extractos botánicos con efecto biocida y la utilización de sustancias consideradas generalmente como seguras (GRAS, por sus siglas en inglés) (Janisiewicz y Korsten 2002). El control biológico tiene efectos más específicos que el control químico, es considerado más seguro para seres humanos, medio ambiente en general y puede desempeñar un papel importante en la fitoprotección si se utiliza junto con otras técnicas de control como parte de un Manejo Integrado de Plagas (MIP); sin

¹ Villalta, R. 26 de febrero del 2021. Comunicación personal. Finca San Pablo, Costa Rica, CORBANA S.A.

reemplazar completamente la utilización de los sistemas de control químico (Blakeman y Fokkema 1982, Ramírez *et al.* 2009, O'Brien 2017).

En el control biológico poscosecha se han descrito varios mecanismos de acción, dentro de los cuales se incluyen antibiosis, hiperparasitismo, competencia por espacio y nutrientes y la inducción de resistencia sistémica (Janisiewicz y Korsten 2002). Campbell (1989) menciona que por lo general más de un mecanismo está implicado en el biocontrol y en pocos casos se ha observado que exista un único mecanismo de acción involucrado. La antibiosis es la capacidad de un microorganismo de producir sustancias tóxicas para otros microorganismos, las cuales actúan a muy bajas concentraciones. Generalmente, la mayoría de los microorganismos producen y secretan uno o más compuestos con actividad antibiótica y, en algunos casos, estas toxinas han sido efectivas a la hora de suprimir fitopatógenos y las enfermedades que causan. Esta actividad de biocontrol se puede dar por la producción de metabolitos secundarios de bajo peso molecular, enzimas líticas o compuestos volátiles (Heydari y Pessarakli 2010, O'Brien 2017, Köhl *et al.* 2019).

El hiperparasitismo es la interacción competitiva directa entre un microorganismo patógeno y un biocontrolador (Heydari y Pessarakli 2010). Los hiperparásitos con un estilo de vida necrotrófico son los más estudiados para el control biológico, estos microorganismos atacan las hifas o esporas del huésped para posteriormente invadir las y obtener nutrientes de ellas, principalmente fuentes de carbono. El principal mecanismo de parasitismo es la producción de enzimas líticas y, en algunos casos, metabolitos secundarios que provocan la degradación de la pared celular del patógeno y posteriormente una lisis de la célula (O'Brien 2017, Köhl *et al.* 2019).

Según Köhl (2019), la competencia es la lucha entre dos o más organismos ante un mismo requerimiento que se encuentra en cantidades limitadas y que cuando la utilización del mismo por uno de los microorganismos reduzca la cantidad disponible para los demás. Este mecanismo se puede dar por la lucha de oxígeno, espacio y/o nutrientes (Heydari y Pessarakli 2010). En el control biológico poscosecha, la

competencia por espacio y nutrientes suele ser importante, ya que las esporas de los patógenos requieren de nutrientes exógenos para germinar e iniciar su crecimiento; esos nutrientes los encuentran en las heridas de las frutas y es allí donde la competencia microbiana actúa inhibiendo el desarrollo de los hongos (Janisiewicz y Korsten 2002).

Por otro lado, otro mecanismo asociado con la protección de las plantas y sus órganos por parte de los ACB es la inducción de las vías de defensa del huésped (Köhl *et al.* 2019). Existen dos principales tipos de resistencia inducida: resistencia sistémica adquirida y resistencia sistémica inducida, los cuales se activan mediante el estímulo producido por algunas fitohormonas, como el ácido salicílico, jasmónico, abscísico y el etileno (Romanazzi *et al.* 2016); según O'Brien (2017), los microorganismos antagonistas liberan elicitores (proteínas, antibióticos y compuestos volátiles) que inducen la expresión de los genes involucrados en la activación de las vías de dichas fitohormonas. Por ejemplo, Ongena *et al.* (2009) menciona que compuestos antifúngicos (iturinas y fungicinas) producidos por *B. subtilis* activan en plantas las enzimas de la vía de la lipoxigenasa, que impulsa la síntesis de ácidos jasmónico, una molécula importante que regula la resistencia sistémica inducida.

Históricamente, con el control biológico de fitopatógenos se han obtenido resultados inconsistentes debido a las variables ambientales, genéticas y fisiológicas que interactúan en los agroecosistemas, las cuales no se comprenden completamente o son difíciles de controlar (Bubici *et al.* 2019). Sin embargo, el uso de antagonistas microbianos aplicados en poscosecha presenta la condición de estar sujeto a menores cambios ambientales, ya que el almacenamiento controlado es una práctica común en esta etapa y un sitio de infección limitado al fruto, lo que podría ser manejado como una ventaja (Lassois y de Lapeyre de Bellaire 2014). Los resultados de varios estudios han sugerido que el uso de distintos microorganismos, como los hongos antagonistas del género *Trichoderma* (Mortuza y Ilag 1999, da Costa *et al.* 2021), así como bacterias del género *Bacillus* (Alvindhia y Natsuaki 2009)

y *Streptomyces* (Evangelista-Martínez *et al.* 2020), pueden proveer un control parcial de la pudrición de la corona y antracnosis en la fruta del banano.

a. Evaluación de *Bacillus* spp. en el combate biológico de enfermedades poscosecha del banano

Las bacterias del género *Bacillus* son microorganismos aerobios, mesófilos, de forma bacilar con tamaños variables (0,5 – 10 μm), con una reacción Gram positiva y se encuentran ampliamente distribuidas a nivel mundial (Villarreal-Delgado *et al.* 2018). Según Arrebola *et al.* (2010) y Carmona-Hernández *et al.* (2019), sus características de rápido crecimiento, alta competitividad, habilidad para sintetizar distintos metabolitos secundarios (lipopéptidos como iturinas, surfactinas y fengicidas), enzimas líticas (quitinasas y β -1,3-glucanasas) y la producción de compuestos orgánicos volátiles que inducen la resistencia sistémica, convierten a este género de bacterias en uno de los más investigados para el control biológico.

Además, estos microorganismos tienen la capacidad de formar endosporas las cuales les brinda la capacidad de sobrevivir en diferentes ecosistemas y de ser almacenadas por largos periodos de tiempo (Villarreal-Delgado *et al.* 2018). El uso de *Bacillus* spp. para el biocontrol de enfermedades poscosecha en frutas y hortalizas ha sido ampliamente estudiado (Lastochkina *et al.* 2019), con resultados promisorios en muchas de las investigaciones desarrolladas.

Alvindhia y Natsuaki (2009) evaluaron *in vitro* e *in vivo* una bacteria aislada de la superficie de frutos de banano e identificada como *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14, contra patógenos que causan la pudrición de la corona (*Colletotrichum musae*, *Fusarium verticillioides*, *Lasiodiplodia theobromae* y *Thielaviopsis paradoxa*). En condiciones de laboratorio, DGA14 y sus metabolitos difusibles son capaces de inhibir a todos los patógenos poscosecha en más de 50 %; además, una concentración de 10^8 células/ml afectó significativamente el crecimiento micelial y la germinación de conidios en medio de cultivo líquido. La evaluación *in vivo* mostró que la aplicación de la cepa de *B. amyloliquefaciens* DGA14 logró reducir la incidencia de pudre de corona en 58 % y 73 % después de 13 y 20 días de

almacenamiento a 25 °C, respectivamente; lo cual fue significativamente más bajo comparado con el control químico.

Fu *et al.* (2007) aislaron una cepa bacteriana (B106) proveniente del suelo de una plantación de banano en China, la cual mostró una fuerte actividad antagonista *in vitro* contra diferentes hongos patógenos que causan enfermedades pre y poscosecha en el cultivo de banano, incluidos *C. musae* (89 %) y *F. roseum* (>50 %). Fu *et al.* (2010) continuaron los estudios con esta cepa la cual identificaron molecularmente como *Bacillus subtilis*. Además, estos autores trabajaron en la optimización de las condiciones de cultivo con el objetivo de mejorar su bioeficacia, donde encontraron que con la combinación de 31 °C, medio de cultivo líquido EM, pH 7 y 5 días de incubación la bacteria expresó mayor inhibición contra *Pseudocercospora musae*. Bajo esas condiciones, B106 mostró una eficacia de control *in vivo* contra *C. musae* del 48,6 % y 41,2 % después de 14 y 17 días de almacenamiento a 25 °C, respectivamente.

Trueggelmann *et al.* (2017) evaluaron la eficacia *in vitro* e *in vivo* del biofungicida comercial Serenade AS® (*Bacillus subtilis* cepa QST 713) contra la pudre y el moho de la corona en bananos del subgrupo Cavendish provenientes de dos fincas comerciales en Filipinas, una con alta y otra con baja presión de inóculo de los patógenos. También estudiaron el modo y secuencia de aplicación junto con alumbre para determinar si esto podía influir en el desempeño del producto. En condiciones de laboratorio, se determinó que dosis altas del biofungicida (15 y 20 ml l⁻¹) redujo significativamente el crecimiento de *Colletotrichum musae*. Para las evaluaciones *in vivo*, los autores realizaron una simulación de envío de fruta a Japón durante 13 días a 13,5 °C más 6 días de maduración, donde encontraron que asperjar las dosis más altas de primero y luego aplicar el alumbre de la misma forma, redujo la incidencia de las enfermedades, pero sin igualar al tratamiento comercial.

Lopes *et al.* (2019) seleccionaron doce bacterias endófitas y rizosféricas aisladas de plantas de *Agave sisalana* del municipio de Bahia, Brasil y las evaluaron *in vitro* e *in vivo* contra *Colletotrichum musae*. Las evaluaciones *in vitro* demostraron que las bacterias inhiben al patógeno en un rango de 30 % a 70 % y que sus enzimas

hidrolíticas (celulasas, xilanasas y quitinasas) pueden afectar el crecimiento del hongo en un 39 % - 84 %. Cinco aislamientos fueron seleccionados para las pruebas poscosecha con bananos (cv. Prata) almacenados a 25 ± 2 °C por 7 días, de los cuales *Bacillus velezensis* resultó ser el más promisorio. La bacteria inhibió el crecimiento micelial y la esporulación de *C. musae*, mostrando un comportamiento similar al del tiabendazol (Tecto SC®).

b. Evaluación de *Streptomyces* spp. en el combate biológico de enfermedades poscosecha del banano

El género *Streptomyces* representa en la naturaleza el mayor número de especies y variedades de la familia Streptomycetaceae. Los microorganismos de este género se clasifican como eubacterias, sin embargo, crecen en forma de filamentos o micelio y no muestran las formas bacterianas bacilares o cocoides habituales; además, presentan una reacción Gram positiva (Sharma *et al.* 2014). Estas bacterias se encuentran principalmente en el suelo, degradando materia orgánica de origen vegetal y animal, pero ocasionalmente se aíslan de otras fuentes, como entornos marinos (Li *et al.* 2021). Una de las propiedades más llamativas de *Streptomyces* es su capacidad de producir antibióticos, demostrando ser la fuente más importante de metabolitos secundarios y enzimas líticas de valor industrial y comercial (Sharma *et al.* 2014). El uso de este género como agente de combate biológico está ampliamente documentado en la literatura (Bubici *et al.* 2019), no obstante, su aplicación en el control biológico poscosecha del banano es reciente.

El efecto biocontrolador de *Streptomyces* spp. fue investigado por Su *et al.* (2010), quienes aislaron actinomicetos provenientes de muestras de suelo de Malasia y los evaluaron *in vitro* contra uno de los patógenos asociados a la pudrición de la corona en bananos (*Fusarium* spp.). De 33 aislamientos encontrados, todos producían compuestos antifúngicos capaces de inhibir el crecimiento *in vitro* del patógeno, aunque con diversos grados de inhibición. Cada aislamiento lo identificaron a nivel de género mediante características culturales, morfológicas y bioquímicas. La caracterización reveló que el género dominante fue *Streptomyces*, con ocho

aislamientos, dos de estos presentaron el mayor potencial, con una inhibición *in vitro* sobre *Fusarium* spp. superior al 90 %.

Ara *et al.* (2012) evaluaron la actividad antagonista *in vitro* e *in vivo* de actinomicetos aislados de suelo de Arabia Saudita contra *Colletotrichum musae*. De 80 aislamientos evaluados *in vitro*, 17 presentaron una fuerte inhibición sobre el patógeno y fueron los seleccionados como potenciales agentes de control para las pruebas *in vivo*. Se utilizaron extractos crudos de los actinomicetos seleccionados, los cuales redujeron significativamente la gravedad de la antracnosis en bananos inoculados artificialmente y almacenados durante una semana a 30 °C. Los mejores cuatro tratamientos presentaron una inhibición de la enfermedad en la fruta del 77 al 85 % y fueron identificados bajo el género de *Streptomyces*.

Shu *et al.* (2017) estudiaron el antagonismo *in vitro* e *in vivo* de *Burkholderia cepacia* y *Streptomyces katrae* contra *Colletotrichum musae*. En condiciones de laboratorio, *S. katrae* presentó un porcentaje de inhibición del 63,1 % cuando se evaluó en crecimiento activo, sin embargo, cuando se utilizó su extracto libre de células el crecimiento micelial del patógeno se vio reducido en un 95,0 %. Además, el efecto inhibitorio sobre la germinación de conidios de *C. musae* fue del 100 %. En frutos de banano almacenados a 28 °C por 5 días, la eficacia de control del filtrado libre de células sobre la antracnosis resultó en un 33,2 % y la severidad de la enfermedad fue significativamente menor al control absoluto después de aplicar una suspensión de *S. katrae* sobre la cáscara. Los autores también evaluaron la estabilidad antagónica de los microorganismos, demostrando que *S. katrae* y su filtrado se mantienen estables después de ser subcultivado por diez generaciones y almacenado a 4 °C por 6 meses.

Evangelista-Martínez *et al.* (2020) investigaron la actividad antagonista *in vitro* de *Streptomyces* sp. cepa CACIS-1.5CA contra hongos patógenos que causan enfermedades poscosecha (*Colletotrichum musae*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum* sp., *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Botrytis* sp., *Rhizoctonia* sp., y *Rhizopus* sp.). Además, evaluaron la inhibición de la germinación de conidios mediante un extracto crudo producido por el microorganismo antagonista. Se

encontró que la mayor actividad inhibitoria de la cepa CACIS-1.5CA se presentó sobre el crecimiento micelial de *C. musae* (62,73 %). La germinación de conidios de este patógeno se vio afectada en más de un 90 % y se observaron cambios morfológicos en sus propágulos como membranas distorsionadas, deformación y colapso.

c. Evaluación de *Trichoderma* spp. en el combate biológico de enfermedades poscosecha del banano

Los hongos del género *Trichoderma* se caracterizan por ser microorganismos saprófitos, capaces de descomponer una amplia variedad de sustratos orgánicos, lo que les permite estar distribuidos en diversos ecosistemas (Infante *et al.* 2009). Según González-Estrada *et al.* (2019), *Trichoderma* spp. es el hongo de suelo aislado con mayor frecuencia de la rizosfera de las plantas; asimismo, Infante *et al.* (2009) indican que es un microorganismo oportunista, simbiote de plantas y cumple la función de parásito y antagonista de muchos hongos fitopatógenos. Este hongo es reconocido por su efectividad en el control de varios patógenos poscosecha, lo cual está relacionado con varios mecanismos de acción reportados como competencia, antibiosis, parasitismo y la inducción sistémica de resistencia en plantas y sus órganos (González-Estrada *et al.* 2019). Tanto en pre como en poscosecha, *Trichoderma* spp. se encuentran entre los agentes de control biológico fúngicos más estudiados y comercializados como bioplaguicidas y biofertilizantes (Vinale *et al.* 2008).

Mortuza y Ilag (1999) evaluaron quince aislamientos de *Trichoderma* spp. para determinar su bioeficacia contra *Lasiodiplodia theobromae*. Se seleccionaron dos aislamientos, *T. harzianum* y *T. viride*, los cuales exhibieron la mejor actividad antagónica *in vitro* contra el patógeno. Se observó un hiperparasitismo de los antagonistas alrededor de las hifas de *L. theobromae*, causando células del patógeno hinchadas, deformadas, acortadas o redondeadas. Las pruebas *in vivo* con frutos de banano en grado de maduración 5 y almacenados a 25 – 31 °C por 2 días, indicaron que *T. viride* logró reducir la pudrición entre un 29,07 % y un 65,06

%, y que la aplicación de este antagonista 4 horas antes de la inoculación del patógeno proporcionó una mejor protección.

Alvindhia y Natsuaki (2008) evaluaron el efecto antagónico *in vitro* de hongos aislados del fructoplano de banano contra *Lasiodiplodia theobromae*. Encontraron que trece hongos mostraron inhibición del crecimiento del patógeno, por lo que se analizaron adicionalmente contra *Thielaviopsis paradoxa*, *Colletotrichum musae* y *Fusarium verticillioides*. El aislamiento DGA001 identificado como *Trichoderma harzianum* presentó un antagonismo directo contra todos los patógenos evaluados, sus metabolitos secundarios afectaron significativamente el crecimiento micelial y la germinación de conidios de los hongos. En bananos inoculados artificialmente, el hongo sobrevivió y colonizó la fruta después de 3 días demostrando adaptabilidad a la superficie de combate. Además, presentó una reducción de pudrición de la corona del 68 % después de 20 días de incubación a 25 °C.

Adebesin *et al.* (2009) exploraron la posibilidad de utilizar especies de *T. asperellum* en el control biológico de *Colletotrichum musae*, *Fusarium oxysporum* y *Lasiodiplodia theobromae*. En condiciones *in vitro*, el filtrado libre de células de los antagonistas redujo el crecimiento micelial de *C. musae* y *F. oxysporum*, sin embargo, no tuvo efecto sobre el crecimiento de *L. theobromae*. En evaluaciones *in vivo*, el aislamiento *T. asperellum* NG-T161 aplicado solo o en combinación con los patógenos redujo la enfermedad, en comparación con la pudrición producida por los patógenos solos. En esta misma investigación los autores encontraron que algunas especies de *Trichoderma* podrían ser patogénicas en frutos heridos. El tratamiento de frutos con conidios y filtrados de cultivo de NG-T161 aplicados 30 minutos antes de la inoculación con los patógenos proporcionó un mejor control en comparación a su aplicación simultánea.

Sangeetha *et al.* (2009) determinaron el efecto antagonista *in vitro* e *in vivo* de veinte aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Colletotrichum musae* y *Lasiodiplodia theobromae*. En condiciones *in vitro*, los aislamientos tuvieron efectos antagónicos variados sobre el crecimiento micelial de los dos patógenos. La germinación de conidios y la longitud del tubo germinativo de los patógenos se vio afectada

significativamente por el filtrado de los antagonistas. Los autores seleccionaron ocho aislamientos según los ensayos *in vitro* y los evaluaron individualmente en bananos almacenados a 28 y 14 °C. Ningún aislamiento controló satisfactoriamente la pudrición de la corona en comparación con el fungicida químico. Sin embargo, dos aislamientos de *T. viride*, uno de *T. harzianum* y otro de *T. koningii* presentaron resultados promisorios cuando se aplicaron individualmente y se seleccionaron para su evaluación en mezclas de dos, tres y cuatro aislamientos. Las mezclas de tres y cuatro microorganismos redujeron la incidencia de pudrición de la corona, tanto a 28 y 14 °C, dando un mejor resultado que el control químico.

El efecto antagonista *in vitro* e *in vivo* de *Trichoderma piluliferum* y sus metabolitos secundarios contra *Colletotrichum musae*, fue evaluado en Brasil por da Costa *et al.* (2021). Los resultados en laboratorio indicaron que el crecimiento *T. piluliferum* inhibió totalmente el crecimiento del patógeno, mediante micoparasitismo y secreción de enzimas que degradan la pared celular; como quitinasas, N-acetil- β -D-glucosaminidasas, β -1,3-glucanasas y proteasas. Los metabolitos volátiles y no volátiles inhibieron el crecimiento micelial de *C. musae* en un 62 % y 20 %, respectivamente. En las pruebas poscosecha con bananos almacenados a 28 °C por 7 días, los autores encontraron que aplicar el antagonista 24 horas antes de la inoculación del patógeno resultó en una inhibición de la antracnosis estadísticamente igual al tratamiento químico.

d. Evaluación de ACB en combinación con otras alternativas de control

Existe una amplia base científica que documenta y evidencia la capacidad de varios géneros de microorganismos, entre ellos a *Bacillus*, *Streptomyces* y *Trichoderma*, como potenciales agentes de combate biológico, capaces de brindar una protección parcial contra las principales enfermedades poscosecha del banano. Sin embargo, cuando se utilizan ACB solos para el control de enfermedades poscosecha en banano y otras frutas, la mayoría de ellos no ofrecen el nivel de control que se alcanza con los fungicidas sintéticos de uso convencional (Lassois y de Lapeyre de Bellaire 2014). Dado a estas circunstancias, Bastiaanse (2010) menciona que el

control biológico podría considerarse como una herramienta a utilizar en combinación con otras alternativas de manejo, tales como el uso de sales orgánicas e inorgánicas (Alvindia 2013), empaques de atmósferas modificadas (Bastiaanse *et al.* 2010), tratamientos térmicos (Alvindia y Acda 2012) o activadores metabólicos², para dar lugar a una gestión integrada de manejo de enfermedades poscosecha del banano.

Alvindia y Acda (2012) analizaron un enfoque integral que combinaba tratamientos térmicos y la cepa DGA01 de *Trichoderma harzianum* contra cuatro hongos patógenos asociados a la pudrición de la corona en bananos. La bioeficacia *in vitro* de DGA01 se incrementó en un 11,41 % después de tratamiento con agua caliente (50 °C por 20 minutos). La aplicación poscosecha de una suspensión de conidios de *T. harzianum* (1x10⁶ UFC/ml) en combinación con un previo tratamiento térmico presentó un 93 % de control de la pudrición de la fruta, comparable con un 95 % del tratamiento con fungicida. Además, la calidad de la fruta mejoró notablemente cuando se sumergió en agua caliente.

Alvindia (2013) evaluó la eficacia *in vitro* e *in vivo* de *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 individualmente y en combinación con carbonato de sodio (CS), bicarbonato de sodio (BCS) e hipoclorito de sodio (HS) contra cuatro patógenos asociados a pudriciones poscosecha del banano. En condiciones de laboratorio, DGA14 mostró una inhibición individual del 70 % contra los patógenos y del 83 % cuando fue aplicado junto con BCS, con la cual presentó total compatibilidad al 1 % (p/v). Por otro lado, las aplicaciones poscosecha mostraron que bananos sumergidos durante 30 minutos en una suspensión de la cepa DGA14 + BCS redujo la pudrición de la corona en un 93 % después de 14 días de almacenamiento a 22-24 °C; indicando que los resultados obtenidos con este tratamiento fueron comparables con el tratamiento químico.

² Guzmán, M. 29 de setiembre del 2021. Comunicación personal. La Rita, Costa Rica, CORBANA S.A.

1.5. CONCLUSIONES

Con base en la revisión de literatura se concluye que:

1. Los hongos *Colletotrichum musae* y *Fusarium* spp. son considerados los agentes causales de las principales enfermedades poscosecha en banano y su incidencia varía de acuerdo con la ubicación geográfica y época del año.
2. La pudrición de la corona y la antracnosis son las enfermedades poscosecha más importantes y extendidas en los países productores y consumidores de banano.
3. La aplicación de mezclas de fungicidas químicos sintéticos y alumbre continúa siendo el principal método de control de las enfermedades poscosecha en banano.
4. Existen prácticas culturales que pueden disminuir los niveles de inóculo de los patógenos en campo y planta empacadora, aspecto que puede ser considerado en el manejo integrado del patosistema poscosecha de banano para mejorar el desempeño de los controladores biológicos.
5. Las condiciones de almacenamiento controladas y un sitio de infección limitado podrían convertir al combate biológico de enfermedades poscosecha en banano en una estrategia de manejo con potencial, que debe ser estudiada a profundidad con el objetivo de incrementar la eficacia biológica e implementación a nivel comercial.
6. El uso de microorganismos de los géneros *Bacillus*, *Streptomyces* y *Trichoderma* en el combate biológico poscosecha en banano ha sido ampliamente estudiado, los resultados obtenidos confirman que estos brindan una protección parcial, sin llegar a ofrecer el nivel de control de los fungicidas químicos sintéticos.
7. Los resultados más promisorios en el combate biológico de las principales enfermedades poscosecha en banano se han obtenido con la combinación de los ACB y otras alternativas de control.

8. El control biológico debe utilizarse como una herramienta más de manejo integrado contra enfermedades poscosecha del banano, que ayude a reducir el uso y la dependencia a los fungicidas sintéticos, principalmente en periodos de baja presión de inóculo.
9. Lograr un control eficiente de las enfermedades poscosecha en banano de exportación sin el uso de fungicidas que pueda implementarse a nivel comercial, requiere de una apreciación y conocimiento detallado de factores que pueden afectar la maduración, el desarrollo fúngico y de las practicas actuales utilizadas en plantas empacadoras.

1.6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adebesin, A; Odebode, C; Ayodele, A. 2009. Control of postharvest rots of banana fruits by conidia and culture filtrates of *Trichoderma asperellum*. Journal of Plant Protection Research 49(3):302-308. DOI: <https://doi.org/10.2478/v10045-009-0049-6>.
- Agrios, G. 2004. Plant pathology. 5 ed. University of Florida. 1-922 p. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2009-0-02037-6>.
- Alvindia, D. 2013. Enhancing the bioefficacy of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 with inorganic salts for the control of banana crown rot. Crop Protection 51:1-6. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2013.03.013>.
- Alvindia, D; Kobayashi, T; Yaguchi, Y; Natsuaki, K. 2000. Symptoms and the associated bananas fungi imported of postharvest from the diseases Philippines. Jpn. J. Trop. Agr. 44(2):87-93.
- Alvindia, D; Natsuaki, K. 2009. Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot-causing pathogens. Crop Protection 28(3):236-242. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.10.011>.
- Alvindia, D; Acda, M. 2012. An integrated approach with *Trichoderma harzianum* DGA01 and hot water treatment on control of crown rot disease and retention of overall quality in banana. Biocontrol Science and Technology 22(9):1021-1033. DOI: <https://doi.org/10.1080/09670874.2013.845927>.
- Alvindia, D; Natsuaki, K. 2008. Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana fruit surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. Crop Protection 27(8):1200-1207. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.02.007>.
- Anthony, S; Abeywickrama, K; Dayananda, R; Wijeratnam, S; Arambewela, L. 2004. Fungal pathogens associated with banana fruit in Sri Lanka, and their treatment with essential oils. Mycopathologia 157(1):91-97. DOI: <https://doi.org/10.1023/B:MYCO.0000012226.95628.99>.

Arrebola, E; Jacobs, R; Korsten, L. 2010. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Journal of Applied Microbiology* 108(2):386-395. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04438.x>.

Bastiaanse, H; Lapeyre, L De; Bellaire, D; Lassois, L; Misson, C; Jijakli, MH. 2010. Integrated control of crown rot of banana with *Candida oleophila* strain O, calcium chloride and modified atmosphere packaging. *Biological Control* 53(1):100-107. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2009.10.012>.

Blakeman, J; Fokkema, N. 1982. Potential for biological control of plant diseases on the phylloplane. *Annual Review of Phytopathology* 20(1):167-190. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.py.20.090182.001123>.

van den Bosch, R; Messenger, P; Gutierrez, A. 1982. An introduction to biological control. 1 ed. California, Springer Science + Business Media. 247 p.

Bubici, G; Kaushal, M; Prigigallo, M; Cabanás, C; Mercado-Blanco, J. 2019. Biological control agents against Fusarium wilt of banana. *Frontiers in Microbiology* 10(616):1-33. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00616>.

Campbell, R. 1989. Biological control of microbial plant pathogens. 1 ed. Cambridge, Cambridge University Press. 218 p. DOI: <https://doi.org/10.5860/choice.27-4511>.

Carmona-Hernandez, S; Reyes-Pérez, J; Chiquito-Contreras, R; Rincon-Enriquez, G; Cerdan-Cabrera, C; Hernandez-Montiel, L. 2019. Biocontrol of postharvest fruit fungal diseases by bacterial antagonists: A review. *Agronomy* 9(3):1-15. DOI: <https://doi.org/10.3390/agronomy9030121>.

Carr, C; Alfaro, F; Vargas, A; Guzmán, M. 2014. Efecto de la desflora en campo y del lavado del racimo sobre la presencia de *Fusarium* spp. y *Colletotrichum* spp. y la cantidad de otros hongos relacionados con enfermedades poscosecha del banano. *Fitosanidad* 18(2):75-80.

CORBANA. 2019. Estadísticas (en línea, sitio web). Consultado 12 nov. 2020. Disponible en <http://www.corbana.co.cr/banano-de-costa-rica/#industria>.

da Costa, A; Furtado, R; Araújo, F; Ulhoa, C. 2021. Potential of *Trichoderma piluliferum* as a biocontrol agent of *Colletotrichum musae* in banana fruits. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 34:1-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102028>.

Evangelista-Martínez, Z; Contreras-Leal, E; Corona-Pedraza, L; Gastélum-Martínez, É. 2020. Biocontrol potential of *Streptomyces* sp. CACIS-1.5CA against phytopathogenic fungi causing postharvest fruit diseases. *Egyptian Journal of Biological Pest Control* 30(117):1-10. DOI: <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00319-9>.

FAO. 2020. Crops, banana. (en línea, sitio web). Consultado 12 nov. 2020. Disponible en <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>.

Forret, M. 2008. Etude de la variation de sensibilité des bananes d ' exportation aux pourritures de couronne en fonction du stade de récolte. tTèse de doctorat, Communauté française de Belgique. 93 p.

Fu, G; Huang, S; Ye, Y; Wu, Y; Cen, Z; Lin, S. 2010. Characterization of a bacterial biocontrol strain B106 and its efficacies on controlling banana leaf spot and post-harvest anthracnose diseases. *Biological Control* 55(1):1-10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2010.05.001>.

Fu, G; Lin, S; Huang, S; Zhou, S; Wang, Q; Cen, Z. 2007. Isolation and screening of antagonistic microorganisms against pathogens of banana leaf spot diseases in Guangxi. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences* 20(3):421-424. Disponible en <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20073244000>.

González-Estrada, R; Blancas-Benítez, F; Montaña-Leyva, B; Moreno-Hernández, C; Del Carmen Romero-Islas, L; Romero-Islas, J; Avila-Peña, R; Ramos-Guerrero, A; Fonseca-Cantabrana, A; Gutierrez-Martinez, P. 2019. A review study on the postharvest decay control of fruit by *Trichoderma*. p. 1-15 DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.82784>.

Hernández-Lauzardo, A; Bautista-Baños, S; Velázquez-del Valle, M. 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en

frutos. *Revista mexicana de fitopatología* 25(1):66-74.

Heydari, A; Pessaraki, M. 2010. A review on biological control of fungal plant pathogens using microbial antagonists. *Journal of Biological Sciences* 10(4):273-290.

Infante, D; Martínez, B; González, N; Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Veg* 24(1):14-21.

Ismet, A; Rizwana, H; Al-Othman, M; Bakir, A. 2012. Studies of actinomycetes for biological control of *Colletotrichum musae* pathogen during post harvest anthracnose of banana. *African Journal of Microbiology Research* 6(17):3879-3886. DOI: <https://doi.org/10.5897/ajmr12.088>.

Janisiewicz, W; Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology* 40(24):411-441. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120401.130158>.

Johanson, A; Blazquez, B. 1992. Fungi associated with banana crown rot on field-packed fruit from the Windward Islands and assessment of their sensitivity to the fungicides thiabendazole, prochloraz and imazalil. *Crop Protection* 11(1):79-83. DOI: [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(92\)90084-I](https://doi.org/10.1016/0261-2194(92)90084-I).

Jones, D. 2018. *Handbook of Diseases of Banana, Abacá and Enset*. 1 ed. CABI (ed.). Boston, MA, s.e. 615 p.

Köhl, J; Kolnaar, R; Ravensberg, W. 2019. Mode of action of microbial biological control agents against plant diseases: Relevance beyond efficacy. *Frontiers in Plant Science* 10(845):1-19. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00845>.

Krauss, U; Johanson, A. 2000. Recent advances in the control of crown rot of banana in the Windward Islands. *Crop Protection* 19(3):151-159. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(99\)00097-6](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(99)00097-6).

Lassois, L; Haïssam, M; Chillet, M; de Lapeyre de Bellaire, L. 2010. Crown rot of bananas. *Plant Disease* 94(6):648-658.

Lassois, L; de Lapeyre de Bellaire, L. 2014. *Crown rot disease of bananas*. Elsevier.

103-130 p. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-411552-1.00003-X>.

Lastochkina, O; Seifikalhor, M; Aliniaiefard, S; Baymiev, A; Pusenkova, L; Garipova, S; Kulabuhova, D; Maksimov, I. 2019. *Bacillus* spp.: efficient biotic strategy to control postharvest diseases of fruits and vegetables. *Plants* 8(97):1-24.

Leite, I; Silva, R; Santos, J; Freitas-Lopes, R; Câmara, M; Michereff, S; Lopes, U. 2020. Analysis of *Colletotrichum musae* populations from Brazil reveals the presence of isolates with reduced sensitivity to fungicides used in postharvest and with high competitive ability. *Plant Pathology* 69(8):1529-1539. DOI: <https://doi.org/10.1111/ppa.13229>.

Leslie, J; Summerell, B. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. 1 ed. Estados Unidos, Blackwell Publishing Professional. 388 p.

Li, X; Jing, T; Zhou, D; Zhang, M; Qi, D; Zang, X; Zhao, Y; Li, K; Tang, W; Chen, Y; Qi, C; Wang, W; Xie, J. 2021. Biocontrol efficacy and possible mechanism of *Streptomyces* sp. H4 against postharvest anthracnose caused by *Colletotrichum fragariae* on strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology* 175(January):111401. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111401>.

Lopes, C; Alves, E; Rodrigues, L; Alves, T; Nascimento, F; Muniz, L; Góes-Neto, A; Fermino, A. 2019. Postharvest biocontrol of anthracnose in bananas by endophytic and soil rhizosphere bacteria associated with sisal (*Agave sisalana*) in Brazil. *Biological Control* 137(June):1-10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2019.104016>.

Lukezic, F; Kaiser, W; Martinez, M. 1967. The incidence of crown rot of boxed bananas in relation to microbial populations of the crown tissue. *Canadian Journal of Botany* 45(4):413-421. DOI: <https://doi.org/10.1139/b67-041>.

Marin, D; Sutton, T; Blankenship, S; Swallow, W. 1996. Pathogenicity of fungi associated with crown rot of bananas in Latin America on Grande Naine and disease-resistant hybrid bananas. vol.80. p. 525-528 DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-80-0525>.

Mortuza, G; Ilag, L. 1999. Potential for biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. and Maubl. in banana fruits by *Trichoderma* species. *Biological Control* 15(3):235-240. DOI: <https://doi.org/10.1006/bcon.1999.0716>.

Nelson, S. 2008. Postharvest Rots of Banana. *Plant Disease* 54:1-4.

O'Brien, P. 2017. Biological control of plant diseases. *Australasian Plant Pathology* 46(4):293-304. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13313-017-0481-4>.

Ongena, M; Henry, G; Thonart, P. 2009. The roles of cyclic lipopeptides in the biocontrol activity of *Bacillus subtilis*. In *Recent Developments in Management of Plant Diseases*. p. 59-69 DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8804-9>.

Ploetz, R; Thomas, J; Slabaugh, W. 2003. *Diseases of Banana and Plantain*. Florida, USA, CABI Publishing. p. 73-134 DOI: <https://doi.org/10.1079/9780851993904.0253>.

Proctor, R; Desjardins, A; Moretti, A. 2010. Biological and Chemical Complexity of *Fusarium proliferatum*. Springer, Dordrecht. p. 97-111 DOI: <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8932-9>.

Ramírez, M; Sáenz, M; Vargas, A. 2009. Efecto de la inmersión en agua caliente sobre la secreción de látex por la corona de gajos recién conformados de frutos de banano. *Agronomía Costarricense* 35(1):1-14. DOI: <https://doi.org/10.15517/rac.v35i1.6684>.

Rampersad, S. 2020. Pathogenomics and management of *Fusarium* diseases in plants. *Pathogens* 9(5). DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens9050340>.

Rivas, R. 2016. Actividad en laboratorio y en poscosecha de biofungicidas sobre el control de *Fusarium* spp. y *Colletotrichum musae*, agentes causales de enfermedades poscosecha en banano (*Musa* AAA; subgrupo Cavendish). Tesis de licenciatura, UCR. 65 p.

Romanazzi, G; Sanzani, S; Bi, Y; Tian, S; Gutiérrez Martínez, P; Alkan, N. 2016. Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 122:82-94. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.05.010>.

<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.08.003>.

Salazar, E; Hernández, R; Tapia, A; Gómez-Alpizar, L. 2012. Identificación molecular del hongo *Colletotrichum* spp., aislado de banano (*Musa* spp.) de altura en la zona de Turrialba y determinación de su sensibilidad a fungicidas postcosecha. *Agronomía Costarricense* 36(1):53-68.

Sánchez, M. 2018. Actividad fungicida de extractos metanólicos de hojas de *Musa* sobre hongos causantes de enfermedades poscosecha en banano. Tesis de maestría, Tecnológico de Costa Rica. 68 p.

Sangeetha, G; Usharani, S; Muthukumar, A. 2009. Biocontrol with *Trichoderma* species for the management of postharvest crown rot of banana. *Phytopathologia Mediterranea* 48(2):214-225. DOI: https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-2741.

Sharma, A; Gautam, S; Saxena, S. 2014. *Streptomyces*. *Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition* 3:560-566. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00326-8>.

Shu, C; Chen, Q; Pi, L; Zhang, D; Panhwar, Q; Zhou, E. 2017. Identification and antifungal activity analysis of two biocontrol antagonists to *Colletotrichum musae*. *Journal of Phytopathology* 165(7-8):554-561. DOI: <https://doi.org/10.1111/jph.12592>.

Slabaugh, W; Grove, M. 1982. Postharvest diseases of bananas and their control. *Plant Disease* 66(8):746-740.

Soto, M. 2014. Bananos I: conceptos básicos. 1 ed. Editorial Tecnológica de Costa Rica (ed.). Cartago, Costa Rica, s.e. 338 p.

Soto, M. 2015. Plagas y enfermedades que atacan al banano. 1 ed. Cartago, Costa Rica, Editorial Tecnológica de Costa Rica. p. 553-619.

Soto, M. 2017. Bananos III: poscosecha y comercialización. 1 ed. Cartago, Costa Rica, Editorial Tecnológica de Costa Rica. 320 p.

Souza-Pollo, A; Goes, A. 2020. Banana Pathology and Diseases. Handbook of Banana Production, Postharvest Science, Processing Technology, and Nutrition 1989:45-59. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119528265.ch3>.

Su, A; Siew, T; Mei, W; Li, C. 2010. Characterization of actinobacteria with antifungal potential against *Fusarium* crown-rot pathogen. Pest Technology 4(1):65-69.

Trueggelmann, L; Chavez, S; Escamillan, B; Rizal, F. 2017. Bio-efficacy evaluation of Serenade AS® (QST 713 dried strain of *Bacillus subtilis*) as postharvest treatment in Cavendish banana. Acta Horticulturae 1179(19):125-132. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1179.19>.

Umaña, G. 2009. Estudio de la podredumbre de corona en postcosecha de plátano de producción convencional y ecológica en la región del Caribe de Costa Rica. Tesis doctoral, Universidad Politécnica de Valencia. 354 p.

Vargas, A; Villalta, R; Guzmán, M; Rivas, R. 2017. Materiales de empaque y su relación con características poscosecha e incidencia de enfermedades en banano (*Musa* AAA cv. Grande Naine). CORBANA 37-43 (63):79-105.

Villalta, R; Sample, M; Shields, D; Guzmán, M. 2006. Evaluación de fungicidas y mezclas de fungicidas para el combate de enfermedades poscosecha del banano (*Musa* AAA). CORBANA 32(59):17-33.

Villarreal-Delgado, M; Villa-Rodríguez, E; Cira-Chávez, L; Estrada-Alvarado, I. 2018. El género *Bacillus* como agente de control biológico y sus implicaciones en la bioseguridad agrícola. Revista Mexicana de Fitopatología 36(1):95-130. DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.1706-5>.

Vinale, F; Sivasithamparam, K; Ghisalberti, EL; Marra, R; Woo, SL; Lorito, M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. Soil Biology and Biochemistry 40(1):1-10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>.

Wallbridge, A. 1981. Fungi associated with crown-rot disease of boxed bananas from the Windward islands during a two-year survey. Transactions of the British Mycological Society 77(3):567-577. DOI: <https://doi.org/10.1016/s0007>.

2. CAPÍTULO II. EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA EFICACIA BIOLÓGICA, BIOCOMPATIBILIDAD Y FACTORES QUE AFECTAN LA EFICACIA DE MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS EN EL COMBATE DE ENFERMEDADES POSCOSECHA DEL BANANO

2.1. RESUMEN

Las pruebas *in vitro* son ampliamente utilizadas para la selección de agentes de combate biológico (ACB) eficaces contra los patógenos que afectan la etapa poscosecha del banano. Los objetivos del presente capítulo fueron: (i) evaluar la eficacia biológica *in vitro* de ocho posibles ACB contra los hongos *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum*, (ii) determinar la biocompatibilidad *in vitro* entre los potenciales ACB, y (iii) comprobar el efecto *in vitro* de los factores considerados clave en el manejo comercial poscosecha del banano: alumbre, látex y temperatura (14 °C) sobre el desempeño de los ACB. El estudio se realizó en cuatro etapas, en la primera se evaluó la eficacia biológica *in vitro* de los ACB contra ambos patógenos mediante cuatro pruebas de antagonismo, donde se encontró que los ACB ejercieron diferentes mecanismos de acción y que su antagonismo *in vitro* incrementó cuando se fermentaron en tres medios de cultivo líquidos. Además, algunos extractos crudos producidos por bacterias (*B. subtilis* y *Streptomyces* spp.) inhibieron por completo la germinación de los conidios de *C. musae* y *F. proliferatum*. En la segunda etapa, se determinó cualitativamente la biocompatibilidad entre los ACB evaluados, encontrando que microorganismos del género *Bacillus* y *Streptomyces* son capaces de crecer en conjunto entre ellos, mientras que los hongos antagonistas no presentaron esta capacidad. En la tercera etapa se evaluó el efecto del alumbre, látex y temperatura (14 °C) sobre el crecimiento y viabilidad de los microorganismos, encontrando que al menos uno de ellos afectó a algún ACB. Como resultado, se seleccionaron dos aislamientos de *Bacillus subtilis* y uno de *Trichoderma* sp. como los más promisorios para ejercer un control contra *C. musae* y *F. proliferatum* en las pruebas *in vivo* poscosecha.

Palabras clave: antagonismo, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Trichoderma*, biocompatibilidad, alumbre, látex, temperatura.

2.2. ABSTRACT

In vitro tests are widely used for the selection of effective biological combat agents (BCAs) against pathogens that affect the post-harvest stage of bananas. The objectives of this chapter are: (i) evaluate the *in vitro* biological efficacy of eight possible BCAs against *Colletotrichum musae* and *Fusarium proliferatum*, (ii) determine the *in vitro* biocompatibility between the potential BCAs, and (iii) verify the *in vitro* effect of the postharvest factors alum, latex, and temperature (14 °C) on the performance of the BCAs. The study was carried out in four stages. In the first of them, the *in vitro* biological efficacy of the BCAs against both pathogens were evaluated by four antagonism tests, founding that the microorganisms exerted different mechanisms of action and their *in vitro* antagonism increased when they were fermented in three liquid media culture. In addition, some crude extracts produced by bacteria (*B. subtilis* and *Streptomyces*) controlled the conidia germination of *C. musae* and *F. proliferatum*. In the second stage, the biocompatibility between BCAs was qualitatively determined, finding that microorganisms of the genus *Bacillus* and *Streptomyces* can grow together with other microorganisms, while the antagonistic fungi did not present this capacity. In the third stage, the effect of alum, latex, and temperature (14 °C) on the growth and viability of the microorganisms was evaluated, getting that at least one factor affected the possible BCAs. As a result, two isolates of *Bacillus subtilis* and one of *Trichoderma* sp. as the most promising to exercise control against *C. musae* and *F. proliferatum* in postharvest *in vivo* experiments.

Key words: antagonism, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Trichoderma*, biocompatibility, alum, latex, temperature.

2.3. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades poscosecha en el cultivo del banano causadas por fitopatógenos son capaces de causar pérdidas hasta de un 50 % de la fruta exportada en países que se encuentran en vías de desarrollo (Salunkhe y Desai 1984, citado por Singh y Sharma 2018). Estas pérdidas se controlan principalmente a través de fungicidas sintéticos y, en menor grado, mediante prácticas de manejo poscosecha que reducen la cantidad de inóculo y el crecimiento de los patógenos. La dependencia al combate químico ha causado el desarrollo de medidas alternativas de control, como lo es el combate biológico, utilizando microorganismos benéficos en etapa de poscosecha (Janisiewicz y Korsten 2002, Jones 2018).

La búsqueda de microorganismos antagonistas para el combate biológico (ACB) de enfermedades poscosecha está orientada al aislamiento de antagonistas provenientes del fructo-plano (superficie del fruto) y de otras fuentes, que pueden o no estar relacionadas al fruto (Janisiewicz y Korsten 2002). Una vez obtenidos los microorganismos, seleccionar los mejores de estos es clave. Las evaluaciones *in vitro* permiten determinar la bioeficacia de los potenciales ACB contra un amplio espectro de fitopatógenos, mecanismos de acción, tolerancia al estrés abiótico provocado por condiciones de almacenamiento, compatibilidad con prácticas poscosecha e interacción con otros microorganismos benéficos (Janisiewicz y Korsten 2002, Villamil *et al.* 2012). De esta manera es posible orientar la selección de potenciales ACB para ensayos *in vivo* poscosecha, proceso que también descarta un considerable número de aislamientos por la inconsistencia de los resultados entre pruebas *in vitro* e *in vivo* (Hoyos-carvajal *et al.* 2008).

La aplicación de más de un ACB simultáneamente es una de las posibilidades para mejorar la eficiencia del combate biológico. La acción de un consorcio de microorganismos podrían inhibir más eficientemente las enfermedades a través de diferentes mecanismos de acción, permitiendo tener un efecto de biocontrol sinérgico y ampliar el espectro de actividad y durabilidad del control (Guetsky *et al.* 2001, 2002, Sangeetha *et al.* 2009, Stockwell *et al.* 2011). Sin embargo, debido a la competencia por nichos espaciales, nutricionales y/o al antagonismo mutuo entre

ACB, puede ser que algunos microorganismos sean incapaces de crecer de forma independiente en condiciones culturales comunes, razón por la cual, realizar estudios de coexistencia *in vitro* se vuelve importante antes de un eventual uso en poscosecha (Janisiewicz y Korsten 2002, Marian y Shimizu 2019).

Por otro lado, dos de las características necesarias para un potencial ACB poscosecha son: que sea compatible con las prácticas utilizadas en el empaque de la fruta y tenga la capacidad de crecer en las condiciones ambientales generadas durante el almacenamiento comercial (Wisniewski y Wilson 1992). El sulfato de aluminio y amonio (alumbre) utilizado en la corona, el látex exudado por el fruto, la temperatura comercial de almacenamiento (14 °C) y las atmósferas modificadas son algunos de los factores poscosecha actuales del banano a los que un antagonista debe tener la capacidad de adaptarse. Ante este panorama, en este capítulo se plantearon los siguientes objetivos: (i) evaluar la eficacia biológica *in vitro* de ocho posibles ACB contra los hongos *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum*, (ii) determinar la biocompatibilidad *in vitro* entre los ocho potenciales ACB, (iii) comprobar el efecto *in vitro* de los factores considerados clave en el manejo comercial poscosecha del banano: alumbre, látex y temperatura (14 °C) sobre el desempeño de los ACB.

2.4. MATERIALES Y METODOS

2.4.1. Localización y periodo de estudio

La investigación se llevó a cabo en el Laboratorio de Control Biológico y Biología Molecular de la Dirección de Investigaciones de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA S.A.), ubicado en La Rita, cantón de Pococí, provincia de Limón, Costa Rica. El periodo experimental se ubicó entre los meses de febrero a julio del 2021.

2.4.2. Colección de microorganismos

Con el fin de preservar las fuentes microbianas, garantizar su disponibilidad durante esta investigación, mantener la pureza, viabilidad, estabilidad genética y evitar la manipulación excesiva de las colecciones ya establecidas por CORBANA, se realizó una colección de microorganismos conservados a ultra baja temperatura (-80 °C).

2.4.2.1. Microorganismos seleccionados

Se utilizaron ocho aislamientos como potenciales agentes de control biológico (ACB) y dos patógenos poscosecha (Cuadro 1). Los biocontroladores fueron seleccionados de la colección crioconservada de antagonistas del Laboratorio de Control Biológico y los fitopatógenos del Laboratorio de Fitopatología de CORBANA S.A.

Cuadro 1. Microorganismos seleccionados y su origen para las evaluaciones *in vitro*.

Microorganismo	Código	Origen
Bacterias	COR-PS-83	Suelo de finca bananera
	CRB-15	Fructo-plano de piña
Actinomicetos	COR-AQ-112	Suelo de finca bananera
	COR-AQ-113	Suelo de finca bananera
	COR-AQ-115	Suelo de finca bananera
	COR-ACT-123	Suelo de La Rita
Hongos controladores	COR-HQ-35	Rizosfera de finca bananera
	LVQ-02	Rastrojos de hojas de banano con lesiones de Sigatoka Negra
Hongos patógenos	<i>Colletotrichum musae</i> .	Lesión en fruto de banano
	<i>Fusarium proliferatum</i> .	Lesión en corona de banano

2.4.2.2. Reactivación de microorganismos

Con una aguja de disección estéril se tomó un abalorio del crio vial de cada microorganismo conservado a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se sembró por duplicado mediante la técnica de desgaste. Las bacterias fueron sembradas en agar nutritivo (AN), mientras que los hongos y actinomicetos en agar papa dextrosa (PDA). Los cultivos se incubaron en oscuridad a $27 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$ por un periodo de 24 horas para bacterias, 96 horas para actinomicetos y 8 días para los hongos.

2.4.2.3. Preparación de cultivos puros

Una vez que se cumplió el tiempo de incubación para cada microorganismo, con un asa bacteriológica se tomó una única colonia y mediante la técnica de extensión se subcultivó por triplicado en medio de cultivo AN para bacterias y PDA para los actinomicetos. Con los hongos fue necesario realizar una dilución seriada en factor 1:1000. Para ello se realizó una suspensión madre tomando un disco de 5 mm de diámetro del cultivo reactivado, se depositó en un tubo con 10 ml de agua destilada estéril y se agitó por 30 segundos en un vortex Thermo Scientific® (Maxi Mix II). Seguidamente, con una micropipeta y puntas estériles se tomó 1 ml de la suspensión madre, se transfirió a otro tubo con 9 ml de agua destilada estéril y se

agitó durante 30 segundos. Este paso se repitió tres veces para llegar al factor de dilución requerido (10^{-3}).

En placas Petri con medio de cultivo PDA se sembró por duplicado 100 μ l del factor de dilución 1×10^{-3} , se distribuyó en la superficie con un asa de Digrafsky y se incubaron por 15 horas en oscuridad a 27 ± 1 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, en un microscopio invertido Olympus® (CKX53), se localizaron tres conidios lo suficientemente separados para ser aislados con un sacabocados de 2 mm de diámetro, y finalmente, transferirlos individualmente a una nueva placa Petri con PDA. Los cultivos puros fueron sellados e incubados nuevamente a 27 ± 1 °C por un periodo de 48 horas para bacterias, 96 horas para actinomicetos y 8 días para los hongos.

2.4.2.4. Crioconservación de microorganismos

Cuando los cultivos alcanzaron la edad requerida para cada microorganismo se realizó la crioconservación microbiana como respaldo. Se utilizó un CRYOBANK™, el cual es un sistema diseñado para almacenar en forma congelada muestras microbianas con rápida y eficiente recuperación, ya que contiene una suspensión preservante compuesta por triptona, caldo de soya suplementado con glicerol y sucrosa. Con un asa espátula se tomó una muestra del cultivo puro de cada microorganismo y se mezcló con la suspensión preservante que contiene el tubo de CRYOBANK™; a las bacterias se les retiró la solución preservante. Cada aislamiento fue debidamente rotulado y conservado, por triplicado, a -80 °C en un congelador ThermoFisher™ (Figura 6).

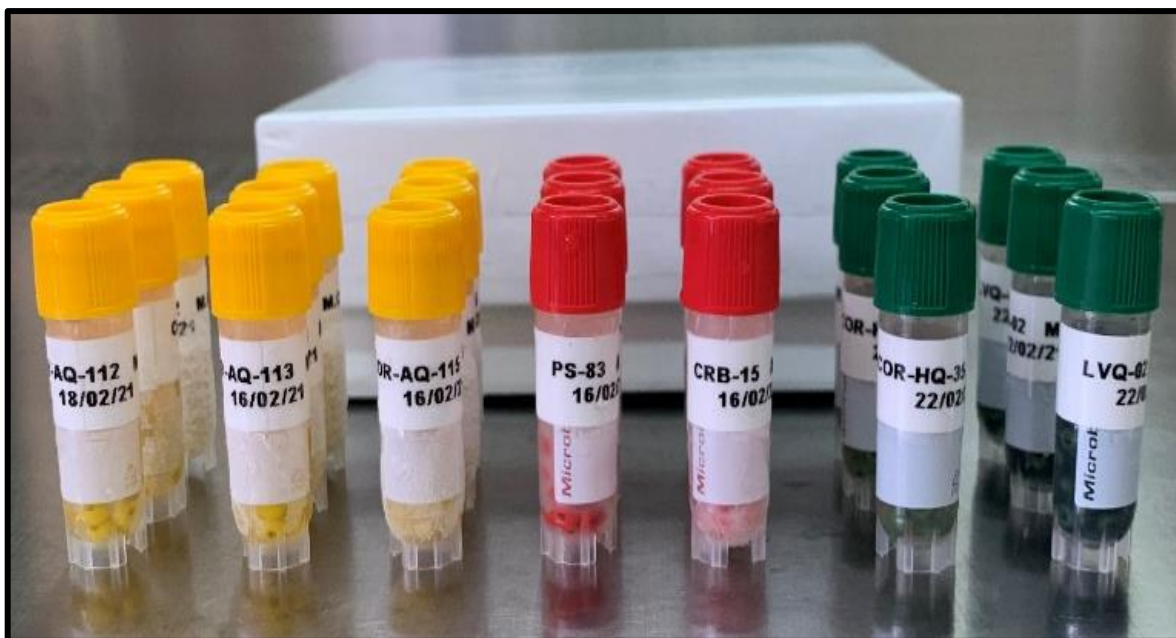


Figura 6. Colección de aislamientos y patógenos crioconservada por medio del método CRYOBANK™.

2.4.3. Cuantificación de microorganismos mediante espectrofotometría

Se realizaron curvas de absorbancia con el objetivo de ser utilizadas en las pruebas *in vitro* con suspensiones microbianas a una concentración (UFC/ml) conocida. Este procedimiento determina la absorbancia mediante un espectrofotómetro, en el cual un haz de luz atraviesa una cubeta con la suspensión microbiana y la relaciona con un método de medida de biomasa, como lo es un conteo de unidades formadoras de colonia en placa de Petri. La relación absorbancia-UFC está fundamentada en la Ley de Lambert-Beer, donde se expone que “la absorbancia de una muestra es directamente proporcional a la concentración de la especie absorbente” (Harris 2003).

2.4.3.1. Preparación de suspensiones microbianas y medición de absorbancias

Para el primer paso se tomó una muestra de la colección de cultivos crio preservados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego se prepararon suspensiones microbianas a partir de cultivos puros, para ello en un tubo de ensayo con 10 ml de agua destilada estéril más Tween® 20 al 0,25 % se agregó una muestra de cada microorganismo y se

agitó por 1 minuto en un vortex Thermo Scientific® (Maxi Mix II), seguidamente, con ayuda de una micropipeta y puntas estériles se realizaron diluciones seriadas hasta alcanzar un factor de dilución de 1×10^{-7} (bacterias y actinomicetos) y 1×10^{-9} (hongos). Por último, empleando un espectrofotómetro Shimadzu® (UV-1800) a una longitud de onda de 550 nm, se midió la absorbancia de cada una de las diluciones realizadas para cada microorganismo. Cabe destacar que toda suspensión microbiana necesaria para esta investigación fue preparada siguiendo esta metodología.

2.4.3.2. Conteo de unidades formadoras de colonia (UFC)

Para determinar el número de células bacterianas capaces de generar una colonia, se sembró por triplicado 100 μ l de los factores de dilución 1×10^{-3} , 1×10^{-5} y 1×10^{-7} de cada microorganismo en medio de cultivo AN para bacterias y PDA para actinomicetos. Los cultivos se colocaron en una incubadora a 27 ± 1 °C de forma invertida y en oscuridad por un periodo de 24 horas para bacterias y 48 horas para actinomicetos, luego la placa se examinó y se cuantificaron las diluciones que presentaron entre 30 y 300 UFC/placa. Los propágulos de los hongos fueron contabilizados mediante cámara de Neubauer, por lo que no fue necesario realizar cultivos.

2.4.3.3. Análisis estadístico

Se utilizó el programa informático Microsoft Excel® con el cual se desarrollaron gráficos de dispersión para determinar la relación entre las medidas de absorbancia y el conteo de unidades formadoras de colonia y obtener una ecuación lineal y su coeficiente de regresión para predecir las UFC/ml.

2.4.4. Identificación de microorganismos

2.4.4.1. Identificación molecular

Se entregó un cultivo puro de cada ACB en placa de Petri al Laboratorio de Biología Molecular de CORBANA S.A. A cada aislamiento se le realizó una extracción de ADN con fenol cloroformo siguiendo la metodología descrita por Brandfass y Karlovsky (2008) modificada por CORBANA. Una vez realizada la extracción, la

concentración y pureza del ADN se estimó mediante el espectrofotómetro NanoDrop® 2000c (Thermo Scientific). Posteriormente, se realizó la amplificación de los genes 16S ARN-ribosomal y las regiones ITS (espaciador interno del transcripto) 1 y 4 para las bacterias y hongos, respectivamente, mediante la técnica de PCR punto final en un termociclador GeneAmp® 9700 (Thermo Scientific). Los productos amplificados se separaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1%, teñido con Gel Red™ en TBE 1X. Finalmente, los fragmentos amplificados fueron visualizados y fotografiados en un transiluminador de luz ultravioleta UVIIDOC HD5 (UVITEC, Cambridge).

Una vez listos los productos de PCR, se enviaron a secuenciar con la empresa Macrogen Inc. (Corea del Sur). La información generada fue proporcionada en forma de electroferogramas que se visualizaron y editaron con el programa informático Bioedit 7,1. Finalmente, las secuencias fueron identificadas utilizando como referencia las secuencias depositadas en la base de datos NCBI.

2.4.4.1. Prueba Analytical Profile Index (API®)

Se realizaron pruebas API® (BioMérieux) con el fin de utilizar los resultados como complemento a la identificación molecular. Estas pruebas son un sistema estandarizado compuesto por ensayos bioquímicos destinados al estudio del metabolismo de los hidratos de carbono en los microorganismos, para obtener un resultado rápido y confiable de la identidad de ciertos microorganismos. Esta prueba fue ejecutada a los aislamientos PS-83 y CRB-15, a cuáles se les realizó la prueba 50 CH en conjunto con 20 E para la identificación del género *Bacillus*, sus especies y microorganismos próximos.

Para ambas pruebas API®, se inició agregando 5 ml de agua destilada estéril a cada uno de los pozos de las cámaras de incubación con ayuda de una micropipeta y puntas estériles. Posteriormente, se preparó el inóculo a partir de cultivos puros de PS-83 y CRB-15 de los cuales se tomaron tres asadas de cada aislamiento y se agregaron al medio de inoculación del respectivo kit de identificación, luego, se homogenizó la suspensión bacteriana mediante pipeteo y se inoculó cada galería con cada microorganismo, inclinando la cámara de incubación en un ángulo de 45

° para evitar la formación de burbujas; todo esto siguiendo las instrucciones del fabricante para cada prueba.

Las galerías previamente inoculadas se colocaron sobre la cámara húmeda y se cerraron para ser incubadas en oscuridad a 30 °C. La lectura de los resultados se realizó mediante una guía de interpretación y con tiempos de incubación definidos. La prueba API® 50 CH se analizó a las 24 y 48 horas, mientras que API® 20 E se verificó únicamente a las 24 horas. En la lectura de esta última prueba fue necesario utilizar reactivos para tres ensayos bioquímicos y así obtener su resultado. Finalmente, se interpretó cada ensayo como positivo (+), negativo (-) y se anotaron en la hoja de resultados, para luego digitarlos en el software Apiweb™ y obtener el taxón significativo de cada aislamiento.

2.4.5. Etapa I. Evaluación de la eficacia biológica *in vitro* de los ACB contra *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum*.

Se desarrollaron cuatro pruebas *in vitro* para evaluar la eficacia biológica de los aislamientos seleccionados contra *C. musae* y *F. proliferatum*. La primera prueba consistió en evaluar los ACB en crecimiento activo contra los patógenos poscosecha mediante la técnica de cultivo dual. En la segunda y tercera prueba, el antagonismo de los aislamientos contra los patógenos fue comprobado por medio del cultivo dual con biofermentos y extractos crudos. Como cuarta prueba, se realizó la evaluación del efecto de los extractos crudos sobre la germinación de conidios de los hongos patógenos, donde cualquier tipo de alteración del crecimiento normal o del tubo germinativo de las células evidenciaría la existencia de metabolitos secundarios con algún efecto inhibitorio.

2.4.5.1. Prueba de antagonismo mediante cultivo dual con ACB en crecimiento activo

a. Material y diseño experimental

Para el material experimental se prepararon cultivos puros en crecimiento activo de los ACB y patógenos. Se utilizó un diseño completamente al azar conformado por

nueve tratamientos, incluido un testigo y cinco repeticiones por tratamiento (Cuadro 2). Como unidad experimental se emplearon placas de Petri de 90 mm de diámetro.

Cuadro 2. Tratamientos evaluados contra *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum* en prueba de antagonismo *in vitro* mediante enfrentamiento en cultivo dual con ACB en crecimiento activo.

Tratamiento	Descripción	Concentración (UFC/ml)
1	PS-83	1 x 10 ⁶
2	CRB-15	1 x 10 ⁶
3	AQ-112	N/A
4	AQ-113	N/A
5	AQ-115	N/A
6	ACT-123	N/A
7	LVQ-02	N/A
8	HQ-35	N/A
9	Testigo absoluto	N/A

b. Metodología para cultivo dual con ACB en crecimiento activo

En el extremo de una placa Petri con aproximadamente 20 ml de medio de cultivo PDA, se colocó un disco de PDA de 5 mm de diámetro con micelio del patógeno (*C. musae* o *F. proliferatum*) y en el extremo opuesto, a 4 cm entre ellos, otro disco de 5 mm de diámetro con el ACB en crecimiento activo. Para los aislamientos PS-83 y CRB-15, se utilizó un disco de papel filtro estéril de 5 mm de diámetro impregnado con una suspensión bacteriana a una concentración de 1x10⁶ UFC/ml. Además, un testigo absoluto fue inoculado con los patógenos el cual correspondió a los controles (disco de papel de 5 mm impregnado con agua estéril). Posteriormente, los cultivos fueron sellados e incubados en oscuridad a 27 ± 1 °C por un periodo de 8 días.

c. Evaluación

El antagonismo de los ACB fue comprobado calculando el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR). Con ayuda de un Vernier (Control Company® 3415) se midió el radio de crecimiento del patógeno testigo y el radio de crecimiento del patógeno en enfrentamiento. Posteriormente, se calculó el PICR empleando la siguiente fórmula: $PICR = ((R1 - R2) / R1) * 100$. Donde R1 es el radio del patógeno testigo y R2 es el radio del patógeno en enfrentamiento (Figura 7).

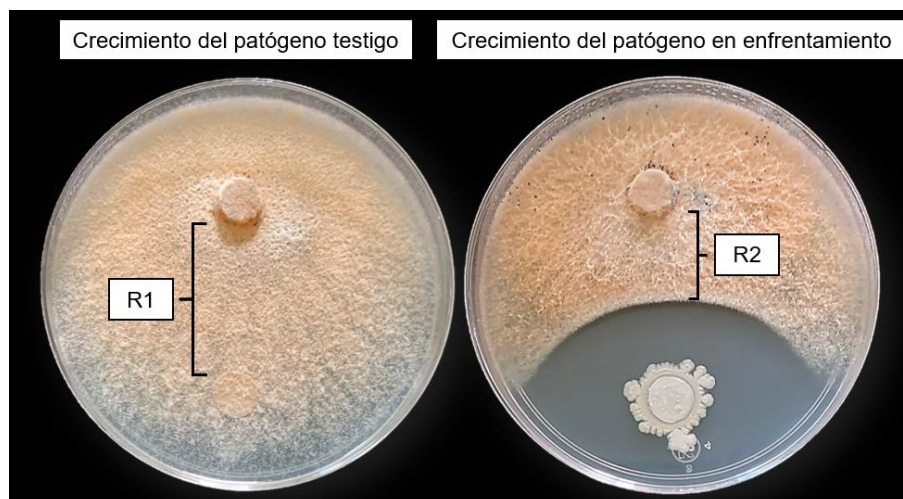


Figura 7. Ejemplo de evaluación para prueba de antagonismo contra *C. musae* y *F. proliferatum*, mediante cultivo dual con ACB en crecimiento activo. R1: sin ACB. R2: con ACB.

2.4.5.2. Prueba de antagonismo mediante cultivo dual con biofermentos y extractos crudos

a. Evaluación de la producción de enzimas líticas

En esta prueba preliminar se evaluó la capacidad de los ACB de producir enzimas líticas (glucanasas y/o quitinasas) con el fin de utilizar los resultados como base para seleccionar un tercer medio de cultivo líquido de fermentación y analizar posibles mecanismos de acción. Para ello se prepararon medios de cultivo sólido agar quitina (15 g de agar agua, 0,5 g de MgSO₄, 1 g de K₂HPO₄, 1 g de NaCl y 15 ml de quitina coloidal por litro, pH: 7) y agar glucano (15 g de agar agua, 0,5 g de MgSO₄, 1 g de K₂HPO₄, 1 g de NaCl, 1 g de NH₄NO₃ y 15 g de harina de cebada por litro, pH: 7).

En el centro de una placa Petri de 90 mm de diámetro se colocó un disco de papel filtro de 5 mm de diámetro impregnado con una suspensión bacteriana de PS-83 y CRB-15 a una concentración de 1×10^5 UFC/ml. En el caso de actinomicetos y hongos, se utilizó un disco de PDA (5 mm de diámetro) con crecimiento activo de los microorganismos y provenientes de cultivos puros. Cada aislamiento se sembró por triplicado en ambos medios de cultivo y se incubaron en oscuridad a 27 ± 1 °C por un periodo de 8 días. La evaluación para medir la capacidad de un aislamiento

de producir quitinasas y/o glucanasas se realizó visualmente, mediante la formación de un halo de hidrólisis que demostró el consumo de la fuente de carbono (harina de cebada o quitina coloidal) agregada al medio de cultivo.

b. Preparación de biofermentos

Se prepararon tres diferentes medios de cultivo líquidos por cada aislamiento, los cuales fueron: fermentación, YEGK y de actividad lítica (glucanolítico, quitinolítico o glucano-quitinolítico). Éste último medio de cultivo fue seleccionado según los resultados obtenidos en el apartado anterior (Anexo 1). Los medios de cultivo líquidos seleccionados para cada microorganismo se pueden observar en el Cuadro 3, mientras que su composición se presenta a continuación:

- **Fermentación:** 20 g de leche descremada (Soya Pac[®]), 12,5 g de extracto de levadura (Oxoid[®]), 10 g de peptona bacteriológica (Oxoid[®]), 10 g de extracto de carne (Oxoid[®]), 5 g de NaCl (Fermont[®]), 5 g de K₂HPO₄ (Fermont[®]), 1 g de MgSO₄ 7H₂O (J.T. Baker[®]) y 7 ml de jarabe de maíz (Great Value[®]) por litro, pH: 7.
- **YEGK:** 10 g de glucosa (Fermont[®]), 2 g de extracto de levadura (Oxoid[®]), 2 g de KH₂PO₄ (Fermont[®]) y 3 g de KNO₃ (Emsure[®]) por litro, pH: 7.
- **Glucanolítico:** 15 g de harina de cebada (Delisse Herbal[®]), 1 g de NaCl (Fermont[®]), 1 g de K₂HPO₄ (Fermont[®]), 1 g de NH₄NO₃ (Fermont[®]) y 0,5 g de MgSO₄ 7H₂O (J.T. Baker[®]) por litro, pH: 7.
- **Quitinolítico:** 15 ml de quitina coloidal (Sigma[®]), 1 g de NaCl (Fermont[®]), 1 g de K₂HPO₄ (Fermont[®]) y 0,5 g de MgSO₄ 7H₂O (J.T. Baker[®]) por litro, pH: 7.
- **Glucano-quitinolítico:** 7,5 g de harina de cebada (Delisse Herbal[®]), 7,5 ml de quitina coloidal (Sigma[®]), 1 g de NaCl (Fermont[®]), 1 g de K₂HPO₄ (Fermont[®]) y 0,5 g de MgSO₄ 7H₂O (J.T. Baker[®]) por litro pH: 7.

Cuadro 3. Medios de cultivo líquidos seleccionados para cada aislamiento.

Aislamiento	Medios de cultivo líquido		
	1	2	3*
PS-83	Fermentación	YEGK	Glucano
CRB-15	Fermentación	YEGK	Glucano
AQ-112	Fermentación	YEGK	Glucano – quitina
AQ-113	Fermentación	YEGK	Glucano – quitina
AQ-115	Fermentación	YEGK	Glucano – quitina
ACT-123	Fermentación	YEGK	Glucano – quitina
LVQ-02	Fermentación	YEGK	Quitina
HQ-35	Fermentación	YEGK	Glucano – quitina

*Según resultados de la evaluación de producción de enzimas líticas (Anexo 1).

Para la preparación de los biofermentos se elaboró un preinóculo a partir de cultivos puros, para obtener una concentración de células adecuada y propiciar una buena capacidad productiva de cada microorganismo. Para ello se prepararon suspensiones microbianas en un tubo de ensayo con 10 ml de agua destilada estéril más Tween® 20 al 0,25 % y de las cuales, con ayuda de una micropipeta y puntas estériles, se tomaron 500 µl (bacterias y hongos) y 1000 µl (actinomicetos) para inocular erlenmeyers con 50 ml de medio de cultivo líquido YEGK. Finalmente, se sellaron con filtros de nitrocelulosa de 0,22 µm (Sartorius®) para favorecer la oxigenación y se incubaron en un agitador orbital (Innova® 40) a 28 °C y 150 rpm por periodos de 14 horas para bacterias y 24 horas para actinomicetos y hongos.

Al día siguiente, se prepararon por duplicado erlenmeyers con 25 ml de los medios de cultivo líquidos asignado cada ACB (Cuadro 3) y se inoculó el 10 % del volumen a fermentar con el preinóculo de cada aislamiento. Los erlenmeyers se sellaron con filtros de nitrocelulosa de 0,22 µm (Sartorius®) y se colocaron en un agitador orbital (Innova® 40) a 28 °C y 150 rpm por un periodo de 10 días. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se retiraron los erlenmeyers del agitador orbital y en una cámara de flujo laminar, los biofermentos se transfirieron a tubos Falcon™ de 50 ml y se almacenaron en oscuridad a 9 °C por no más de 8 días.

c. Preparación de extractos crudos

La mitad de los biofermentos preparados según lo expuesto en el apartado anterior, se colocaron en una centrifuga Thermo Scientific® (Sorvall ST 16R) por 20 min a 5000 rpm y 28 °C y a cada sobrenadante se le aplicó la técnica de separación, que consiste en realizar un filtrado al vacío con un biorreactor (Nalgene®) y una bomba de vacío (Marathon Electric®) con el fin de obtener un extracto libre de células (Figura 8). Para esto se colocó un filtro estéril de nitrocelulosa de 0,22 µm (Sartorius®) en un biorreactor y en condiciones asépticas dentro de una cámara de flujo laminar, se realizó el filtrado. El producto filtrado se trasvasó en tubos Falcon™ de 15 ml y se guardó en oscuridad a 9 °C hasta ser utilizado, el tiempo de almacenamiento no excedió los 8 días.



Figura 8. Proceso de filtrado de los fermentos microbianos con bomba de vacío y biorreactor a través de membranas millipore 0,2 µm para la obtención de extractos crudos libres de células.

d. Material y diseño experimental

Como material experimental para la prueba de antagonismos con biofermentos se utilizaron los fermentos de cada ACB producidos en tres medios de cultivo líquidos, mientras que para la prueba de antagonismo con extractos crudos se utilizaron extractos crudos de cada ACB producidos en los tres medios de cultivo líquidos.

Además, fueron empleados cultivos monoconidiales de 8 días de edad de los hongos patógenos (*C. musae* y *F. proliferatum*). Para ambas pruebas se utilizó un diseño completamente al azar conformados por 25 tratamientos (Cuadro 4). Como unidad experimental se emplearon platos Petri de 90 mm de diámetro.

Cuadro 4. Tratamientos evaluados contra *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum* en prueba de antagonismo mediante cultivo dual con biofermentos y extractos crudos.

Tratamiento	Aislamiento	Medio de cultivo líquido
1	PS-83	Fermentación
2		YEGK
3		Glucano
4	CRB-15	Fermentación
5		YEGK
6		Glucano
7	AQ-112	Fermentación
8		YEGK
9		Glucano - quitina
10	AQ-113	Fermentación
11		YEGK
12		Glucano - quitina
13	AQ-115	Fermentación
14		YEGK
15		Glucano - quitina
16	ACT-123	Fermentación
17		YEGK
18		Glucano - quitina
19	LVQ-02	Fermentación
20		YEGK
21		Quitina
22	HQ-35	Fermentación
23		YEGK
24		Glucano - quitina
25	Testigo absoluto	-

e. Metodología del cultivo dual con biofermentos y extractos crudos

Con los biofermentos y extractos crudos preparados se procedió a realizar las pruebas *in vitro* utilizando la técnica de cultivo dual con pozo inundado en medio de cultivo PDA. En un extremo de la placa Petri con aproximadamente 20 ml de PDA

se colocó un disco de micelio de 5 mm de diámetro del hongo patógeno (*C. musae* o *F. proliferatum*) en crecimiento activo con 8 días de incubación y en el otro extremo, a 4 cm de distancia, se realizó un pozo de 5 mm de diámetro en donde se colocaron 100 μ l del biofermento o del extracto crudo (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Además, un testigo absoluto fue sembrado con únicamente un disco de micelio de 5 mm de diámetro de cada patógeno el cual correspondió a los controles. Cabe mencionar, que antes de ser selladas las placas de Petri, se dejaron en reposo 15 minutos para que el biofermento y extracto crudo fuese absorbido por el medio y no causar un derrame del líquido. Finalmente, los cultivos fueron incubados en oscuridad a 27 ± 1 °C por un periodo de 8 días.

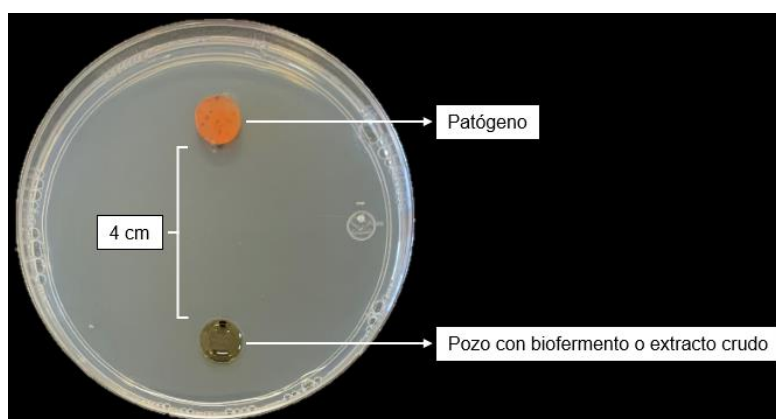


Figura 9. Ejemplo de evaluación para prueba de antagonismo contra *C. musae* y *F. proliferatum* mediante cultivo dual con biofermentos y extractos crudos.

f. Evaluación

El antagonismo de los biofermentos y extractos crudos fue comprobado calculando el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR). Con ayuda de un Vernier (Control Company® 3415) se midió el radio de crecimiento del patógeno testigo y el radio de crecimiento del patógeno en enfrentamiento. Posteriormente, se calculó el PICR empleando la siguiente fórmula: $PICR = ((R1 - R2) / R1) * 100$. Donde R1 es el radio del patógeno testigo y R2 es el radio del patógeno en enfrentamiento.

2.4.5.3. Evaluación de extractos crudos sobre la germinación de conidios de *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum*.

a. Material y diseño experimental

Como material experimental se utilizaron extractos crudos de cada ACB producidos en tres diferentes medios de cultivo líquidos: fermentación, YEGK y de actividad lítica. Se utilizó un diseño completamente al azar conformado por 49 tratamientos, los cuales consistieron en los extractos crudos de cada ACB evaluados a una concentración de 5 % y 10 % (v/v) contra ambos patógenos poscosecha (Cuadro 5). Se empleó una placa Petri de 90 mm de diámetro como unidad muestral, en la cual se inocularon cinco repeticiones por tratamiento.

Cuadro 5. Tratamientos evaluados contra *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum* en prueba de germinación de conidios con extractos crudos al 5 % y 10 % (v/v).

Tratamiento	Aislamiento	Concentración (%)	Medio de cultivo líquido
1	COR-PS-83	5	Fermentación
2			YEGK
3			Glucano
4		10	Fermentación
5			YEGK
6			Glucano
7	CRB-15	5	Fermentación
8			YEGK
9			Glucano
10		10	Fermentación
11			YEGK
12			Glucano
13	COR-AQ-112	5	Fermentación
14			YEGK
15			Glucano - quitina
16		10	Fermentación
17			YEGK
18			Glucano - quitina
19	COR-AQ-113	5	Fermentación
20			YEGK
21			Glucano - quitina
22		10	Fermentación
23			YEGK
24			Glucano - quitina

25			Fermentación
26		5	YEGK
27	COR-AQ-115		Glucano - quitina
28			Fermentación
29		10	YEGK
30			Glucano - quitina
31			Fermentación
32		5	YEGK
33	COR-ACT-123		Glucano - quitina
34			Fermentación
35		10	YEGK
36			Glucano - quitina
37			Fermentación
38		5	YEGK
39	LVQ-02		Quitina
40			Fermentación
41		10	YEGK
42			Quitina
43			Fermentación
44		5	YEGK
45	COR-HQ-35		Glucano - quitina
46			Fermentación
47		10	YEGK
48			Glucano - quitina
49	Testigo absoluto	-	-

b. Preparación del inóculo

Para el tratamiento testigo absoluto se prepararon cultivos monoconidiales de *C. musae* y *F. proliferatum*, de los cuales se realizó una suspensión de conidios de cada patógeno en agua destilada estéril más Tween® 20 al 0,25 %. Posteriormente, se realizó un conteo de conidios con la ayuda de un hematocitómetro y se ajustó la concentración a 1×10^5 conidios/ml de cada patógeno.

c. Metodología para prueba sobre la germinación de conidios de *C. musae* y *F. proliferatum* con extractos crudos

En placas Petri con 20 ml de medio de cultivo agar-agua se agregó 1 y 2 ml de extracto crudo obtenido previamente, para obtener una concentración del 5 % y 10 % (v/v), respectivamente, y se distribuyó de manera homogénea utilizando un asa de vidrio; las placas se dejaron secar en una cámara de flujo laminar para que el

medio absorbiera el volumen de extracto crudo añadido. Posteriormente, se distribuyen cinco puntos en la placa y se inocularon 25 µl del respectivo patógeno en cada uno de ellos, obteniendo de esta manera cinco repeticiones por tratamiento (Figura 10). Las placas se incubaron en oscuridad a 27 ± 1 °C por 15 horas.

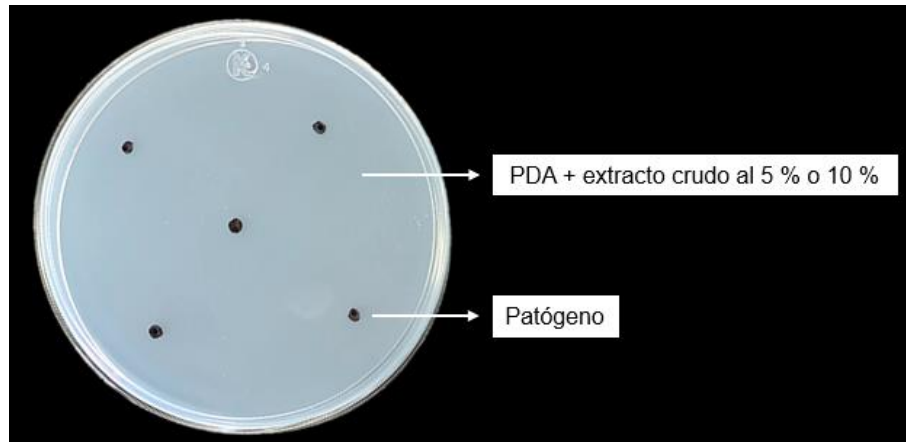


Figura 10. Ejemplo de evaluación para prueba sobre la germinación de conidios de *C. musae* y *F. proliferatum* con extractos crudos. Cada punto representa una repetición.

d. Evaluación

Transcurrido el tiempo de incubación, se procedió a observar en un microscopio (Olympus® BX51) el efecto de los diferentes tratamientos sobre la germinación de los conidios de *C. musae* y *F. proliferatum*. Se evaluaron diez conidios por repetición, para un total de 50 conidios por tratamiento, los cuales se clasificaron en tres categorías: germinación normal (GN), no germinados (NG) y tubos cortos y/o distorsionados (CD) (Figura 11). Posteriormente, se calculó el porcentaje de conidios presentes en cada una de las tres categorías mediante la fórmula: porcentaje (%) de conidios = $(\# \text{ de conidios} / 50) * 100$.

Para efectos de la investigación, la actividad inhibitoria de un determinado extracto crudo se asoció con una alta frecuencia de conidios no germinados o cortos y/o distorsionados, por lo que se estableció una cuarta categoría de referencia sumando los conidios no germinados y los cortos y/o distorsionados (NG + CD). De este modo, los extractos crudos con un porcentaje de conidios mayor o igual al 50 % en dicha categoría de referencia, se consideraron con potencial antagonista contra *C. musae* y *F. proliferatum*.

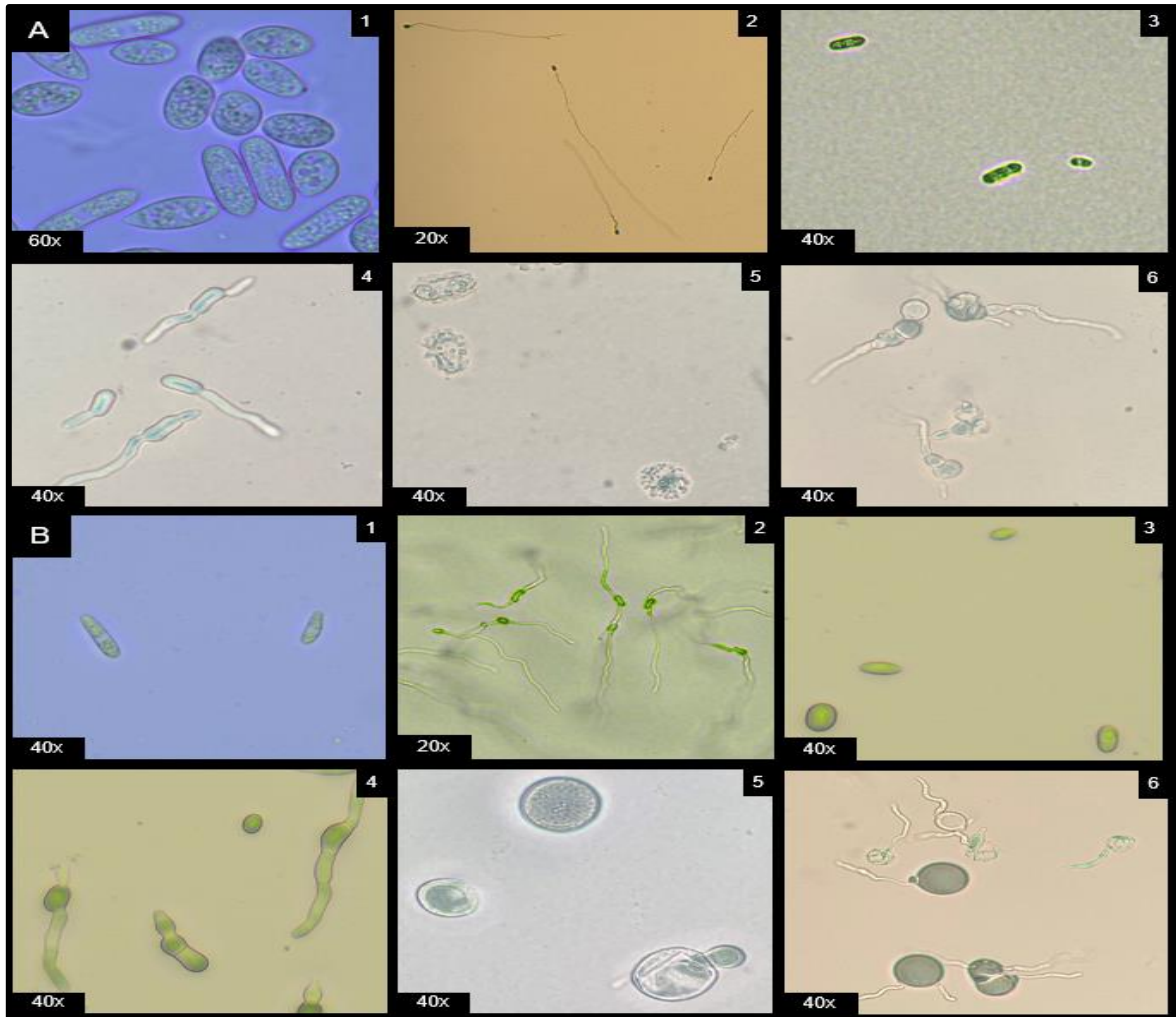


Figura 11. Diferentes tipos de respuesta en la germinación de conidios por efecto de los extractos crudos. **A.** *Colletotrichum musae*. **B.** *Fusarium proliferatum*. 1. no germinados (testigo). 2. germinados normales. 3. no germinados. 4. tubos cortos. 5. Distorsionados. 6. tubos cortos y distorsionados.

2.4.5.4. Análisis de muestras mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) y microscopía electrónica de transmisión (MET)

En este estudio se seleccionaron los tres ACB que mostraron mayor potencial antagonista según los resultados de los ensayos *in vitro*. Para describir y caracterizar su efecto sobre las hifas y conidios de *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum* mediante MEB y MET, se analizó el efecto antagonista del hongo LVQ-02 sobre las hifas de *C. musae* y *F. proliferatum* y el efecto de un extracto crudo de las bacterias PS-83 y CRB-15 sobre la morfología externa de los conidios de ambos patógenos poscosecha. El estudio del efecto de los extractos crudos bacterianos se

profundizó mediante la observación con MET de la morfología interna de los propágulos de *C. musae* y *F. proliferatum*.

a. Antagonismo del hongo LVQ-02 y efecto del extracto crudo de las bacterias PS-83 y CRB-15 sobre hifas y la morfología externa de conidios de *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum* observado mediante MEB

Se prepararon confrontaciones entre LVQ-02 y ambos patógenos poscosecha en medio de cultivo PDA reducido a un octavo de dosis (39 g/l de agua) más agar-agar, siguiendo la metodología empleada en la prueba de antagonismo mediante cultivo dual con ACB en crecimiento activo (apartado 3.4.5.1.). Cuando los cultivos duales alcanzaron 4 días de incubación, con un sacabocados de 5 mm de diámetro, se extrajeron tres discos de la zona de interacción entre ambos hongos y con un bisturí estéril se les retiró el exceso de agar. Posteriormente, se colocaron las muestras en tubos Eppendorf™ de 2 ml debidamente rotulados, se conservaron con 1 ml de solución Karnovsky y se almacenaron a 4 °C.

Por otro lado, se prepararon pruebas con los extractos crudos al 10 % (v/v) de PS-83 y CRB-15 producidos en medio de cultivo líquido de fermentación sobre la germinación de conidios de *C. musae* y *F. proliferatum*, siguiendo la metodología descrita en el apartado 3.4.5.3 e incluyendo los conidios sin tratar como testigos absolutos. Cuando los cultivos alcanzaron 15 horas de incubación, con un sacabocados de 5 mm de diámetro se extrajeron tres discos de las zonas de inoculación y se les retiró el exceso de agar con un bisturí estéril para ser colocados en tubos Eppendorf™ de 2 ml rotulados. Finalmente, se les agregó 1 ml de solución fijadora Karnovsky y se almacenaron a 4 °C.

Las muestras se transportaron en frío al Centro de Investigación en Estructuras Microscópicas (CIEMIC) de la Universidad de Costa Rica (UCR), donde se llevó a cabo el procesamiento. A cada disco de agar se le realizaron tres lavados con buffer de fosfatos al 0.1M por 20 minutos cada uno. Seguidamente, se efectuó una posfijación con tetraóxido de osmio al 1 % durante una hora, luego las muestras se lavaron tres veces con agua destilada y se deshidrataron en un gradiente de etanol

(30, 50, 70, 80, 90, 100, 100 y 100 %) por 20 minutos cada cambio. Posteriormente se aplicó un cambio de 20 minutos con etanol y acetato de amilo en una proporción 1:1 y otro de 20 minutos con solamente acetato de amilo. A continuación, las muestras fueron secadas en un secador de punto crítico (Leica EM CPD300) y se colocaron en bases de aluminio, adheridas a la misma con cinta de carbón de doble cara y se recubrieron con oro utilizando un cobertor iónico (EMS-150RS-4). Finalmente, las muestras se visualizaron en un microscopio electrónico de barrido Hitachi modelo S-3700N.

b. Efecto del extracto crudo de las bacterias PS-83 y CRB-15 sobre la morfología interna de conidios de *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum* observado mediante MET

Por recomendación del CIEMIC, para este análisis la prueba de germinación de conidios fue preparada en medio líquido. Para ello, se utilizaron microceldas de 24 pozos en donde cada pozo se llenó con 2 ml de agua destilada estéril y se le adicionó el extracto crudo bacteriano producido en medio de cultivo líquido de fermentación para obtener una concentración final del 10 % (v/v). Luego, a partir de cultivos monoconidiales de ambos patógenos, se prepararon dos suspensiones de conidios a una concentración de 1×10^5 UFC/ml y se inocularon 100 μ l en cada pozo. Cada extracto bacteriano contra cada patógeno contó con 3 repeticiones y se incluyó un testigo absoluto con conidios suspendidos en agua estéril. Las microceldas se sellaron y se incubaron en oscuridad por 15 horas a 27 °C. Transcurrido ese tiempo, el contenido de cada microcelda se retiró con una micropipeta, puntas estériles y se colocó en tubos Falcon™ de 15 ml, para ser centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y del precipitado, se tomó 1 ml para verterlo en un tubo Eppendorf™ rotulado de 2 ml con 1 ml de solución conservadora Karnovsky. Finalmente, las muestras se almacenaron a 4 °C.

El mismo día, el material experimental se transportó en frío al CIEMIC donde se llevó a cabo el procesamiento. Inicialmente, las muestras fueron lavadas tres veces con buffer de fosfatos al 0,1M durante 10 minutos, seguidamente, fueron fijadas con

tetraóxido de osmio al 1 % durante 1 hora. Luego, se les realizaron otros tres lavados con agua destilada por 10 minutos cada uno y se incluyeron en agar al 4 %. Posteriormente, se deshidrataron las muestras en un gradiente de acetona (30, 50, 70, 80,100 y 100 %) y se añadieron en resina Spurr (Sigma®) de dureza media. Finalmente, en un micrótopo se ejecutaron cortes ultrafinos de 70 nm en diferentes secciones de la muestra y se contrastaron con acetato de uranio y una solución saturada de plomo, para ser observados en un microscopio electrónico de transmisión (Hitachi modelo H7700).

2.4.6. Etapa II. Evaluación *in vitro* de la biocompatibilidad entre los ACB

En esta etapa se determinó cualitativamente la biocompatibilidad entre los ocho potenciales agentes de combate biológico con el fin de conocer las capacidades microbianas de crecimiento en conjunto.

2.4.6.1. Material experimental y tratamientos

Como material experimental se utilizaron cultivos puros en crecimiento activo de cada ACB. El ensayo estuvo conformado por un total 28 combinaciones dobles de microorganismos y ocho testigos (crecimiento individual del aislamiento), para un total de 36 tratamientos. Cada tratamiento constó de tres repeticiones y como unidad experimental se utilizaron placas de Petri de 90 mm de diámetro.

2.4.6.2. Metodologías para prueba de biocompatibilidad entre ACB

Se realizaron tres diferentes metodologías, las cuales se llevaron a cabo en placas de Petri con medio de cultivo agar nutritivo (AN) para combinaciones entre bacterias y en agar papa dextrosa (PDA) para mezclas donde estuviera involucrado un actinomiceto o un hongo.

a. Combinaciones bacteria-bacteria, bacteria-actinomiceto y actinomiceto-actinomiceto

Para las combinaciones bacteria-bacteria, bacteria-actinomiceto y actinomiceto-actinomiceto se trazó en el centro de la placa una línea horizontal y otra vertical para formar una cruz. Luego, con un asa bacteriológica estéril se tomó una asada del

aislamiento 1 en crecimiento activo para ser sembrado sobre la línea vertical y otra asada del aislamiento 2 para ser sembrado en la línea horizontal. De esta forma, los microorganismos tuvieron como punto de contacto donde se cruzaron ambas líneas (Figura 12). Los testigos para estas combinaciones, que sirvieron como punto de comparación, estuvieron conformados por cada microorganismo sembrado individualmente siguiendo el patrón en cruz.

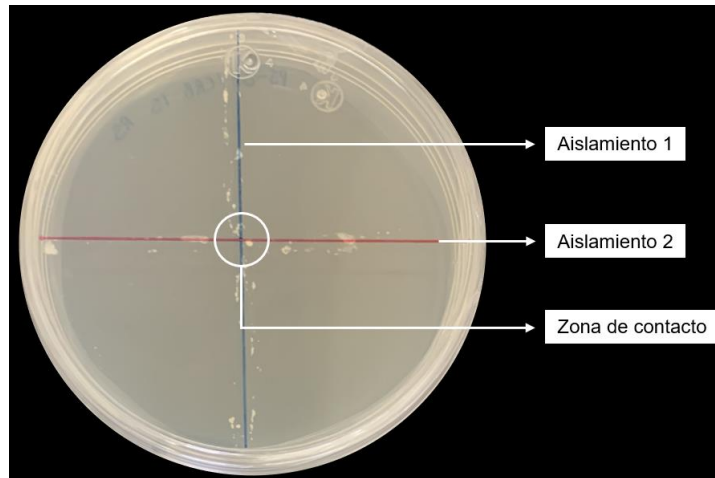


Figura 12. Ejemplo de evaluación (patrón en cruz) para prueba biocompatibilidad entre bacteria-bacteria, bacteria-actinomiceto y actinomiceto-actinomiceto.

b. Combinaciones bacteria-hongo, actinomiceto-hongo y hongo-hongo

Para combinaciones bacteria-hongo y actinomiceto-hongo se trazaron dos líneas verticales de 4 cm de largo en los extremos de la placa de Petri, a 1,5 cm del borde, sobre las cuales se inoculó una asada de la respectiva bacteria en crecimiento activo y en el centro de la placa se colocó un disco de micelio de 5 mm de diámetro de los hongos en crecimiento activo (Figura 13). La combinación hongo-hongo se evaluó mediante la técnica de cultivo dual, siguiendo la metodología detallada en el punto 3.4.5.1. Los testigos estuvieron conformados por un disco de micelio en crecimiento activo de 5 mm de diámetro colocado en el centro de la placa de Petri. Todos los tratamientos fueron incubados en oscuridad a 27 ± 1 °C por un periodo de 8 días.

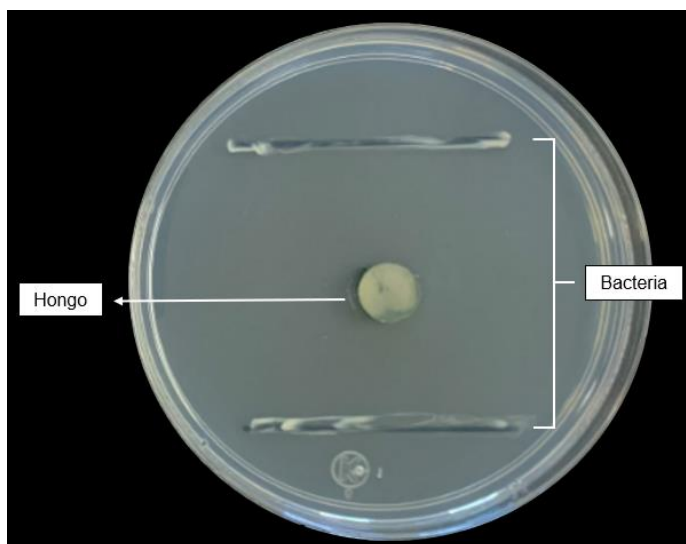


Figura 13. Ejemplo de evaluación para prueba de biocompatibilidad entre bacteria-hongo y actinomiceto-hongo.

2.4.6.3. Evaluación

La evaluación de la biocompatibilidad entre los agentes de control biológico se realizó de manera cualitativa, en donde la presencia de una zona de inhibición entre los dos microorganismos indicó la no compatibilidad entre ellos.

2.4.7. Etapa III. Evaluación *in vitro* de factores poscosecha del banano que afectan la eficacia de los ACB

En esta etapa se llevaron a cabo tres pruebas en laboratorio donde se evaluó el efecto de tres factores involucrados en la etapa poscosecha del banano sobre el crecimiento y viabilidad de los microorganismos. En la primera de ellas se realizó una prueba cuantitativa de compatibilidad entre los ACB y alumbre al 1 % para determinar el efecto sobre la viabilidad de los aislamientos. La segunda prueba evaluó de manera cualitativa el efecto inhibitorio del látex exudado por la corona de frutos de banano sobre el crecimiento de los ACB. La capacidad de crecimiento de los ACB y patógenos a 14 °C fue determinada de manera cualitativa en la tercera prueba *in vitro*.

2.4.7.1. Prueba de compatibilidad entre ACB y sulfato de aluminio y amonio (alumbre) al 1%

a. Material y diseño experimental

Como material experimental se utilizaron cultivos puros de cada ACB con los cuales se prepararon suspensiones microbianas. Se utilizó un diseño completamente al azar con 18 tratamientos, conformados por cada microorganismo sometido a dos tiempos de contacto (5 y 30 minutos) con el alumbre al 1 %. Se incluyó dos testigo absolutos por microorganismo, los cuales fueron puestos en contacto con únicamente agua destilada estéril. Cada tratamiento constó de tres repeticiones por tratamiento y como unidad experimental se utilizaron placas Petri de 90 mm de diámetro.

b. Metodología para prueba de compatibilidad entre ACB y alumbre al 1 %

Se preparó una suspensión madre de cada microorganismo en un tubo de ensayo con 10 ml de agua destilada estéril más Tween[®] 20 al 0,25 %, en el cual se agregó una muestra del cultivo puro, se agitó en un vortex Thermo Scientific[®] (Maxi Mix II) por 1 minuto y se calculó su concentración (UFC/ml) mediante las curvas de absorbancia para determinar el factor de dilución por inocular (

Anexo 2, Anexo 3 y Anexo 4). A continuación, se preparó una solución de agua destilada estéril y alumbre al 1 %, se transfirieron 9 ml de la solución a un tubo de ensayo y se agregó 1 ml de la suspensión madre del respectivo ACB. Se cronometraron los 5 y 30 minutos en que los microorganismos estuvieron en contacto con el alumbre y una vez cumplidos los tiempos, se realizaron diluciones seriadas hasta alcanzar el factor de dilución por sembrar. Los tratamientos testigo se realizaron de igual forma, pero con únicamente agua destilada estéril.

Después de cumplirse los tiempos de contacto, con ayuda de una micropipeta y puntas estériles se tomaron 100 µl y se inocularon en placas de Petri, con medio de cultivo AN (para bacterias) y PDA (para actinomicetos y hongos) y se distribuyeron de manera homogénea con un asa de vidrio. Finalmente, los cultivos se sellaron e

incubaron en oscuridad a 27 ± 1 °C por un periodo de 15 (hongos), 24 (bacterias) y 48 horas (actinomicetos).

c. Evaluación

Después del periodo de incubación, en un microscopio Olympus® (BX51) se contaron los conidios germinados y en un contador de colonias se cuantificaron las colonias que crecieron en cada repetición para determinar la concentración promedio (UFC/ml) de cada tratamiento. Con esos datos, se calculó el porcentaje de biocompatibilidad (PB) a los dos tiempos de contacto mediante la siguiente formula: $PB (\%) = ((C1 - C2) / C1) * 100 - 100$; donde C1 es la concentración testigo y C2 la concentración en contacto con el alumbre.

2.4.7.2. Evaluación de la capacidad de inhibición del látex exudado de la corona sobre el crecimiento de ACB

a. Preparación de suspensiones microbianas

Se prepararon suspensiones microbianas a partir de cultivos puros de cada ACB, a las cuales se les midió la absorbancia con un espectrofotómetro Shimadzu® (UV-1800) a una longitud de onda de 550 nm y de esta forma, ajustar la concentración a 1×10^6 UFC/ml de cada ACB mediante de curvas de absorbancia realizadas (Anexo 2, Anexo 3 y Anexo 4).

b. Extracción de látex

Racimos de banano (*Musa* AAA, subgrupo Cavendish) de 12 semanas de edad (floración-cosecha) fueron obtenidos del campo y trasladados al Laboratorio de Control Biológico, donde la fruta se desfloró y conformó en manos. Seguidamente, las manos fueron lavadas con abundante agua potable para eliminar la suciedad de campo. Luego, se desinfectaron con hipoclorito de sodio a una concentración de 1000 mg/l por 1 minuto.

Posterior a ese tiempo, se lavó la fruta con abundante agua destilada estéril, se secó el exceso de agua con toalla de papel estéril y se introdujo a una cámara de flujo laminar. Una vez las manos secas y desinfectadas, con ayuda de un bisturí estéril se conformaron gajos de aproximadamente 5 dedos, con otro bisturí estéril

se les quitó parte del tejido adyacente a la corona y se colocaron en posición invertida en beakers estériles, donde el látex fue recolectado (Figura 14). Para evitar la coagulación del látex, este se utilizó inmediatamente después de ser extraído.

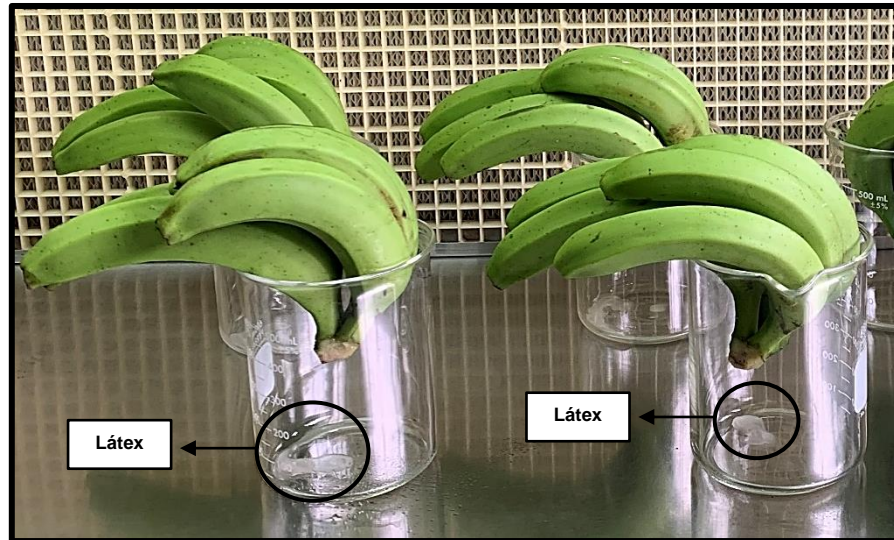


Figura 14. Proceso de extracción de látex para prueba de biocompatibilidad entre ACB y látex exudado de frutos de banano con 12 semanas de edad (floración-cosecha).

c. Metodología para evaluar capacidad antimicrobiana del látex

Con ayuda de una micropipeta y puntas estériles se tomaron 100 μ l de la suspensión microbiana de cada ACB para ser inoculados, por triplicado, en placas de Petri (90 mm de diámetro) con medio de cultivo AN (bacterias) y PDA (actinomicetos y hongos). Una vez vertida la suspensión microbiana en el medio, se distribuyó de manera homogénea con ayuda de un asa de Driglaski. Posteriormente, se impregnaron cuatro discos de papel filtro de 5 mm de diámetro con el látex extraído y se colocaron de manera equidistante en cada placa de Petri previamente inoculada. Se incluyeron testigos en los cuales se colocaron discos impregnados con agua destilada estéril. Finalmente, los cultivos fueron incubados en oscuridad a 27 ± 1 °C por un periodo de 48 horas (bacterias) y 8 días (actinomicetos y hongos).

d. Evaluación

La evaluación para determinar el efecto del látex exudado por la corona de la fruta de banano sobre el crecimiento de los ACB se realizó visualmente, mediante

la formación de un halo de inhibición, el cual indicó un efecto antimicrobiano del látex contra los microorganismos.

2.4.7.3. Evaluación de la capacidad de crecimiento de los ACB y patógenos poscosecha del banano a 14 °C

Para determinar el efecto del factor temperatura sobre los ACB, se evaluó cualitativamente el crecimiento microbiano a 27 y 14 °C. A partir de cultivo puros, se subcultivaron seis repeticiones en placas de Petri (90 mm de diámetro) por microorganismo mediante la técnica de extensión (bacterias y actinomicetos) y colocando un disco de micelio de los hongos (ACB y patógenos) en el centro del plato de cultivo. Posteriormente, se tomaron tres repeticiones y se incubaron a la temperatura óptima de crecimiento, 27 ± 1 °C, para ser utilizados como cultivos testigo; mientras que las tres repeticiones restantes fueron incubadas a 14 ± 1 °C, la temperatura de traslado y almacenamiento del banano para comercio internacional.

El período de incubación tuvo una duración de 8 días para ambos tratamientos, pero una vez que los tratamientos sometidos a 14 ± 1 °C cumplieron dicho periodo se les aumentó la temperatura a 27 ± 1 °C por 5 días, para conocer si los microorganismos se encontraban muertos o en dormancia. La evaluación fue de carácter cualitativa y consistió en una comparación visual entre el crecimiento de los microorganismos a ambas temperaturas.

2.4.8. Etapa IV. Selección de ACB con mayor potencial antagonista para pruebas *in vivo* poscosecha

La selección de los ACB para ser evaluados en las pruebas *in vivo* se realizó a partir de escalas de valor asignadas con base en 100 puntos máximos, según las diferentes pruebas *in vitro* de antagonismo, biocompatibilidad y factores poscosecha que afectan la eficacia de los microorganismos. A cada una de las pruebas de antagonismo *in vitro*: cultivo dual con ACB en crecimiento activo, con fermentos, con extractos crudos y la evaluación de los extractos crudos (5 % y 10 %) sobre la germinación de los conidios de *C. musae* y *F. proliferatum*, se les asignó un valor

de 15 puntos, divididos contra ambos patógenos y si fue el caso, entre cada una de las subpruebas realizadas con los tres medios de cultivo líquidos (fermentación, YEGK y actividad lítica), para un subtotal de 60 puntos. A las pruebas de biocompatibilidad entre ACB y alumbre, la evaluación del efecto de inhibición del látex y a la capacidad de cada microorganismo para crecer a 14 °C, se le asignó 10 puntos máximos a cada uno, para un subtotal de 40 puntos. Para la distribución de los puntos de cada prueba se diseñaron seis escalas, las cuales se detallan en el Cuadro 6. Finalmente, se realizó la sumatoria de los valores obtenidos en cada una de las pruebas y una sumatoria final de dichos valores para obtener el puntaje final por microorganismo. Se seleccionaron los tres ACB con el puntaje final más alto para ser utilizados en las evaluaciones *in vivo* poscosecha.

Cuadro 6. Escalas de distribución de puntos de pruebas in vitro para la selección de los ACB evaluados en las pruebas in vivo poscosecha.

Prueba	Escala	Puntaje	Total
Cultivo dual en crecimiento activo (ACB vs <i>C. musae</i> y <i>F. proliferatum</i>) (% de inhibición)	≥ 0 - < 25	0	15
	≥ 25 - < 50	5	
	≥ 50 - ≤ 100	7,5	
Cultivo dual con fermentos (Medios de fermentación: Fermentación, YEGK y glucano-quitinolítico) (% de inhibición)	≥ 0 - < 25	0	15
	≥ 25 - < 50	1,5	
	≥ 50 - ≤ 100	2,5	
Cultivo dual con extractos crudos (Medios de fermentación: Fermentación, YEGK y glucano-quitinolítico) (% de inhibición)	≥ 0 - < 25	0	15
	≥ 25 - < 50	1,5	
	≥ 50 - ≤ 100	2,5	
Germinación de conidios (Medios de fermentación: Fermentación, YEGK y glucano-quitinolítico, al 5 % y 10 %) (% NG + CD)*	≥ 0 - < 50	0	15
	≥ 50 - < 75	1	
	≥ 75 - ≤ 100	1,75	
Biocompatibilidad entre ACB	0	0	10
	1	5	
	> 1	10	
Biocompatibilidad con alumbre 1 % (% de biocompatibilidad)	< 50	0	10
	≥ 50	10	
Efecto antimicrobiano del látex sobre ACB	Sí	0	10
	No	10	
Crecimiento a 14 °C	Sí	10	10
	No	0	
Total			100

* Sumatoria de conidios no germinados (NG) y cortos y/o distorsionados (CD).

2.4.9. Análisis estadístico

Los datos de porcentajes de inhibición obtenidos en la prueba de antagonismo mediante cultivo dual con ACB en crecimiento activo se sometieron a un análisis de varianza y las medias obtenidas en cada tratamiento se compararon entre sí. Por otro lado, a los resultados de la prueba de antagonismo en cultivo dual con

biofermentos se les realizó un análisis de varianza y el promedio de los porcentajes de inhibición de los tres biofermentos por aislamiento se compararon entre sí, además, se realizó otra prueba de comparación múltiple con las medias obtenidas por separado en cada uno de los tres medios de cultivo líquidos por ACB.

En cuanto a la prueba de antagonismo por medio de cultivo dual con extractos crudos, se empezó por excluir los datos con porcentajes de inhibición iguales a cero y con los valores restantes, se elaboró un análisis de varianza y una comparación de medias de los datos agrupados por medio de cultivo líquido. Con respecto a la evaluación de extractos crudos sobre la germinación de conidios de dos patógenos poscosecha, los porcentajes de conidios obtenidos en la categoría de referencia (NG + CD) no presentaron variación, ya que los resultados fueron iguales o muy cercanos a 0 % o 100 %; por esta razón, se construyeron gráficos con los valores promedio de la categoría NG + CD conseguidos en cada tratamiento.

Por último, a los datos de biocompatibilidad entre los ACB y alumbre al 1 % obtenidos en los dos tiempos de contacto (5 y 10 minutos) se les realizó un análisis de varianza y las medias fueron sometidas a una comparación entre sí. Cabe mencionar que se excluyó el resultado de biocompatibilidad entre PS-83 y alumbre a los 5 minutos de contacto debido a que este fue cero. También, se elaboró una prueba de contrastes por ACB entre los porcentajes de biocompatibilidad obtenidos en los dos tiempos de contacto con el alumbre. El software utilizado para los análisis estadísticos fue R en su versión 4.0.2 y la prueba para realizar las comparaciones de medias fue la de Tuckey al 5 % de significancia con el paquete *multcom*, además, del paquete *contrast* para la prueba de contrastes realizada.

2.5. RESULTADOS

2.5.1. Identificación de microorganismos

La identificación molecular de los potenciales agentes de control biológico y los patógenos utilizados en las pruebas *in vitro* se presenta en el Cuadro 7. Las bacterias con los códigos PS-83 y CRB-15 fueron identificados con un 100 % de certeza como cepas de *Bacillus subtilis*, además, los resultados de las pruebas API® fortalecieron este resultado con un 99,2 % y 99,9 % de certeza, respectivamente (Anexo 6). Los actinomicetos con los códigos AQ-112, AQ-113, AQ-115 y ACT-123 fueron reconocidos a nivel de género como *Streptomyces* sp. con una certeza del 99 %, 100 %, 99 % y 99 %, respectivamente. Los hongos LVQ-02 y HQ-35 obtuvieron una similitud del 100 % con *Trichoderma* sp. y *Fusarium* sp., respectivamente. Los hongos patógenos fueron identificados como *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum* con un porcentaje de certeza del 100 %.

Cuadro 7. Identificación molecular de microorganismos utilizados para pruebas *in vitro*.

Código aislamiento	Organismo coincidente (NCBI)	% ID
PS-83	<i>Bacillus subtilis</i>	100
CRB-15	<i>Bacillus subtilis</i>	100
AQ-112	<i>Streptomyces</i> sp.	99
AQ-113	<i>Streptomyces</i> sp.	100
AQ-115	<i>Streptomyces</i> sp.	99
ACT-123	<i>Streptomyces</i> sp.	99
LVQ-02	<i>Trichoderma</i> sp.	100
HQ-35	<i>Fusarium</i> sp.	100
Patógeno 1	<i>Colletotrichum musae</i>	100
Patógeno 2	<i>Fusarium proliferatum</i>	100

2.5.2. Etapa I. Evaluación de la eficacia biológica *in vitro* de los ACB contra *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum*.

2.5.2.1. Prueba de antagonismo mediante cultivo dual con ACB en crecimiento activo

Los diferentes tratamientos evaluados contra los hongos patógenos *Colletotrichum musae* ($P < 0,0001$) y *Fusarium proliferatum* ($P < 0,0001$) mostraron diferencias significativas entre sí. Los porcentajes de inhibición promedio contra *C. musae* variaron desde 25,7 % hasta un 80,7 %, mientras que para *F. proliferatum* se obtuvieron porcentajes de inhibición que fueron de un 26,4 % a un 68,3 %. El aislamiento AQ-112 (*Streptomyces* sp.) presentó el efecto de control *in vitro* más bajo y LVQ-02 (*Trichoderma* sp.) el resultado más alto contra ambos patógenos asociados a las enfermedades poscosecha de los frutos de banano (Cuadro 8).

Cuadro 8. Porcentajes de inhibición promedio del crecimiento de dos patógenos asociados a enfermedades poscosecha, según agente de control biológico aplicado.

Tratamiento	% de inhibición promedio	
	<i>Colletotrichum musae</i>	<i>Fusarium proliferatum</i>
1 PS-83	41,2 b	31,7 de
2 CRB-15	41,8 b	32,4 cde
3 AQ-112	25,7 d	26,4 e
4 AQ-113	32,6 c	34,3 cd
5 AQ-115	34,5 c	38,9 bc
6 ACT-123	35,3 c	26,7 e
7 LVQ-02	80,7 a	68,3 a
8 HQ-35	41,8 b	43,4 b
SE	0,8	1,5

*Porcentajes de inhibición promedio con letras en común no difieren entre sí, según prueba Tukey ($\alpha=0,05$).

En la Figura 15 se observa el efecto antagonista de los agentes de control biológico evaluados en crecimiento activo contra *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum*. En comparación con los testigos, todos los aislamientos inhibieron el crecimiento de los hongos patógenos. En los tratamientos conformados por cepas bacterianas de *Bacillus subtilis* y aislamientos de *Streptomyces* sp. se observó un halo inhibición que limitó el crecimiento de los patógenos, mientras que los hongos

Trichoderma sp. y *Fusarium* sp. se enfrentaron a *C. musae* y *F. proliferatum* mediante un contacto más directo.

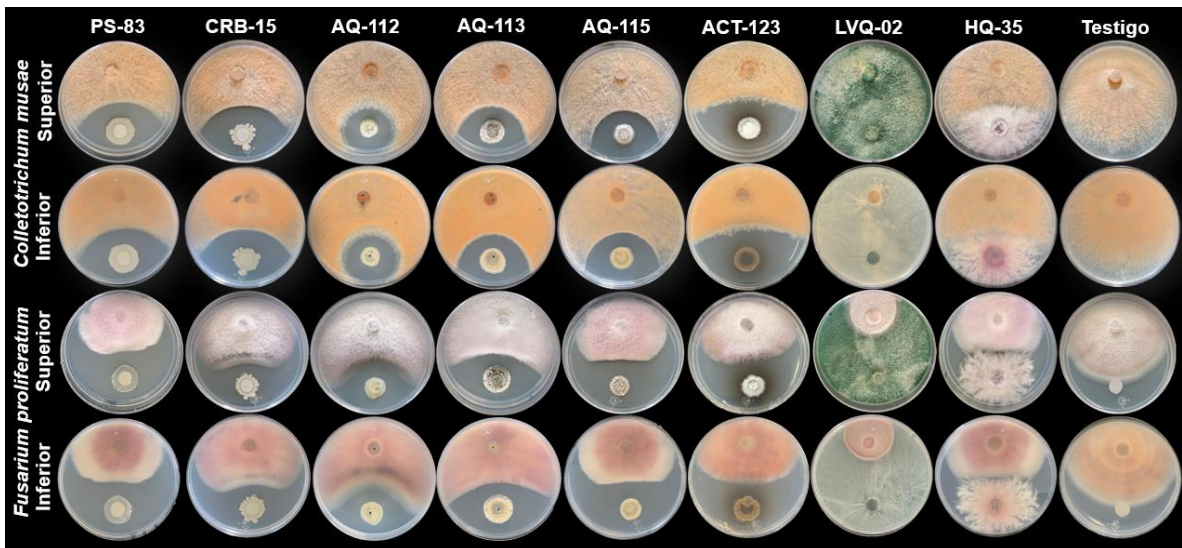


Figura 15. Efecto antagonista de ACB en crecimiento activo sobre el crecimiento de dos patógenos asociados a enfermedades poscosecha del fruto de banano.

2.5.2.2. Prueba de antagonismo mediante cultivo dual con biofermentos y extractos crudos

a. Cultivo dual con biofermentos

En el Cuadro 9 se observan los porcentajes de inhibición promediados según los tres medios de cultivo líquidos en los cuales se fermentaron los ACB. El análisis de varianza indicó diferencias significativas entre los tratamientos evaluados contra *Colletotrichum musae* ($P < 0,0001$) y *Fusarium proliferatum* ($P < 0,0001$). El aislamiento de *Trichoderma* sp. volvió a destacar con los porcentajes de inhibición más altos contra los dos patógenos poscosecha en cuestión (82,8 % y 71,1 %). Es importante mencionar que, en comparación con la prueba de cultivo dual con ACB en crecimiento activo, el porcentaje de control *in vitro* de *C. musae* aumentó desde un 2 % hasta un 13 % cuando se realizó la biofermentación, sin embargo, contra *F. proliferatum* este comportamiento fue irregular y se presentó únicamente en ciertos aislamientos.

Cuadro 9. Porcentajes de inhibición del crecimiento de *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum* promediados según tres medios de cultivo líquidos para la fermentación de los ACB.

	Tratamiento	% de inhibición promedio	
		<i>Colletotrichum musae</i>	<i>Fusarium proliferatum</i>
1	PS-83	46,3 a	30,5 a
2	CRB-15	48,8 b	33,5 ab
3	AQ-112	36,6 c	42,9 c
4	AQ-113	45,1 da	37,1 b
5	AQ-115	43,5 d	37,2 b
6	ACT-123	43,9 d	24,5 d
7	LVQ-02	82,8 e	71,1 e
8	HQ-35	43,7 a	44,9 c
	SE	0,5	1,1

* Porcentajes de inhibición promedio por patógeno con letras en común no difieren entre sí, según prueba Tukey ($\alpha=0,05$).

El análisis de resultados que permitió conocer la interacción entre el ACB y cada uno de los tres medios de cultivo líquidos para la producción de biofermentos, mostraron diferencias significativas contra *Colletotrichum musae* ($P<0,0001$) y *Fusarium proliferatum* ($P<0,0001$). No obstante, no se observó que algún medio de cultivo líquido en específico mostrará una interacción positiva mayor con respecto a los demás, es decir, que ejerciera un mejor control *in vitro* contra ambos patógenos poscosecha (Cuadro 10). Lo que demuestra que cada uno de los microorganismos, inclusive del mismo género y especie, presentaron una respuesta diferente ante los tres medios de fermentación evaluados.

Cuadro 10. Porcentajes de inhibición de biofermentos elaborados en tres medios de cultivo líquidos sobre el crecimiento de *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum*.

	Tratamiento		% de inhibición promedio	
			<i>Colletotrichum musae</i>	<i>Fusarium proliferatum</i>
1	PS-83	Fermentación	54,1 a	35,2 a
2	PS-83	YEGK	40,3 c	27,1 b
3	PS-83	Glucanolítico	44,4 b	29,0 b
4	CRB-15	Fermentación	49,8 a	39,0 a
5	CRB-15	YEGK	50,6 a	34,6 a
6	CRB-15	Glucanolítico	46,1 b	27,1 b
7	AQ-112	Fermentación	39,8 a	41,1 a
8	AQ-112	YEGK	35,8 b	43,0 a
9	AQ-112	Glucano-quitinolítico	34,3 b	44,6 a
10	AQ-113	Fermentación	43,3 b	33,6 b
11	AQ-113	YEGK	47,5 a	41,9 a
12	AQ-113	Glucano-quitinolítico	44,4 b	35,7 b
13	AQ-115	Fermentación	42,5 a	35,2 a
14	AQ-115	YEGK	44,7 a	37,8 a
15	AQ-115	Glucano-quitinolítico	43,1 a	38,6 a
16	ACT-123	Fermentación	42,0 b	27,2 a
17	ACT-123	YEGK	45,7 a	22,7 a
18	ACT-123	Glucano-quitinolítico	44,1 ab	23,5 a
19	LVQ-02	Fermentación	83,9 a	68,9 a
20	LVQ-02	YEGK	83,8 a	68,1 a
21	LVQ-02	Quitinolítico	84,6 a	70,2 a
22	HQ-35	Fermentación	43,7 a	43,8 a
23	HQ-35	YEGK	44,7 a	43,1 a
24	HQ-35	Glucano-quitinolítico	42,6 a	47,9 a
		SE	0,882	1,86

*Letras diferentes en los medios de cultivo líquidos de un mismo ACB indican diferencias significativas, según prueba Tukey ($\alpha=0,05$).

En la Figura 16 se evidencia el efecto de control *in vitro* de los biofermentos producidos en tres diferentes medios de cultivo líquidos sobre el crecimiento de *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum*. Al igual que en la prueba de antagonismo con ACB en crecimiento activo, en todos los tratamientos existió un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de micelio de los dos hongos patógenos cuando se comparó con el crecimiento testigo. Las cepas bacterianas de *Bacillus subtilis* y *Streptomyces sp.* presentaron un halo de inhibición que limitó el

crecimiento de los patógenos. En los tratamientos conformados por biofermentos de ACT-123 (*Streptomyces* sp.) contra *C. musae* se observó una mayor zona de inhibición en comparación con las demás bacterias. No obstante, los porcentajes de inhibición (Cuadro 10) no sobresalieron estadísticamente sobre los otros tratamientos. Por otro lado, LVQ-02 (*Trichoderma* sp) y HQ-35 (*Fusarium* sp.) inhibieron significativamente el crecimiento de *C. musae* y *F. proliferatum*.

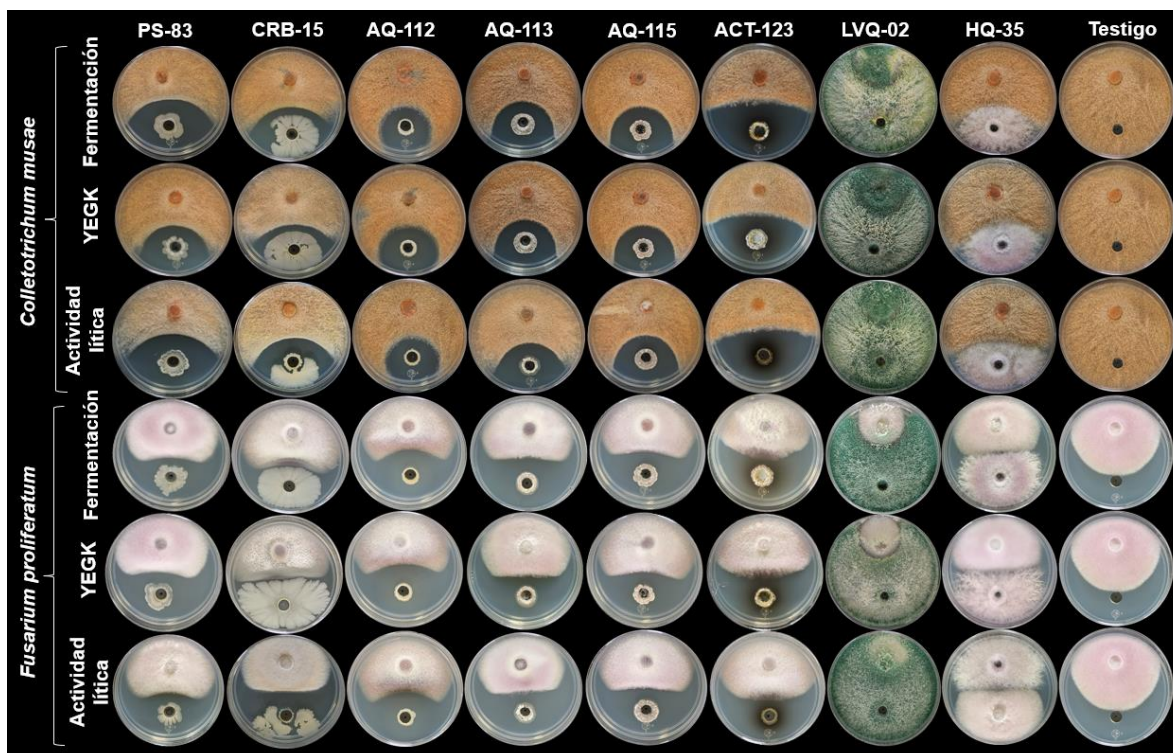


Figura 16. Efecto antagonista de biofermentos sobre el crecimiento de dos patógenos asociados a enfermedades poscosecha del fruto de banano.

b. Cultivo dual con extractos crudos

Con respecto a la prueba de cultivo dual con extractos crudos sobre el crecimiento de *Colletotrichum musae* (Figura 17A), el análisis de varianza indicó diferencias significativas entre los tratamientos producidos en dos medios de cultivo líquidos: fermentación ($P < 0,0001$) y YEGK ($P < 0,0001$). En el medio de fermentación, los aislamientos PS-83 y CRB-15 fueron los únicos que presentaron inhibición contra el patógeno (34,4 % y 43,6 %, respectivamente) y diferencias significativas entre sí. En el medio de cultivo YEGK, el aislamiento PS-83 inhibió al patógeno en un 29,5

%, lo cual difirió significativamente a los porcentajes obtenidos por los actinomicetos AQ-113 (21,7 %) y ACT-123 (20,0 %), quienes fueron estadísticamente semejantes.

En cuanto a la evaluación de los extractos crudos contra *Fusarium proliferatum* (Figura 17B), se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos producidos en los medios de cultivo líquidos de fermentación ($P < 0,0001$) y YEGK ($P < 0,0001$). En medio de fermentación, PS-83 presentó un 30,2 % de inhibición contra el patógeno y fue significativamente diferente a los aislamientos CRB-15 (11,1 %) y AQ-112 (4,6 %). Por otro lado, en medio de cultivo YEGK el aislamiento AQ-113 obtuvo el porcentaje de inhibición más bajo (0,8 %) y AQ-112 el más elevado (30,9 %); además, los tratamientos conformados por AQ-112 y CRB-15 (22,9 %) fueron estadísticamente iguales a los tratamientos conformados por PS-83 (24,6 %) y ACT-123 (30,0 %). No se presentó actividad fungicida contra los patógenos en los tratamientos producidos en medios de cultivo de actividad lítica.

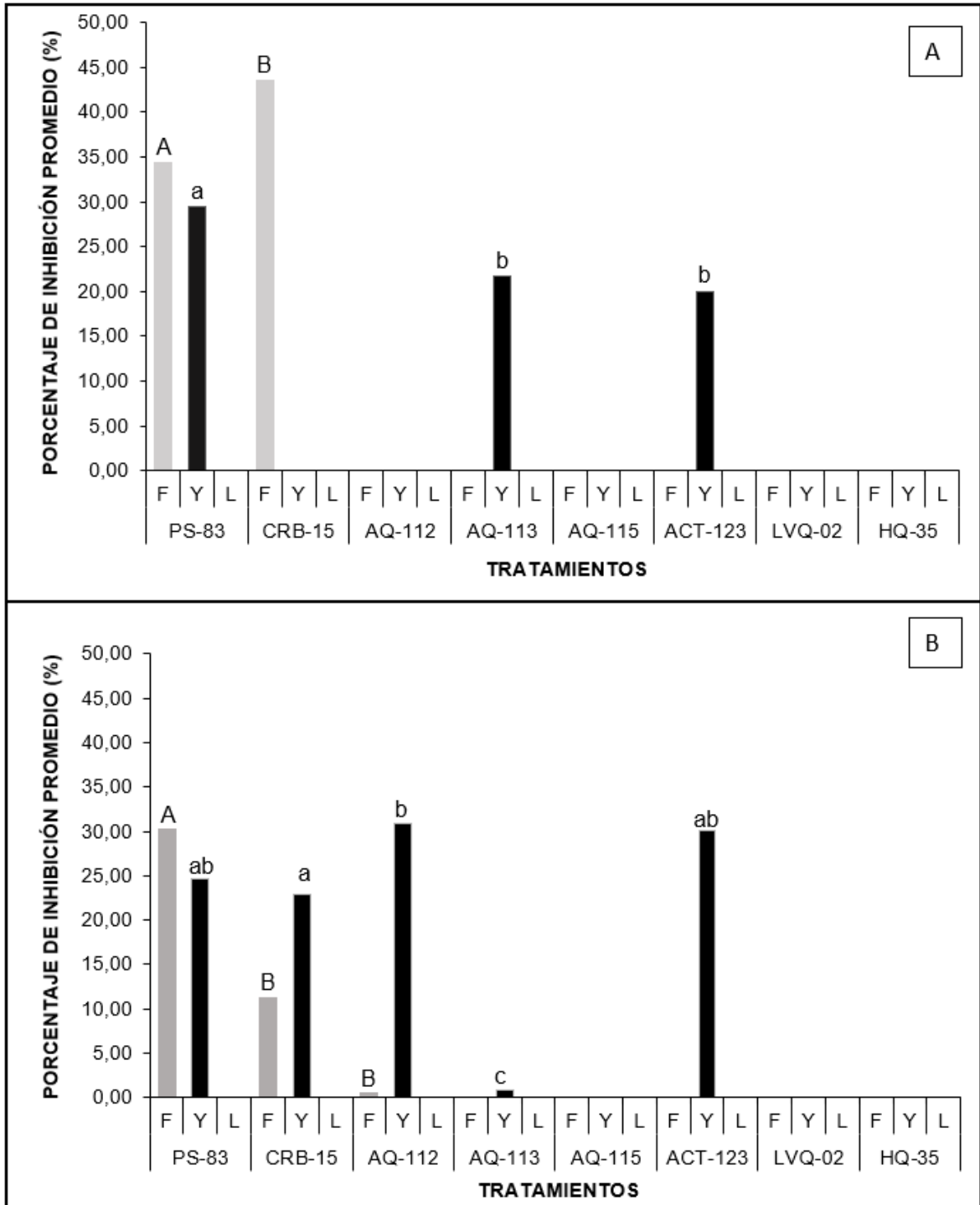


Figura 17. Porcentajes de inhibición promedio de extractos crudos sobre el crecimiento micelial de (A) *Colletotrichum musae* y (B) *Fusarium proliferatum*. Letras diferentes en un mismo medio de cultivo líquido indican diferencias significativas, según prueba Tukey ($\alpha=0,05$). Mayúsculas se comparan con mayúsculas y minúsculas con minúsculas.

En la Figura 18 se observa que los extractos crudos de PS-83 y CRB-15 en medio de cultivo de cultivo líquido de fermentación provocaron un halo de inhibición y/o un crecimiento atípico de *Colletotrichum musae*. En medio de cultivo YEGK, los aislamientos PS-83, AQ-113 y ACT-123 presentaron una inhibición débil del crecimiento de *C. musae* cerca del pozo donde se inoculó el extracto crudo. Contra *Fusarium proliferatum*, los extractos crudos de PS-83 y CRB-15 en medio de fermentación afectaron el desarrollo del patógeno, siendo CRB-15 quién generó la mayor inhibición. Los extractos crudos producidos en medio YEGK de los aislamientos PS-83, CRB-15, AQ-113 y ACT-123 causaron un crecimiento atípico del hongo, observándose de manera cualitativa, menos algodonoso. Mientras que en el efecto del extracto crudo de AQ-112 sí se observa un pequeño halo de inhibición y un crecimiento anormal de *F. proliferatum*. Sin embargo, de manera general los extractos crudos presentaron inhibiciones bajas contra ambos patógenos.

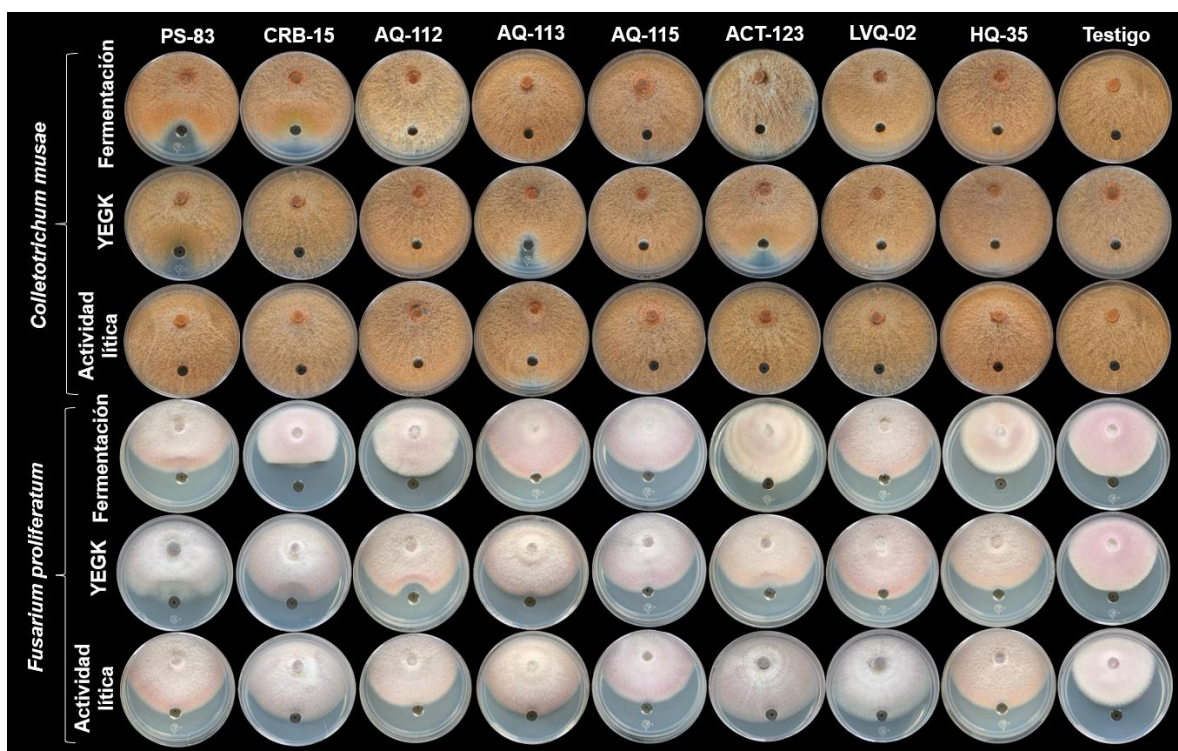


Figura 18. Efecto antagonista de extractos crudos producidos por ACB sobre el crecimiento de dos patógenos asociados a enfermedades poscosecha del fruto de banano.

2.5.2.3. Evaluación de extractos crudos sobre la germinación de conidios de *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum*

La Figura 19 presenta el porcentaje de conidios en la categoría de referencia (NG + CD) que se obtuvieron de la evaluación de extractos crudos al 10 % (v/v) contra los dos patógenos asociados a enfermedades poscosecha del banano, siendo esta la concentración en donde mayor cantidad de tratamientos ejercieron algún tipo de control. Contra conidios de *Colletotrichum musae*, los extractos crudos producidos en tres medios de cultivo líquidos presentaron de un 2 % a un 100 % de conidios afectados (Figura 19, A). Destacan los seis tratamientos que presentaron más de un 80 % de inhibición en la germinación de los propágulos, lo cuales fueron PS-83 y CRB-15 en medio de fermentación, PS-83 y ACT-123 en medio YEGK y AQ-115 y HQ-35 en medios de actividad lítica.

Por otro lado, la prueba de germinación de conidios de *Fusarium proliferatum* presentó de un 6 % a un 100 % de conidios afectados por algunos de los extractos crudos evaluados (Figura 19, B). En donde se destacan los tratamientos PS-83 y CRB-15 en medio de fermentación y PS-83 y ACT-123 en medio YEGK con un 98 % - 100 % de inhibición. Además, los tratamientos de AQ-112 en medio YEGK y AQ-115 en medio de actividad lítica presentaron porcentajes de conidios en la categoría de referencia más bajos, con un 62 % y 74 % respectivamente. Los resultados de los tratamientos evaluados al 5 % (v/v) se pueden observar en el Anexo 7.

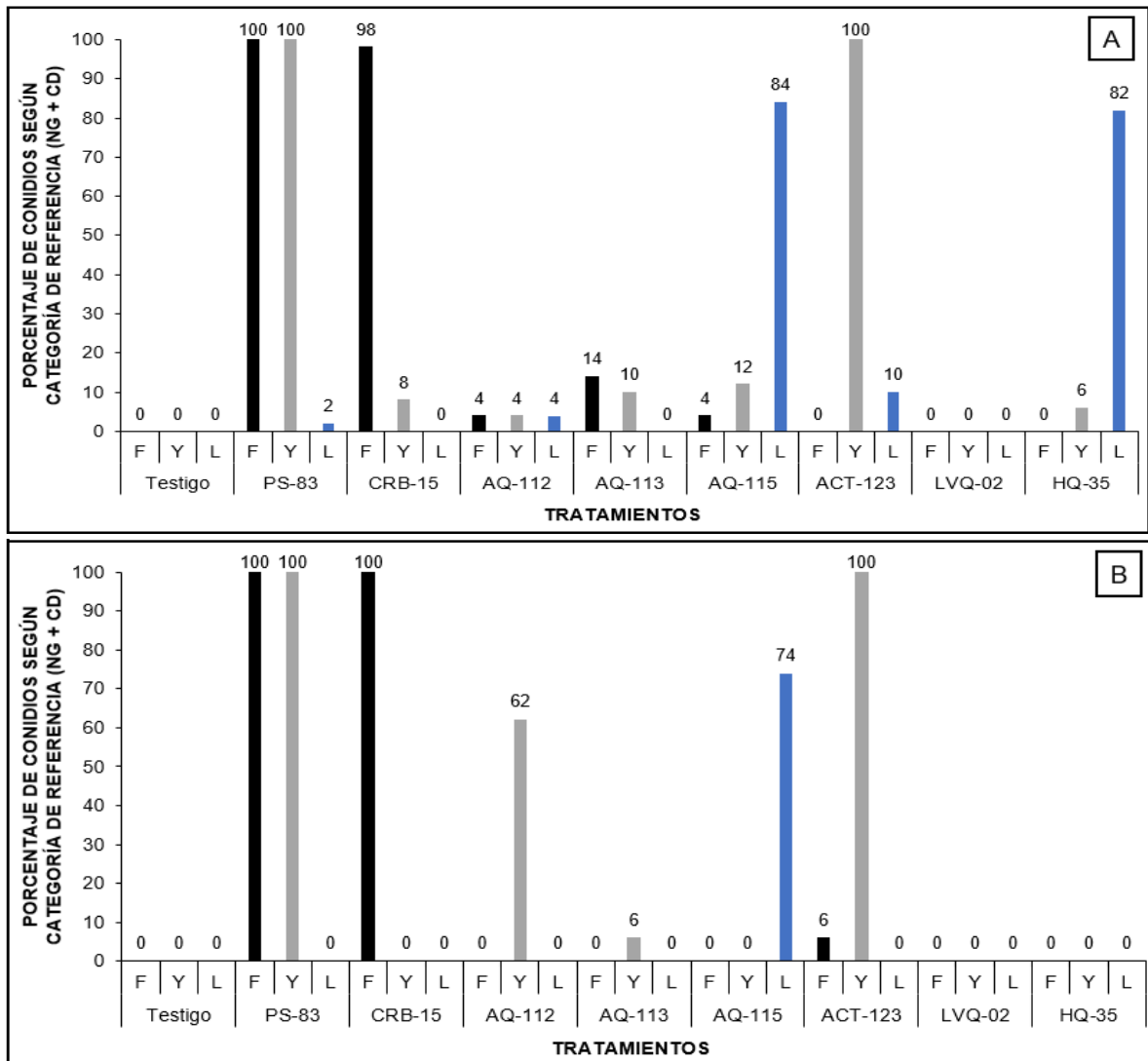


Figura 19. Porcentaje de conidios de *Colletotrichum musae* (A) y *Fusarium proliferatum* (B) obtenidos en la categoría de referencia frente a extractos crudos de ACB producidos en tres medios de cultivo líquidos. F. medio de fermentación. Y. medio YEGK. L. medio de actividad lítica.

En la Figura 20 se observan los efectos de los extractos crudos que sobresalieron con un porcentaje de conidios de *C. musae* mayor a 80 % en la categoría de referencia. En los tratamientos que mostraron un 100 % de afección se detectaron fuertes daños en los conidios, algunos no lograron germinar con una posible lisis celular con la liberación del contenido intracelular (flechas negras). Otros conidios sí lograron germinar pero todos ellos presentaron una deformación tipo vesícula en sus tubos germinativos (flechas rojas). El extracto de AQ-115 en medio de actividad lítica presentó conidios germinados pero con tubos germinativos más cortos con

respecto al testigo, mientras que el efecto del extracto de HQ-35 fue de conidios no germinados normales.

En la Figura 21 se presentan los efectos obtenidos con los extractos crudos que obtuvieron un porcentaje de conidios de *F. proliferatum* mayor a 60 % en la categoría de referencia. Los tratamientos con 100 % de conidios afectados mostraron fuertes daños que se visualizaron microscópicamente como células hinchadas (flechas negras), una posible pérdida de turgencia posterior (flechas rojas), y en su mayoría con tubos germinativos cortos. Los extractos crudos de AQ-112 en medio YEGK y AQ-115 en medio de actividad lítica propiciaron conidios con tubos germinativos visualmente más cortos que el testigo.

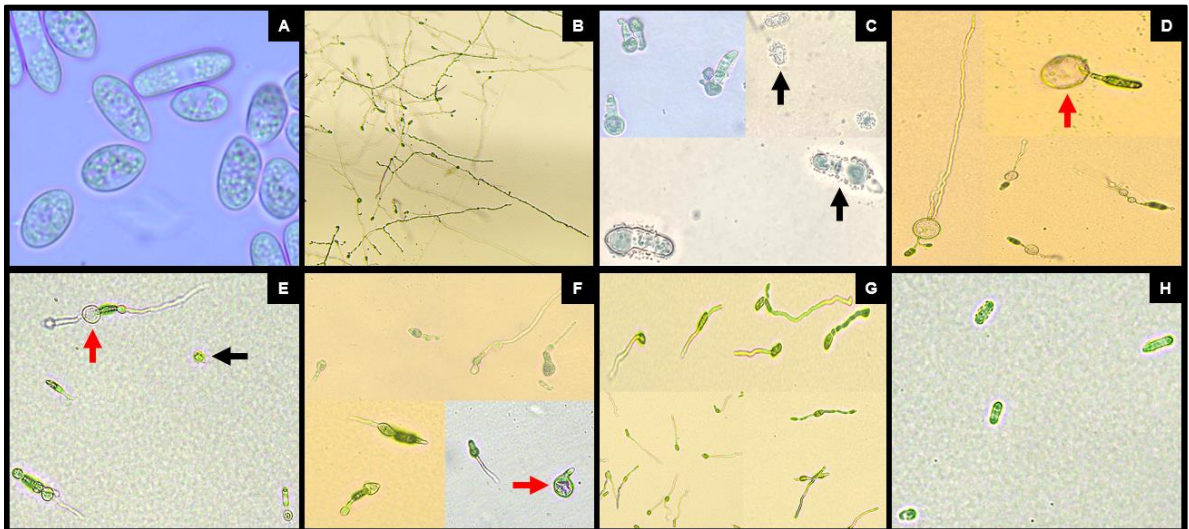


Figura 20. Efecto *in vitro* de diferentes tratamientos evaluados al 10 % sobre la germinación de conidios de *Colletotrichum musae* después de 15 horas de incubación. **A.** no germinados (60X). **B.** germinación normal (10X). **C.** PS-83 medio fermentación (40X). **D.** CRB-15 medio fermentación (40X). **E.** PS-83 medio YEGK (40X). **F.** ACT-123 medio YEGK (40X). **G.** AQ-115 medio actividad lítica (20X). **H.** HQ-35 medio actividad lítica (40X).

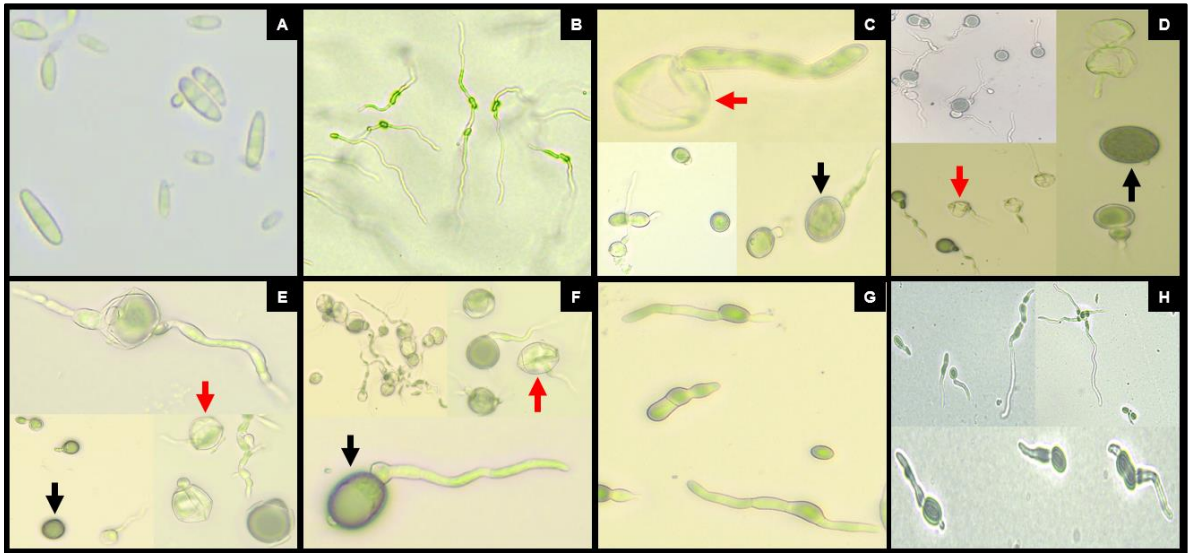


Figura 21. Efecto *in vitro* de diferentes tratamientos evaluados al 10 % sobre la germinación de conidios de *Fusarium proliferatum* después de 15 horas de incubación. **A.** no germinados (60X). **B.** germinación normal (10X). **C.** PS-83 medio fermentación (60X). **D.** CRB-15 medio fermentación (60X). **E.** PS-83 medio YEGK (60X). **F.** ACT-123 medio YEGK (60X). **G.** AQ-112 medio YEGK (60X). **H.** AQ-115 medio actividad lítica (40X).

2.5.2.4. Análisis de muestras mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) y microscopía electrónica de transmisión (MET).

a. Efecto antagonista de *Trichoderma* sp. sobre hifas de *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum* observado mediante MEB.

Mediante MEB se observaron similitudes y algunas diferencias en el comportamiento micoparásito de *Trichoderma* sp. para invadir a *C. musae* (Figura 22) y *F. proliferatum* (Figura 23). Se encontró contacto directo entre las hifas de *Trichoderma* sp. y los patógenos. Esta interacción entre el antagonista y los dos patógenos parece indicar que las hifas micoparásitas de LVQ-02 pueden crecer paralelamente o por encima de las hifas de los patógenos, causando daños en forma de depresiones y formando estructuras en forma de “gancho”; además, contra *F. proliferatum* se encontró una pérdida de turgencia y contracción de las hifas del patógeno.

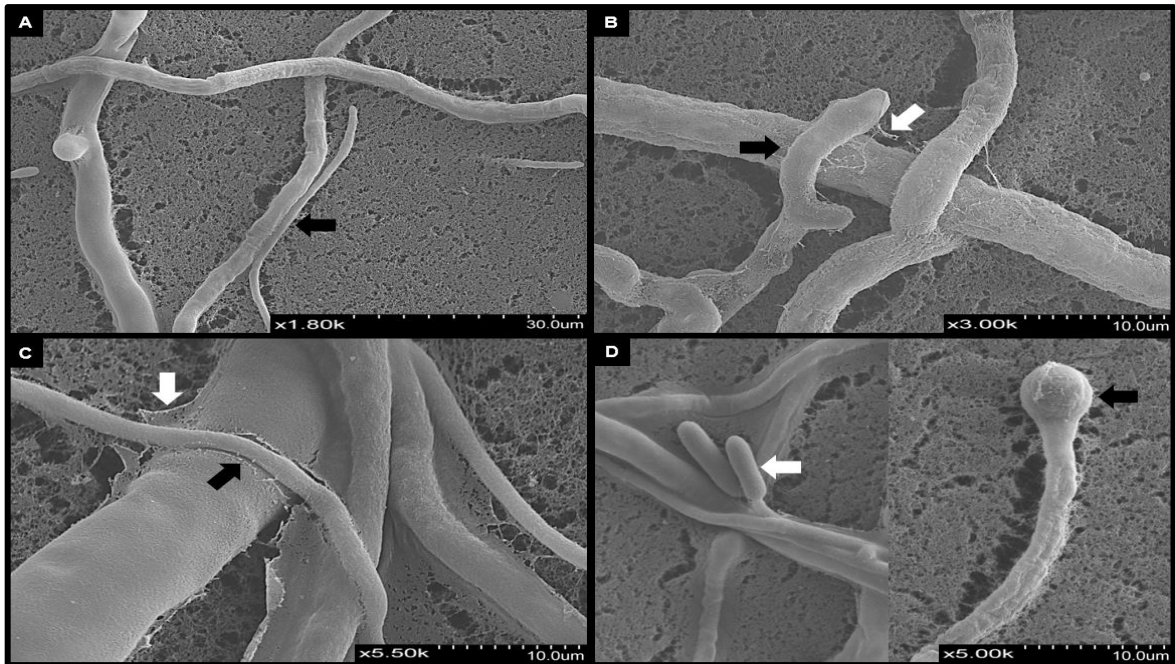


Figura 22. Interacción entre *Trichoderma* sp. (LVQ-02) y *C. musae* (CM) observada mediante MEB. **A.** crecimiento de LVQ-02 en paralelo a CM. **B.** estructura en forma de “gancho” (flecha negra) y deposición de material fibrilar (flecha blanca). **C.** depresión causado por LVQ-02 en hifa de CM (flecha negra) y deposición de material fibrilar (flecha blanca). **D.** conidios de LVQ-02 (flecha negra) y CM (flecha blanca).

Además, cuando existió interacción parasítica entre LVQ-02 y ambos patógenos se observó la producción de una especie de material fibrilar por parte del antagonista, pero esta producción tuvo un comportamiento diferente contra cada fitopatógeno: contra *C. musae* el material se depositó sobre el patógeno (Figura 22 C), mientras que contra *F. proliferatum* las hifas de *Trichoderma* sp. se encontraron compuestas por este tipo de material (Figura 23 D). También, se encontró formación de conidios del antagonista y *C. musae* a lo largo de una misma muestra. En contraste, LVQ-02 en interacción con *F. proliferatum* no evidenció producción de conidios por parte de ninguno de los dos microorganismos.

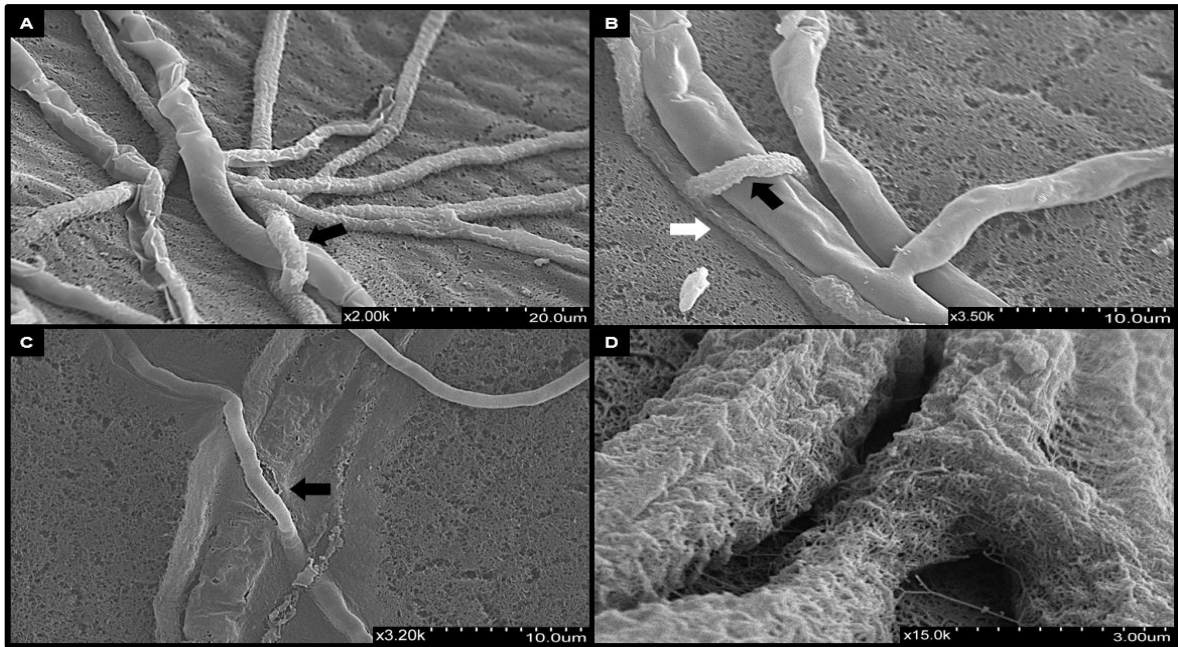


Figura 23. Interacción entre *Trichoderma* sp. (LVQ-02) y *F. proliferatum* (FP) observada mediante MEB. **A.** estructura en forma de “gancho” (flecha negra) y pérdida de turgencia en hifa de FP (flecha blanca). **B.** estructura en forma de “gancho” (flecha negra) y crecimiento de LVQ-02 en paralelo a FP (flecha blanca). **C.** depresión causado por LVQ-02 en hifa de FP (flecha negra). **D.** hifa de LVQ-02 con material fibrilar.

b. Efecto del extracto crudo de *Bacillus subtilis* sobre la morfología externa e interna de conidios de *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum* observado mediante MEB y MET.

La morfología conidial de *Colletotrichum musae* se observó mediante MEB y TEM (Figura 24). Las imágenes de MEB mostraron que los conidios del patógeno estaban intactos, con su forma característica y con un crecimiento normal cuando no se trataron con los extractos crudos de las bacterias. Con los propágulos tratados por 15 horas, se observaron efectos irreversibles similares con las dos bacterias: los conidios seguían en su estado natural pero con una malformación de aspecto globoso en su tubo germinativo (flecha negra), posteriormente se deformaron (flecha blanca), y finalmente se arrugaron (flecha roja), ocasionando una pérdida de turgencia en toda la estructura.

En las micrográficas de TEM, los conidios no tratados mostraron las paredes y membranas celulares intactas y todos los componentes celulares, principalmente

vacuolas, estaban visiblemente dispuestos de forma típica (flechas negras y blanca). Además, las estructuras tenían una densidad de electrones homogénea en el citoplasma. Por el contrario, los conidios tratados con los extractos crudos bacterianos primero exhibieron anomalías como ensanchamiento de las membranas y desacomodo de las estructuras celulares, seguidamente paredes celulares poco definidas (flechas rojas) y una densidad de electrones heterogénea, indicando una liberación del contenido intracelular.

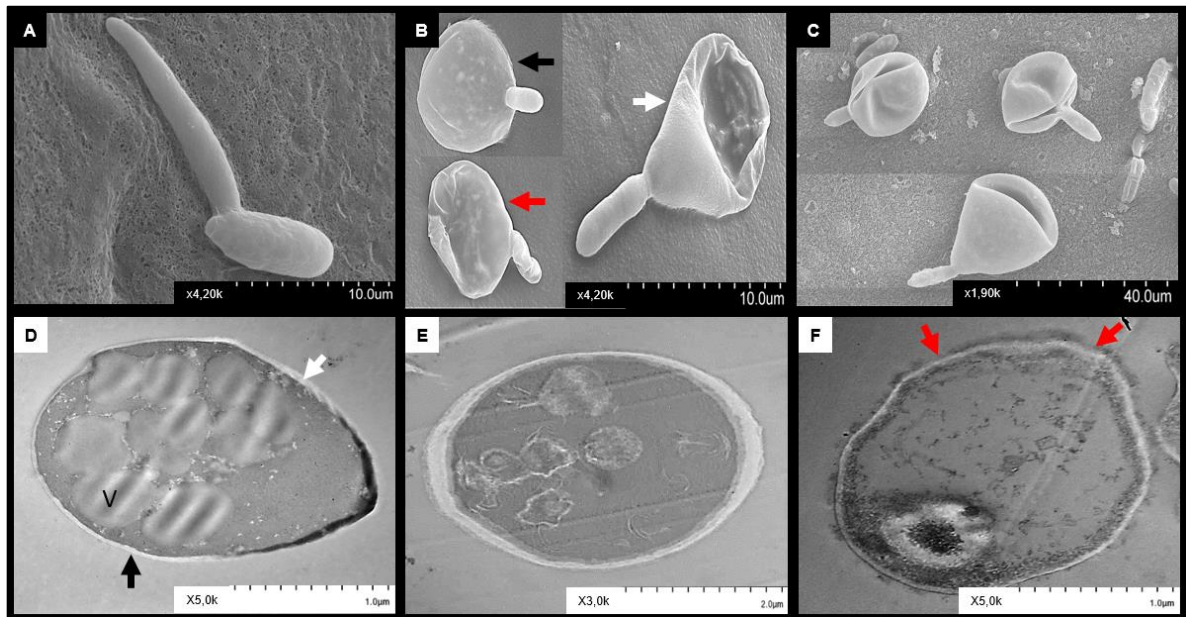


Figura 24. Micrografías con MEB y TEM de conidios de *C. musae* tratados con extractos crudos de PS-83 y CRB-15 (*B. subtilis*) producidos en medio de cultivo líquido de fermentación. **A.** conidio testigo (MEB). **B.** efectos de extracto crudo de PS-83 sobre conidios (MEB). **C.** conidios tratados con extracto crudo de CRB-15 (MEB). **D.** corte transversal de conidio testigo (TEM). **E.** corte transversal de conidio tratado con extracto crudo de PS-83 (TEM). **F.** corte transversal de conidio tratado con extracto crudo de CRB-15 (TEM). **V:** vacuola.

En la Figura 25 se observa la morfología conidial de *Fusarium proliferatum* analizada mediante MEB y TEM. Los conidios no tratados del patógeno después 15 horas de crecimiento y observados mediante MEB, se apreciaron sanos, germinados y algunos con tubos germinativos en ambos extremos de la célula. Cuando fueron tratados con los extractos crudos de PS-83 y CRB-15, se observaron conidios hinchados o arrugados. A pesar de ello, la mayoría de los propágulos *F. proliferatum* lograron la formación del tubo germinativo.

Las imágenes de TEM (Figura 25) muestran los conidios no tratados con un orden de organelas definido, donde el núcleo y las vacuolas están claramente visibles, las paredes y membranas celulares intactas, y una densidad de electrones homogénea. En contraste, los propágulos tratados con ambos extractos crudos mostraron paredes celulares distorsionadas y membranas más anchas (flecha blanca), además, no fue posible observar los componentes celulares de manera clara, indicando un desorden intracelular. También se encontraron células con sus paredes totalmente malformadas (flecha roja) y sin densidad de electrones en su interior; posiblemente estas células son las que, mediante MEB, se observaron arrugadas y con pérdida de turgencia, lo que posiblemente se deba a una lisis celular.

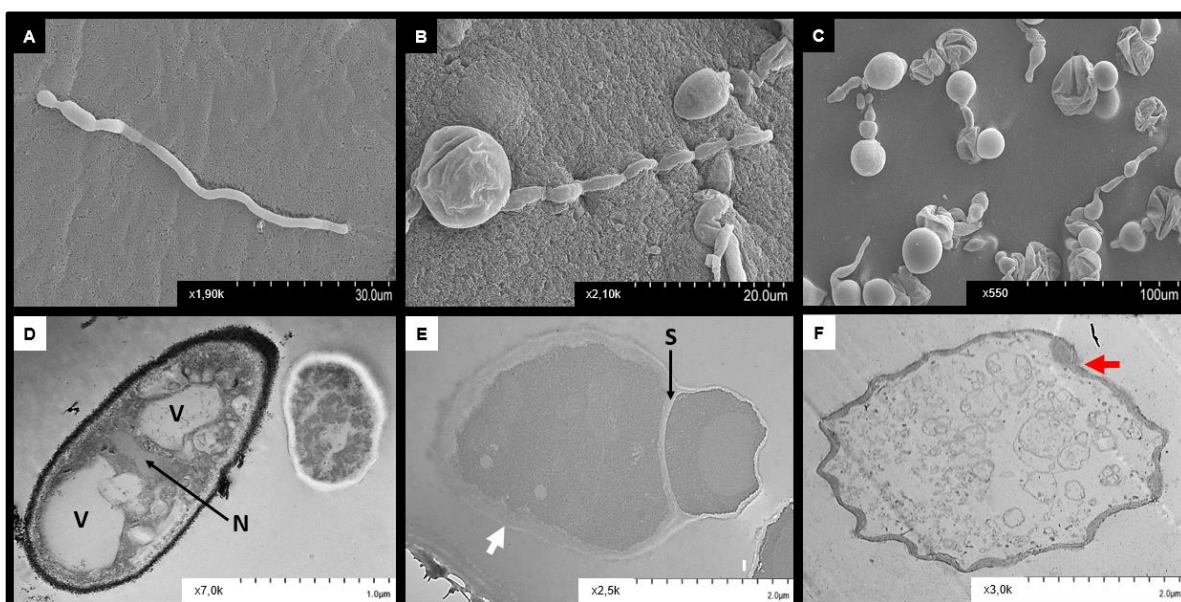


Figura 25. Micrografías con MEB y TEM de conidios de *F. proliferatum* tratados con extractos crudos de PS-83 y CRB-15 (*B. subtilis*) producidos en medio de cultivo líquido de fermentación. **A.** conidio testigo (MEB). **B.** efectos de extracto crudo de PS-83 sobre conidios (MEB). **C.** conidios tratados con extracto crudo de CRB-15 (MEB). **D.** corte longitudinal de conidio testigo (TEM). **E.** corte transversal de conidio tratado con extracto crudo de PS-83 (TEM). **F.** corte transversal de conidio tratado con extracto crudo de CRB-15 (TEM). **N:** núcleo. **V:** vacuola. **S:** septo.

2.5.3. Etapa II. Evaluación *in vitro* de la biocompatibilidad entre ACB.

Los resultados de la prueba de biocompatibilidad presentados en el Cuadro 11 y Figura 26 demostraron que existe una interacción positiva entre las dos cepas

Bacillus subtilis evaluadas y que son capaces de crecer en conjunto, ya que no hubo inhibición entre ellas. Además, PS-83 y CRB-15 presentaron biocompatibilidad con los aislamientos AQ-113 y AQ-115 (*Streptomyces* sp.). Entre bacterias filamentosas (*Streptomyces* sp.), el aislamiento AQ-112 fue capaz de crecer en conjunto con ACT-123 y AQ-113 presentó compatibilidad con AQ-115. Los hongos (LVQ-02 y HQ-35) no fueron biocompatibles entre ellos y tampoco con las bacterias.

Cuadro 11. Interacción entre agentes de combate biológico que demuestra su biocompatibilidad.

X	PS-83	CRB-15	AQ-112	AQ-113	AQ-115	ACT-123	LVQ-02	HQ-35
PS-83	-	-	-	-	-	-	-	-
CRB-15	✓	-	-	-	-	-	-	-
AQ-112	x	x	-	-	-	-	-	-
AQ-113	✓	✓	x	-	-	-	-	-
AQ-115	✓	✓	x	✓	-	-	-	-
ACT-123	x	x	✓	x	x	-	-	-
LVQ-02	x	x	x	x	x	x	-	-
HQ-35	x	x	x	x	x	x	x	-

*✓: compatibles. **x: no compatibles.

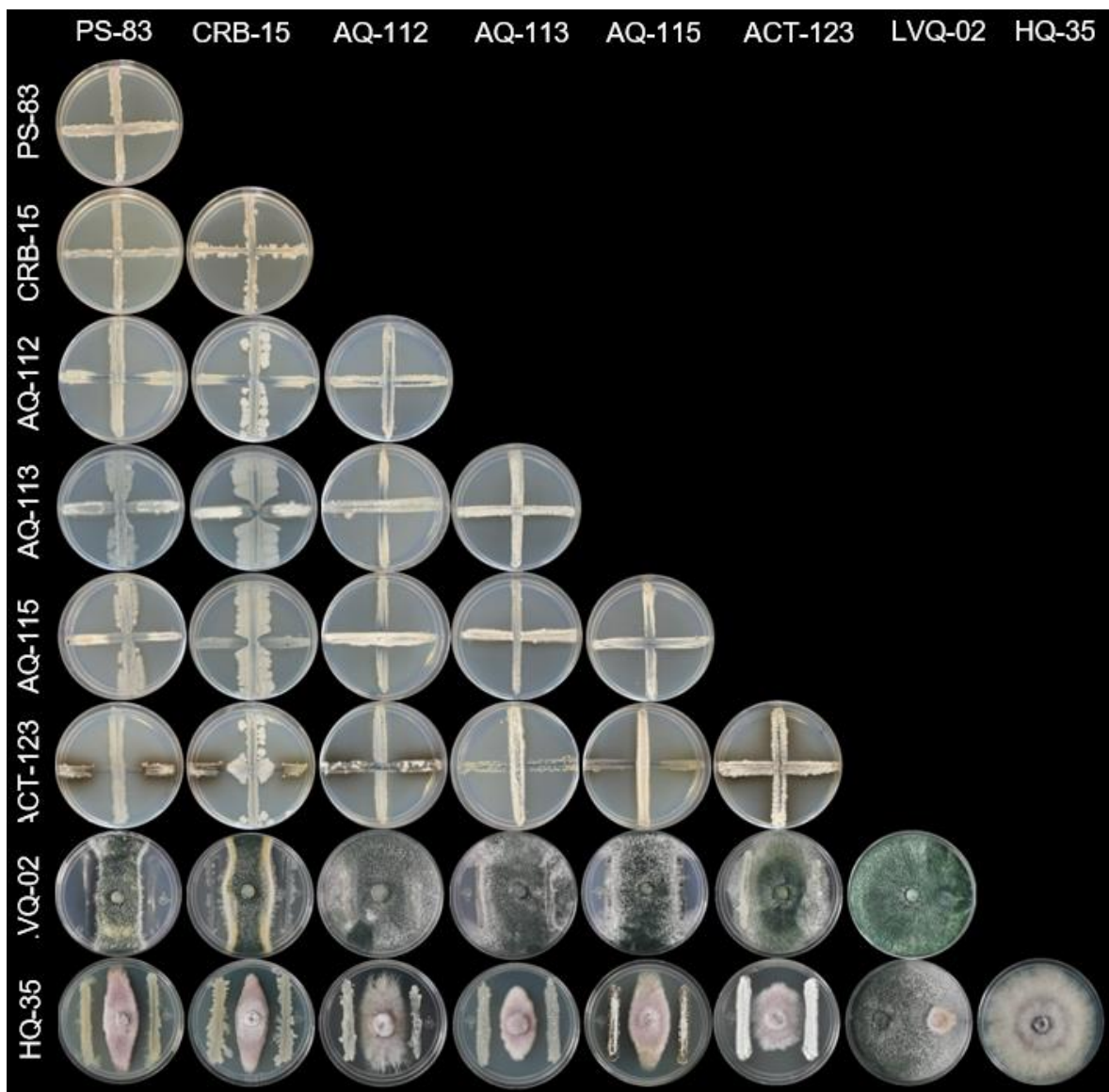


Figura 26. Crecimiento en conjunto de agentes de combate biológico que demuestra su biocompatibilidad.

2.5.4. Etapa III. Evaluación *in vitro* de factores poscosecha del banano que afectan el desempeño de los ACB.

2.5.4.1. Prueba de biocompatibilidad de ACB con sulfato de aluminio y amonio (alumbre) al 1%.

Los análisis de varianzas realizados demostraron que los tratamientos presentaron diferencias significativas cuando fueron evaluados a los 5 (<0,0001) y 30 (<0,0001) minutos de contacto con el alumbre al 1 %. AQ-115, LVQ-02 y HQ-35 mostraron los tres porcentajes de biocompatibilidad más altos en ambos tiempos de contacto,

exhibiendo una biocompatibilidad promedio mayor al 50 %; mientras que las cepas de *Bacillus subtilis* y demás aislamientos de *Streptomyces* fueron afectados de manera importante (Cuadro 12). Cabe mencionar que la mayoría de los microorganismos disminuyeron su porcentaje de biocompatibilidad después de 30 min en contacto con el alumbre, sin embargo, PS-83 y HQ-35 mostraron un comportamiento contrario, aumentando la biocompatibilidad con el mineral.

Además, la prueba de contrastes por microorganismo entre los dos tiempos de contacto con el alumbre al 1 % mostró diferencias significativas en los aislamientos AQ-115 y HQ-35. Mientras que los porcentajes de biocompatibilidad de CRB-15, AQ-112, AQ-113, ACT-123 y LVQ-02 fueron estadísticamente semejantes cuando fueron evaluados a los 5 y 30 minutos de contacto, indicando que la concentración de estos microorganismos, a pesar de verse afectada, se mantuvo estable durante el rango de tiempo evaluado. El pH de la solución de alumbre al 1 % (p/v) fue de 3,56.

Cuadro 12. Porcentajes de biocompatibilidad entre los ACB y alumbre al 1 % evaluados a 5 y 30 minutos de contacto.

Tratamiento	Biocompatibilidad (%)		Contraste (5 min - 30 min)
	5 min	30 min	p.valor
PS-83	0,00	14,20 c	N/A
CRB-15	16,49 cd	5,41 c	0,1955
AQ-112	20,97 bcd	13,75 c	0,3947
AQ-113	17,33 cd	5,81 c	0,1787
AQ-115	66,70 a	46,38 b	0,0214
ACT-123	15,35 d	10,27 c	0,5487
LVQ-02	55,77 ab	51,78 b	0,6368
HQ-35	43,13 abc	85,74 a	<0,0001
SE	5,92	5,92	N/A

*Letras diferentes en un mismo tiempo de contacto indican diferencias significativas, según prueba Tukey ($\alpha=0,05$).

2.5.4.2. Evaluación de la capacidad de inhibición del látex exudado de la corona sobre el crecimiento de ACB.

La Figura 27 muestra el efecto del látex exudado de la corona de gajos de banano de 12 semanas de edad (floración-cosecha) sobre el crecimiento de los

microorganismos antagonistas. Se logró apreciar una inhibición del crecimiento de las bacterias del género *Streptomyces* (AQ-112, AQ-113, AQ-115 y ACT-123) alrededor de los discos de papel impregnados con el látex extraído. El crecimiento de las cepas de *Bacillus subtilis* (PS-83 y CRB-15) y de los hongos (LVQ-02 y HQ-35) en apariencia no se vio afectado.

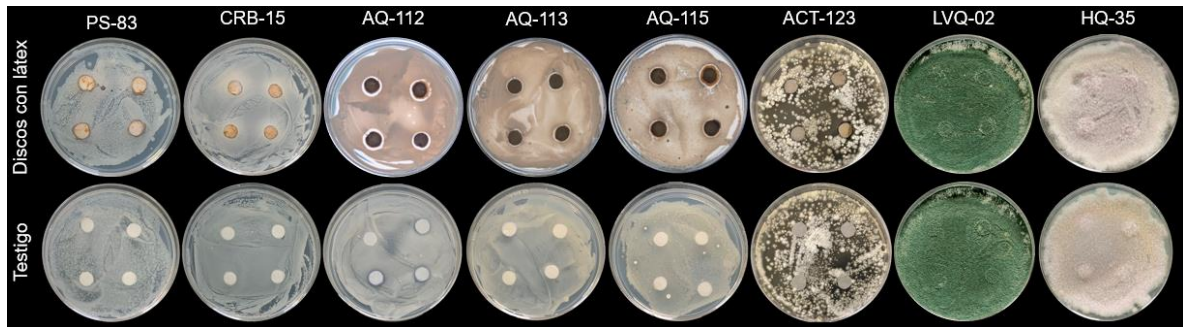


Figura 27. Efecto de discos impregnados con látex exudado de coronas de gajos de banana sobre el crecimiento de ACB utilizados para el control *in vitro* de enfermedades poscosecha.

2.5.4.3. Evaluación *in vitro* de la capacidad de crecimiento de los ACB a 14 °C.

En la Figura 28 se observan los resultados de la evaluación cualitativa del crecimiento de ocho ACB y dos patógenos poscosecha a 14 °C. En general, todos los microorganismos disminuyeron su tasa de crecimiento cuando fueron expuestos a la temperatura de almacenamiento del banana, en comparación con el desarrollo a la temperatura óptima de crecimiento (27 °C). Nótese que las cepas de *Bacillus subtilis* presentaron un menor crecimiento colonial, no hubo esporulación por partes de las bacterias del género *Streptomyces* y los hongos presentaron poco crecimiento de micelio. Cuando la temperatura de incubación aumentó (14 °C → 27 °C) por 5 días hubo una activación por parte de los microorganismos y su tasa de crecimiento aumentó, incluso por parte del aislamiento ACT-123 quien fue el único microorganismo que no presentó desarrollo a la temperatura comercial de almacenamiento.

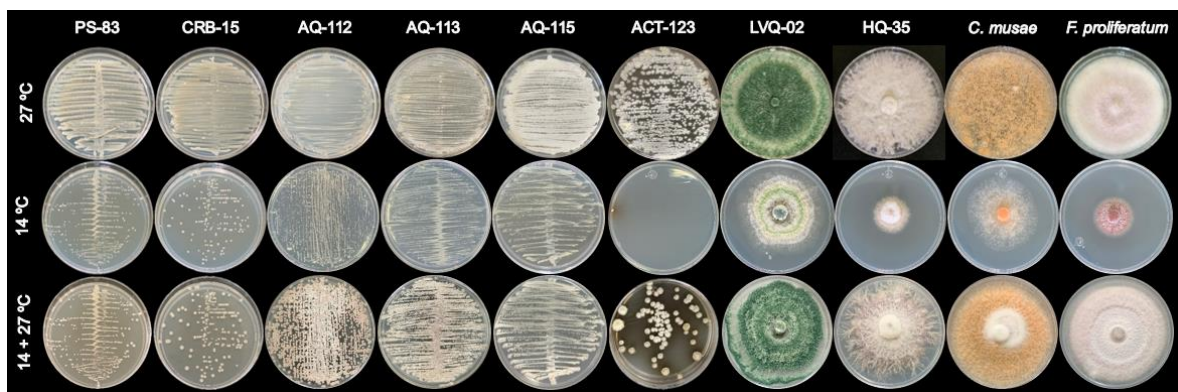


Figura 28. Efecto de la temperatura de almacenamiento comercial del banano (14 °C) sobre el crecimiento de ACB utilizados para el control *in vitro* de enfermedades poscosecha, después de 8 y 5 días de incubación.

2.5.5. Etapa IV. Selección de ACB mayor alto potencial antagonista para pruebas *in vivo* poscosecha.

En la presente investigación, de ocho ACB evaluados en las pruebas *in vitro* se seleccionaron los tres mejores aislamientos para ser estudiados en las pruebas *in vivo* poscosecha. En el Cuadro 13 se observa la sumatoria de los valores obtenidos por cada ACB en cada una de las evaluaciones *in vitro* y una totalización de dichos valores, para obtener un puntaje final por microorganismo. Los ACB con un mejor desempeño en las pruebas de laboratorio fueron PS-83 (*Bacillus subtilis*), LVQ-02 (*Trichoderma* sp.) y CRB-15 (*Bacillus subtilis*) con un puntaje final de 64,5, 60 y 59, respectivamente. Por esta razón, estos tres aislamientos fueron los seleccionados para las evaluaciones *in vivo* poscosecha. El aislamiento PS-83 (*Bacillus subtilis*) fue el que presentó los mejores resultados en las pruebas de antagonismo, mientras que LVQ-02 (*Trichoderma* sp.) fue el que exhibió mejor compatibilidad con los factores poscosecha, lo que les brindó los puntajes más altos según la escala desarrollada. Además, se decidió incluir al microorganismo CRB-15 (*Bacillus subtilis*) como un tercer ACB para ser utilizado en mezcla con PS-83, ya que también presentó resultados promisorios en las pruebas de antagonismo y ambos fueron biocompatibles. En cuanto a la forma de emplear los microorganismos, se decidió utilizar biofermentos producidos en medio de cultivo líquido de fermentación ya que los porcentajes de inhibición fueron mayores con respecto al uso de los ACB en crecimiento activo y extractos crudos.

Cuadro 13. Puntajes obtenidos y selección de ACB para pruebas *in vivo* contra *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum*, agentes causales de enfermedades poscosecha del banano.

Aislamiento	Pruebas de antagonismo				Biocomp. entre ACB (10 pts)	Factores poscosecha			Total (100 pts)
	Cultivo dual (15 pts)	Fermentos (15 pts)	Filtrados (15 pts)	Germinación de conidios (15 pts)		Alumbre (10 pts)	Látex (10 pts)	Crecimiento 14 °C (10 pts)	
PS-83	10,00	10,00	4,50	10,00	10,00	0,00	10,00	10,00	64,50
CRB-15	10,00	10,00	1,50	7,50	10,00	0,00	10,00	10,00	59,00
AQ-112	10,00	9,00	1,50	1,00	5,00	0,00	0,00	10,00	36,50
AQ-113	10,00	9,00	0,00	0,00	10,00	0,00	0,00	10,00	39,00
AQ-115	10,00	9,00	0,00	2,25	10,00	10,00	0,00	10,00	51,25
ACT-123	10,00	3,00	1,50	10,00	5,00	0,00	0,00	0,00	29,50
LVQ-02	15,00	15,00	0,00	0,00	0,00	10,00	10,00	10,00	60,00
HQ-35	10,00	9,00	0,00	2,25	0,00	10,00	10,00	10,00	51,25

2.6. DISCUSIÓN

2.6.1. Evaluación de la eficacia biológica *in vitro* de los ACB contra *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum*.

Los resultados de la prueba de antagonismo mediante cultivo dual con ACB en crecimiento activo, indican que todos los aislamientos evaluados lograron inhibir a *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum*, probablemente a través de diferentes mecanismos de acción. El comprender los mecanismos de acción involucrados en la actividad de biocontrol permite obtener bases para seleccionar cepas nuevas y eficientes (Hernández-Lauzardo *et al.* 2007).

Los porcentajes de inhibición mostrados por los aislamientos identificados como *Bacillus subtilis* (PS-83 y CRB-15) se asemejan a los encontrados por Alwindia y Natsuaki (2009), quienes mencionan que dos cepas de *B. amyloliquefaciens* exhibieron una inhibición del 50 % sobre el crecimiento *in vitro* de *C. musae* y *F. verticillioides*. Se considera que este género de bacterias produce antagonismos contra patógenos poscosecha mediante la competencia por espacio, nutrientes y la producción de una amplia gama de antibióticos y enzimas antifúngicas, principalmente (Arrebola *et al.* 2010, Ji *et al.* 2013, Gong *et al.* 2015, Punja *et al.* 2016). Arrebola *et al.* (2010) identificaron lipopéptidos de la familia de las iturinas, específicamente iturina A, como el principal compuesto inhibidor de *B. amyloliquefaciens* contra siete patógenos poscosecha de cítricos, aguacate y mango; esto lo refuerza los resultados obtenidos por Yu *et al.* (2002).

Además, la prueba de producción de enzimas líticas indicó, mediante un halo de hidrólisis, que PS-83 y CRB-15 hidrolizaron el glucano añadido al medio de cultivo (Anexo 1). Esto es señal de que las bacterias evaluadas tienen la capacidad de producción extracelular de β -1,3-glucanasas, enzima que se correlaciona significativamente con la inhibición del crecimiento del micelio de *C. gloeosporioides* y *F. oxysporum*; mediante la degradación de la pared celular y una posterior lisis celular (Kejela *et al.* 2016, Pedraza *et al.* 2020). La capacidad de las bacterias para producir metabolitos secundarios a menudo se puede observar en placas de agar, donde una zona clara alrededor de una colonia apunta a la producción y difusión de

los compuestos; lo que explicaría de cierta manera los halos de inhibición observados con las bacterias en confrontación (Sharma *et al.* 2014).

Los aislamientos identificados como *Streptomyces* sp. mostraron porcentajes de inhibición por debajo del 40 % contra *C. musae* y *F. proliferatum*. En contraste, Evangelista-Martínez *et al.* (2020) hallaron una inhibición *in vitro* mayor al 60 % por parte de dos aislamientos de *Streptomyces* sp. contra *C. musae*. Además, Li *et al.* (2021) hallaron porcentajes de inhibición *in vitro* más altos ejercidos por *Streptomyces* sp. cepa H4 contra *C. musae* (52,6 %), *F. oxysporum* f. sp. *cubense* raza 4 (70 %) y *F. graminearum* (76,5 %). No obstante, en las metodologías de cultivo dual utilizadas en dichas investigaciones, se realiza una inoculación e incubación del ACB previa a la del patógeno, probablemente por la lenta tasa de crecimiento y esporulación del antagonista observada (Sharma *et al.* 2014), lo que puede influir en los resultados de porcentaje de inhibición.

La evidencia científica acumulada indica que la eficacia de biocontrol del género *Streptomyces* se asocia estrechamente con la producción de diferentes compuestos antimicrobianos como enzimas líticas y antibióticos (Taechowisan *et al.* 2005, Prapagdee *et al.* 2008, Sharma y Manhas 2020); y esa producción se relaciona con la fase de esporulación de los microorganismos (Sharma *et al.* 2014). En la presente investigación, también se encontró que los aislamientos de *Streptomyces* sp. son capaces de producir extracelularmente quitinasas y β -1,3-glucanasas, enzimas líticas con potencial antifúngico contra *C. gloeosporioides* y *Sclerotium rolfsii* (Prapagdee *et al.* 2008). Sin embargo, Li *et al.* (2021) menciona que son necesarios más estudios para identificar los compuestos específicos involucrados en la actividad antagónica de este género.

Trichoderma sp. fue el antagonista con mayor eficacia *in vitro* frente a *C. musae* y *F. proliferatum*. Los resultados encontrados contra *C. musae* fueron semejante a los de Costa *et al.* (2021), quienes hallaron que una cepa de *T. piluliferum* creció sobre las hifas del patógeno, ocupando toda la superficie del medio y la cual recibió la mejor evaluación según la clasificación de inhibición utilizada. Contra *F. proliferatum*, los resultados obtenidos en esta investigación fueron superiores a los

de Ghanbarzadeh *et al.* (2014), quienes encontraron que las tres especies de *Trichoderma* evaluadas *in vitro* no superaron el 30 % de inhibición contra ese patógeno, pero, cuando los dos hongos entraron en contacto, se observó el mismo halo de confrontación (Figura 15).

Trichoderma spp. es reconocido por su efectividad en el control de diversos fitopatógenos, lo cual está relacionado con varios mecanismos de acción, incluyendo el micoparasitismo (Infante *et al.* 2009, González-Estrada *et al.* 2019). Este es un proceso que consta de cuatro fases: reonomiento quimiotrópico del microorganismo, ataque, penetración y la muerte (Vinale *et al.* 2008). Las interacciones observadas mediante MET se pueden considerar como típicas de parasitismo, indicando que LVQ-02 (*Trichoderma* sp.) completó las cuatro fases del parasitismo sobre *C. musae* y *F. proliferatum* (Pisi *et al.* 2001, Agrios 2004, de Souza *et al.* 2009, Carvalho *et al.* 2014).

El material fibrilar observado con MEB cuando LVQ-02 interactuó con los patógenos, se asemeja a lo encontrado por Elad *et al.* (1987). Ellos detectaron una sustancia extracelular de aspecto mucilaginoso y fibrilar, compuesta por polisacáridos y producida por *T. harzianum* en las primeras etapas del parasitismo contra *Rhizoctonia solani*. Además, encontraron este tipo de material cuando *T. atroviride* interactuó contra *F. culmorum*, quienes mencionan que este material tiene propiedades adhesivas que facilita el contacto entre el antagonista y las hifas del patógeno. El efecto inhibitorio de LVQ-02 contra *C. musae* y *F. proliferatum* se observó mediante MEB como crecimiento paralelo, enrollamiento, estructuras en forma de gancho y depresiones sobre las hifas de los patógenos; como lo confirman en sus trabajos Pisi *et al.* (2001), de Souza *et al.* (2009) y Carvalho *et al.* (2014).

Después del ataque, *Trichoderma* es capaz de secretar enzimas líticas que hidrolizan la pared celular del hongo huésped para obtener fuentes de carbono (Vinale *et al.* 2008). El aislamiento LVQ-02 demostró tener la capacidad de producir quitinasas (Anexo 1), las cuales se asocian con el daño y penetración de las paredes celulares del hospedero que puede contener quitina, β -glucanos y proteínas (da Costa *et al.* 2021). Dicha penetración, es la que causa la pérdida de turgencia en

las hifas del patógeno (Pisi *et al.* 2001), como la observada contra *F. proliferatum*. Todo esto podría explicar de alguna manera como ejerce su antagonismo LVQ-02 (*Trichoderma* sp.), sin embargo, no se puede excluir que otros mecanismos de acción también estuviesen involucrados.

Por otro lado, la prueba de eficacia biológica con biofermentos producidos en tres medios de cultivo líquido, demostró que el antagonismo de todos los ACB mejoró contra *C. musae* y en algunos aislamientos contra *F. proliferatum*, en comparación con el uso de ACB en crecimiento activo. Yáñez (2012) menciona que los medios complejos de fermentación líquida satisfacen los requerimientos de energía, carbono, nitrógeno y además, proporcionan minerales para propiciar una alta producción de propágulos, biomasa y de metabolitos secundarios. Por otro lado, brindar las condiciones óptimas para los microorganismos en el proceso de fermentación, como la temperatura, pH y aireación, favorece a la obtención de bioproductos más eficaces (Lumsden *et al.* 1995); lo que explicaría la mejora en el antagonismo *in vitro* brindada por los biofermentos.

En cuanto a la evaluación de los extractos crudos, los resultados indicaron un nulo o leve antagonismo contra *C. musae* y *F. proliferatum*. Estos resultados contrastan los obtenidos por diferentes autores, quienes hallaron altos porcentajes de biocontrol con extractos crudos libres de células de *Bacillus* sp. (Alvindhia y Natsuaki 2009, Xu *et al.* 2020), *Streptomyces* spp. (Ismet *et al.* 2012, Li *et al.* 2021) y *Trichoderma* spp. (Mortuza y Ilag 1999, da Costa *et al.* 2021) contra patógenos poscosecha del banano y fresa, pero, producidos con un tiempo de fermentación no mayor a 5 días. La baja bioeficacia obtenida de los extractos crudos podría estar influenciada por el factor tiempo de incubación, que en el presente estudio fue de 10 días. Bajo esta hipótesis, Prapagdee *et al.* (2008) y Kejela *et al.* (2016) afirman que la actividad inhibitoria *in vitro* de *S. hygroscopicus* y *B. amyloliquefciens* contra *C. gloeosporioides*, *Sclerotium rolfsii* y *F. oxysporum* disminuye con la extensión del periodo de incubación, ya que la actividad inhibitoria de sus enzimas líticas comienza a bajar drásticamente después del tercer día de fermentación.

Con respecto a la prueba de germinación de conidios, los resultados indicaron que los extractos crudos de PS-83, CRB-15 (*B. subtilis*) y ACT-123 (*Streptomyces* sp.) sí afectaron los conidios de *C. musae* y *F. proliferatum*, ocasionando daños similares en los patógenos, probablemente debido a la capacidad de los microorganismos de producir una serie de metabolitos secundarios con un amplio espectro de actividad antifúngica (Sharma *et al.* 2014). El análisis micrográfico con MEB y MET indicó que las sustancias antifúngicas de los extractos crudos de PS-83 y CRB-15 claramente afectaron el interior y exterior de los conidios patogénicos, a través de cambios morfológicos, colapso de las estructuras conidiales y la ruptura de membranas. Estos resultados son comparables con los obtenidos por Ruangwong y Liang (2012) y Xu *et al.* (2019), quienes utilizaron antibioticos lipopeptídicos de *B. subtilis* y encontraron una desorganización celular, ruptura de membranas plasmáticas y una baja electrodensidad en el citoplasma en conidios de *C. gloesporoides* y *F. oxysporum* f. sp. *niveum*.

Sin embargo, Thimon *et al.* (1995) menciona que algunos antibioticos, como la iturina A, son capaces de dañar las membranas plasmáticas y afectar la membrana nuclear pero, la pared celular la atraviesan sin romperla; esta estructura es el objetivo principal de las enzimas líticas, las cuales se encargan de degradar sus componentes para comprometer su integridad estructural (Xu *et al.* 2020). El efecto inhibitorio de *B. subtilis* sobre los conidios de hongos patógenos posiblemente se debió a un efecto sinérgico entre enzimas líticas y antibióticos con capacidad antifúngica. Ahora bien, los daños sobre la pared y membrana celular representan el primer paso para promover un desequilibrio osmótico interno en el conidio y una distorsión citoplasmática que dan como resultado la plasmólisis celular de *C. musae* y *F. proliferatum*, ocasionando el daño morfológico visible en los conidios (Romero *et al.* 2007, Ruangwong y Liang 2012, Xu *et al.* 2019).

2.6.2. Evaluación *in vitro* de la biocompatibilidad entre ACB.

En el presente estudio *in vitro*, los aislamientos PS-83/CBR-15 (*Bacillus subtilis*), AQ-113/AQ-115 (*Streptomyces* sp.) y AQ-112/ACT-123 (*Streptomyces* sp.) no presentaron antagonismo entre sí y fueron biocompatibles; posiblemente

influenciado por el hecho de que son combinaciones de microorganismos del mismo género y/o especie (Zangoei *et al.* 2014). Además, se encontró que las cepas de *B. subtilis* y dos aislamientos de *Streptomyces* sp. presentaron biocompatibilidad, lo cual genera interés, ya que son grupos de bacterias con diferentes características y con un distinto espectro de producción de enzimas líticas y antibióticos, lo cual podrían combinarse para obtener una mejor eficacia biológica (Sharma *et al.* 2014).

Por otro lado, *Trichoderma* sp. y *Fusarium* sp. fueron incompatibles con las bacterias, debido a que se formó una zona de inhibición que separaba ambos microorganismos; probablemente debido a que los mismos metabolitos secundarios involucrados contra *C. musae* y *Fusarium proliferatum* lograron inhibir a los hongos ACB. Algunos de estos resultados son comparables a los obtenidos por Thilagavathi *et al.* (2007), quienes determinaron esta misma incompatibilidad entre *T. viride* y *B. subtilis* mediante una zona de inhibición que separaba a ambas cepas.

2.6.3. Evaluación *in vitro* de factores poscosecha del banano que afectan el desempeño de los ACB.

En la presente investigación, se encontró que la viabilidad de los ACB se vio afectada negativamente cuando fueron puestos en contacto con una solución al 1 % (p/v) de alumbre. Pocos estudios han reportado el efecto que tiene este mineral en los microorganismos, ya que la mayoría de investigaciones sobre control biológico en poscosecha del banano omiten su uso; no obstante, Williamson *et al.* (2008) indican que combinar la bacteria *Pseudomonas syringae* cepa ESC-11 con alumbre al 1 % (p/v) reduce la viabilidad del microorganismos. Por otro lado, Rivas (2016) comprobó que en mezclas de biofungicidas comerciales al 10 % (v/v) con alumbre al 1 % (p/v) los ACB mantienen la viabilidad *in vitro*, lo cual puede ser una forma de compensar el efecto del alumbre. Sin embargo, aún no se tiene claro que causa esta reducción en la viabilidad de las células, aunque posiblemente se deba al pH ácido obtenido de la solución que puede afectar a los microorganismos, principalmente a las bacterias.

En cuanto al factor látex, se observó que los aislamientos AQ-112, AQ-113 y AQ-115 (*Streptomyces* spp.) fueron afectados negativamente mediante la formación de

un halo de inhibición alrededor de los discos de papel impregnados con el látex exudado de la corona, indicando que alguno de los constituyentes del látex tiene un efecto antimicrobiano que afecta el crecimiento de estos aislamientos. La literatura indica que este componente de la planta y el fruto, está constituido principalmente por fenoles, terpenos, terpenolenos, agua, azúcares y proteínas que cumplen la función biológica de retrasar y en ocasiones de suprimir el desarrollo de hongos y bacterias que puedan afectar partes de la planta (Kallarackal *et al.* 1986, Baker *et al.* 1990, citados por Ramírez *et al.* 2009), lo que explicaría de cierta forma la inhibición observada; no obstante, esta función no se vio reflejada en bacterias bacilares y hongos antagonistas.

La prueba de crecimiento *in vitro* a 14 °C demostró que la capacidad de crecimiento de ACB y patógenos poscosecha del banano se ve reducido por la temperatura comercial de transporte y almacenamiento. Tomando en cuenta la clasificación de microorganismos según su temperatura y el origen de aislamiento de cada ACB (Cuadro 1), se puede decir que tanto ACB y patógenos presentan un crecimiento mesófilo y están adaptados a climas tropicales (Ramírez *et al.* 2006). Esto indica que el rango óptimo de temperatura para el crecimiento de los antagonistas estudiados se encuentra entre los 20-30 °C, de forma que, la exposición a temperaturas por fuera de ese rango retrasarían el crecimiento y podrían afectar la expresión total de los mecanismos de acción de un ACB, limitando su bioeficacia (Kredics *et al.* 2003, Hamdache *et al.* 2012).

2.7. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos en el capítulo 2 se derivan las siguientes conclusiones:

1. La actividad antagónica de las bacterias del género *Bacillus* (PS-83, CRB-15) y *Streptomyces* (AQ-112, AQ-113, AQ-115 y ACT-123) contra *C. musae* y *F. proliferatum* se asoció principalmente con la capacidad de producir enzimas líticas y otros metabolitos secundarios.
2. El mecanismo de acción de LVQ-02 (*Trichoderma sp.*) contra *C. musae* y *F. proliferatum* se relacionó con micoparasitismo, competencia por espacio y nutrientes y su capacidad de producir enzimas líticas.
3. La fermentación de los ACB en los medios de cultivo líquidos de fermentación, YEGK y actividad lítica aumentó la bioeficacia *in vitro* contra *C. musae* y *F. proliferatum*, en comparación con el uso de los antagonistas en crecimiento activo.
4. Ningún extracto crudo (fermento libre de células) producido en los tres medios de cultivo líquido e incubados por 10 días mostró ser eficaz en el control *in vitro* del crecimiento micelial de *C. musae* y *F. proliferatum*.
5. Los extractos crudos de PS-83, CRB-15 (*B. subtilis*) y ACT-123 inhibieron totalmente la germinación *in vitro* de los conidios de *C. musae* y *F. proliferatum*, lo cual se asoció daños morfológicos internos y externos en los conidios.
6. Los aislamientos de *B. subtilis* y *Streptomyces sp.* evaluados fueron capaces de crecer en conjuntos, lo que evidenció la biocompatibilidad entre estos, caso contrario ocurrió con los hongos ACB en estudio.
7. El alumbre al 1 % afectó la viabilidad de la mayoría de ACB evaluados, siendo las bacterias del género *Bacillus* y *Streptomyces* los más afectados.
8. El látex exudado por la corona de gajos de banano inhibió únicamente a los tres aislamientos del género *Streptomyces*.

9. La temperatura comercial de transporte y almacenamiento de banano de exportación afectó la capacidad de crecimiento y desarrollo de los microorganismos ACB y patógenos.
10. Se diseñó una metodología para la selección de ACB basada en el desempeño *in vitro*, la cual permitió destacar dos cepas de *Bacillus subtilis* (PS-83 y CRB-15) y una de *Trichoderma* sp. (LVQ-02) como ACB con alto potencial para el control *in vivo* de enfermedades poscosecha del banano.

2.8. RECOMENDACIONES

Según los resultados obtenidos en el capítulo 2 se recomienda lo siguiente:

1. Para futuras pruebas de antagonismos *in vitro* en las que se involucren *Streptomyces* spp. en crecimiento activo, considerar una inoculación previa del antagonista, tomando en cuenta el momento de esporulación de la bacteria y así promover iguales condiciones de competencia.
2. Realizar curvas de crecimiento microbiano a agentes de combate biológico con alto potencial para optimizar el proceso de fermentación y producción de extractos crudos, que faciliten determinar el momento de mayor producción y actividad de los metabolitos secundarios producidos por los ACB.
3. Evaluar *in vitro* la eficacia biológica de los extractos crudos producidos en diferentes etapas del crecimiento microbiano y a diferentes tiempos de incubación.
4. Evaluar la capacidad de los ACB de crecer bajo la atmósfera modificada generada por los materiales utilizados en el empaque de la fruta (bolsas plásticas).

2.9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrios, G. 2004. Plant pathology. 5 ed. University of Florida. 1-922 p. DOI: <https://doi.org/10.1016/C2009-0-02037-6>.

Alvandia, D; Natsuaki, K. 2009. Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot-causing pathogens. *Crop Protection* 28(3):236-242. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.10.011>.

Arrebola, E; Jacobs, R; Korsten, L. 2010. Iturin A is the principal inhibitor in the biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* PPCB004 against postharvest fungal pathogens. *Journal of Applied Microbiology* 108(2):386-395. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2009.04438.x>.

Brandfass, C; Karlovsky, P. 2008. Upscaled CTAB-based DNA extraction and real-time PCR assays for *Fusarium culmorum* and *F. Graminearum* dna in plant material with reduced sampling error. *International Journal of Molecular Sciences* 9(11):2306-2321. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms9112306>.

Carvalho, D; Lobo, J; Martins, I; Inglis, P; Mello, S. 2014. Biological control of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* by *Trichoderma harzianum* and its use for common bean seed treatment. *Tropical Plant Pathology* 39(5):384-391. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1982-56762014000500005>.

da Costa, A; Furtado, R; Araújo, F; Ulhoa, C. 2021. Potential of *Trichoderma piluliferum* as a biocontrol agent of *Colletotrichum musae* in banana fruits. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 34:1-7. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2021.102028>.

Elad, Y; Sadowsky, Z; Chet, I. 1987. Scanning electron microscopical observations of early stages of interaction of *Trichoderma harzianum* and *Rhizoctonia solani*. *Transactions of the British Mycological Society* 88(2):259-263. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0007-1536\(87\)80223-1](https://doi.org/10.1016/s0007-1536(87)80223-1).

Evangelista-Martínez, Z; Contreras-Leal, E; Corona-Pedraza, L; Gastélum-Martínez, É. 2020. Biocontrol potential of *Streptomyces* sp. CACIS-1.5CA against phytopathogenic fungi causing postharvest fruit diseases. Egyptian Journal of Biological Pest Control 30(117):1-10. DOI: <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00319-9>.

Ghanbarzadeh, B; Safaie, N; Goltapeh, E. 2014. Antagonistic activity and hyphal interactions of *Trichoderma* spp. against *Fusarium proliferatum* and *F. oxysporum* *in vitro*. Archives of Phytopathology and Plant Protection 47(16):1979-1987. DOI: <https://doi.org/10.1080/03235408.2013.864506>.

Gong, A; Li, H; Yuan, Q; Song, X; Yao, W; He, W; Zhang, J; Liao, Y. 2015. Antagonistic mechanism of Iturin A and plipastatin a from *Bacillus amyloliquefaciens* S76-3 from wheat spikes against *Fusarium graminearum*. Plos One 10(2):1-18. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116871>.

González-Estrada, R; Blancas-Benítez, F; Montaña-Leyva, B; Moreno-Hernández, C; Del Carmen Romero-Islas, L; Romero-Islas, J; Avila-Peña, R; Ramos-Guerrero, A; Fonseca-Cantabrana, A; Gutierrez-Martinez, P. 2019. A review study on the postharvest decay control of fruit by *Trichoderma*. s.l., s.e. p. 1-15 DOI: <https://doi.org/10.5772/intechopen.82784>.

Guetsky, R; Shtienberg, D; Elad, Y; Dinoor, A. 2001. Combining biocontrol agents to reduce the variability of biological control. Phytopathology 91(7):621-627. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2001.91.7.621>.

Guetsky, R; Shtienberg, D; Elad, Y; Fischer, E; Dinoor, A. 2002. Improving biological control by combining biocontrol agents each with several mechanisms of disease suppression. Phytopathology 92(9):976-985. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2002.92.9.976>.

Hamdache, A; Ezziyyani, M; Alain, B; Lamarti, A. 2012. Effect of pH, temperature and water activity on the inhibition of *Botrytis cinerea* by *Bacillus amyloliquefaciens* isolates. African Journal of Biotechnology 11(9):2210-2217. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJB11.645>.

Harris, D. 2003. Quantitative chemical analysis. 6 ed. New York, W.H. Freeman and Company. 720 p.

Hernández-Lauzardo, A; Bautista-Baños, S; Velázquez-del Valle, M. 2007. Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Revista mexicana de fitopatología* 25(1):66-74.

Hoyos-carvajal, L; Chaparro, P; Abramsky, M; Chet, I. 2008. Evaluación de aislamientos de *Trichoderma* spp. contra *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii* bajo condiciones *in vitro* y de invernadero. *Agronomía Colombiana* 26(3):451-458.

Infante, D; Martínez, B; González, N; Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Veg* 24(1):14-21.

Ismet, A; Rizwana, H; Al-Othman, M; Bakir, A. 2012. Studies of actinomycetes for biological control of *Colletotrichum musae* pathogen during post-harvest anthracnose of banana. *African Journal of Microbiology Research* 6(17):3879-3886. DOI: <https://doi.org/10.5897/ajmr12.088>.

Janisiewicz, W. 1996. Ecological diversity, niche overlap, and coexistence of antagonist used in developing mixtures for biocontrol of postharvest diseases of apples. *Phytopathology* 86(5):473-479.

Janisiewicz, W; Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology* 40(24):411-441. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120401.130158>.

Ji, S; Paul, N; Deng, J; Kim, Y; Yun, B; Yu, S. 2013. Biocontrol activity of *Bacillus amyloliquefaciens* CNU114001 against fungal plant diseases. *Mycobiology* 41(4):234-242. DOI: <https://doi.org/10.5941/MYCO.2013.41.4.234>.

Jones, D. 2018. Handbook of Diseases of Banana, Abacá and Enset. 1 ed. CABI. Boston, MA, 615 p.

Kejela, T; Thakkar, V; Thakor, P. 2016. *Bacillus* species (BT42) isolated from *Coffea arabica* L. rhizosphere antagonizes *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium*

oxysporum and also exhibits multiple plant growth promoting activity. BMC Microbiology 16(1):1-13. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0897-y>.

Kredics, L; Antal, Z; Manczinger, L; Szekeres, A; Kevei, F; Nagy, E. 2003. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. Food Technology and Biotechnology 41(1):37-42.

Li, X; Jing, T; Zhou, D; Zhang, M; Qi, D; Zang, X; Zhao, Y; Li, K; Tang, W; Chen, Y; Qi, C; Wang, W; Xie, J. 2021. Biocontrol efficacy and possible mechanism of *Streptomyces* sp. H4 against postharvest anthracnose caused by *Colletotrichum fragariae* on strawberry fruit. Postharvest Biology and Technology 175: 1-11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111401>.

Lumsden, R; Lewis, J; Fravel, D. 1995. Formulation and delivery of biocontrol agents for use against soilborne plant pathogens. p. 166-182 DOI: <https://doi.org/10.1021/bk-1995-0595.ch011>.

Marian, M; Shimizu, M. 2019. Improving performance of microbial biocontrol agents against plant diseases. Journal of General Plant Pathology 85(5):329-336. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10327-019-00866-6>.

Mortuza, G; Ilag, L. 1999. Potential for biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. and Maubl. in banana fruits by *Trichoderma* species. Biological Control 15(3):235-240. DOI: <https://doi.org/10.1006/bcon.1999.0716>.

Pedraza, L; López, C; Uribe-Vélez, D. 2020. Mechanisms of action of *Bacillus* spp. (Bacillaceae) against phytopathogenic microorganisms during their interaction with plants. Acta Biológica Colombiana 25(1):112-125. DOI: <https://doi.org/10.15446/abc.v25n1.75045>.

Pisi, A; Roberti, R; Zakrisson, E; Filippini, G; Mantovani, W; Cesari, A. 2001. SEM investigation about hyphal relationships between some antagonistic fungi against *Fusarium* spp. foot rot pathogen of wheat. Phytopathologia Mediterranea 40(1):37-44. DOI: https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-1588.

Prapagdee, B; Kuekulvong, C; Mongkolsuk, S. 2008. Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. International Journal of Biological Sciences 4(5):330-337. DOI: <https://doi.org/10.7150/ijbs.4.330>.

Punja, Z; Rodriguez, G; Tirajoh, A. 2016. Effects of *Bacillus subtilis* strain QST 713 and storage temperatures on post-harvest disease development on greenhouse tomatoes. Crop Protection 84:98-104. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2016.02.011>.

Ramírez, M; Sáenz, MV; Vargas, A. 2009. Efecto de la inmersión en agua caliente sobre la secreción de látex por la corona de gajos recién conformados de frutos de banano. Agronomía Costarricense 35(1):1-14. DOI: <https://doi.org/10.15517/rac.v35i1.6684>.

Ramírez, N; Serrano, J; Sandoval, H. 2006. Microorganismos extremófilos. Actinomicetos halófilos en México. Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas 37(3):56-71.

Rivas, R. 2016. Actividad en laboratorio y en poscosecha de biofungicidas sobre el control de *Fusarium* spp. y *Colletotrichum musae*, agentes causales de enfermedades poscosecha en banano (*Musa* AAA; subgrupo Cavendish). Tesis de licenciatura, UCR. 65 p.

Romero, D; de Vicente, A; Olmos, J; Dávila, J; Pérez-García, A. 2007. Effect of lipopeptides of antagonistic strains of *Bacillus subtilis* on the morphology and ultrastructure of the cucurbit fungal pathogen *Podosphaera fusca*. Journal of Applied Microbiology 103(4):969-976. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03323.x>.

Ruangwong, O; Liang, W. 2012. Effect of crude extract from *Bacillus subtilis* lb5 cultivated broth on conidial germination of *Colletotrichum gloeosporioides*. International Journal of Medical and Health Sciences 6(12):644-648.

Sangeetha, G; Usharani, S; Muthukumar, A. 2009. Biocontrol with *Trichoderma* species for the management of postharvest crown rot of banana. Phytopathologia

Mediterranea 48(2):214-225. DOI: https://doi.org/10.14601/Phytopathol_Mediterr-2741.

Sharma, A; Gautam, S; Saxena, S. 2014. *Streptomyces*. Encyclopedia of Food Microbiology: Second Edition 3:560-566. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-384730-0.00326-8>.

Sharma, M; Manhas, RK. 2020. Purification and characterization of salvianolic acid B from *Streptomyces* sp. M4 possessing antifungal activity against fungal phytopathogens. Microbiological Research 237:126478. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126478>.

Singh, D; Sharma, R. 2018. Postharvest diseases of fruits and vegetables and their management. Elsevier Inc. p. 1-52 DOI: <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-812698-1.00001-7>.

de Souza, G; Costa, D; Mello, S; Murillo, J; Martins, I; Minaré, L. 2009. Antagonist potential of *Trichoderma* spp. from distinct agricultural ecosystems against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Fusarium solani*. Biota Neotropica 9(3):145-149. DOI: <https://doi.org/10.1590/s1676-06032009000300014>.

Stockwell, V; Johnson, K; Sugar, D; Loper, J. 2011. Mechanistically compatible mixtures of bacterial antagonists improve biological control of fire blight of pear. Phytopathology 101(1):113-123. DOI: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-03-10-0098>.

Taechowisan, T; Lu, C; Shen, Y; Lumyong, S. 2005. Secondary metabolites from endophytic *Streptomyces aureofaciens* CMUAc130 and their antifungal activity. Microbiology 151(5):1691-1695. DOI: <https://doi.org/10.1099/mic.0.27758-0>.

Thilagavathi, R; Saravanakumar, S; Ragupathi, N; Samitappan, R. 2007. A combination of biocontrol agents improves the management of dry root rot (*Macrophomina phaseolina*) in greengram. Phytopathol. Mediterr 46(2):157-167.

Thimon, L; Wallach, J; Michel, G. 1995. Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. FEMS Microbiology Letters 128(2):101-106.

- Villamil, E; Blanco, J; Viteri, E. 2012. Evaluación *in vitro* de microorganismos nativos por su antagonismo contra *Moniliophthora roreri* cif & par en cacao (*Theobroma cacao* L.). Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín 65(1):6305-6315. Disponible en <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/refame/article/view/30756>.
- Vinale, F; Sivasithamparam, K; Ghisalberti, E; Marra, R; Woo, S; Lorito, M. 2008. *Trichoderma*-plant-pathogen interactions. Soil Biology and Biochemistry 40(1):1-10. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2007.07.002>.
- Williamson, S; Guzmán, M; Marin, D; Anas, O; Jin, X; Sutton, T. 2008. Evaluation of *Pseudomonas syringae* strain ESC-11 for biocontrol of crown rot and anthracnose of banana. Biological Control 46(3):279-286. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.05.016>.
- Wisniewski, M; Wilson, C. 1992. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables: recent advances. HortScience 27(2):94-98.
- Xu, W; Wang, H; Lv, Z; Shi, Y; Wang, Z. 2019. Antifungal activity and functional components of cell-free supernatant from *Bacillus amyloliquefaciens* LZN01 inhibit *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum* growth. Biotechnology & Biotechnological Equipment 33(1):1042-1052. DOI: <https://doi.org/10.1080/13102818.2019.1637279>.
- Xu, W; Wang, K; Wang, H; Liu, Z; Shi, Y; Gao, Z; Wang, Z. 2020. Evaluation of the biocontrol potential of *Bacillus* sp. WB against *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. Biological Control 147(1-2):1-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104288>.
- Yáñez, V. 2012. Potencial de la cepa CPA-8 de *Bacillus subtilis* como agente de biocontrol de enfermedades de postcosecha de frutas. Tesis doctoral, Universitat de Lleida. 157 p.
- Yu, G; Sinclair, J; Hartman, G; Bertagnolli, B. 2002. Production of iturin A by *Bacillus amyloliquefaciens* suppressing *Rhizoctonia solani*. Soil Biology and Biochemistry 34(7):955-963. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0038-0717\(02\)00027-5](https://doi.org/10.1016/S0038-0717(02)00027-5).

Zangoei, E; Etebarian, H; Sahebani, N. 2014. Biological control of apple gray mold by mixtures of *Bacillus Subtilis* and yeast isolates. African Journal of Food Science 8:155-163. DOI: <https://doi.org/10.5897/AJFS2013.1043>.

3. CAPÍTULO III. EVALUACIÓN *IN VIVO* DE LA EFICACIA BIOLÓGICA DE MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS EN EL COMBATE DE ENFERMEDADES POSCOSECHA DEL BANANO.

3.1. RESUMEN

La aplicación de agentes de combate biológico (ACB) en la etapa poscosecha de frutas y verduras presenta resultados variables e inconsistentes, influenciados por el efecto de diferentes factores, que puede ser disminuido mediante la suplementación nutricional de los microorganismos. Los objetivos de este capítulo fueron (i) evaluar la eficacia biológica *in vivo* de ACB con alto potencial antagonista contra *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum* y (ii) determinar la eficacia biológica *in vivo* de estos ACB en combinación con activadores metabólicos contra *C. musae* y *F. proliferatum*. Se desarrollaron dos pruebas *in vivo* poscosecha con mini gajos de banano inoculados con los patógenos mencionados, en la primera de ellas biofermentos producidos por tres ACB fueron evaluados individualmente y en combinación con alumbre; mientras que en la segunda, tres productos comerciales (activadores metabólicos) fueron probados individualmente y en combinación con biofermentos producidos por dos ACB. Los resultados indicaron que no se presentó control eficaz por parte de ningún tratamiento biológico, la combinación con alumbre o activadores metabólicos sobre las variables evaluadas (pudrición de la corona, profundidad de la pudrición de la corona, moho en la corona, pudrición del pedúnculo y antracnosis). Por otra parte, la atmósfera modificada y el metabolismo de la fruta no se vio afectada por los tratamientos ya que no se generó diferencias en la variable maduración en ninguno de los dos experimentos. Se concluye que, únicamente el tratamiento comercial (tiabendazol + azoxystrobin) mostró un adecuado control de las enfermedades poscosecha del banano evaluadas.

Palabras clave: biofermentos, *Bacillus*, *Trichoderma*, activadores metabólicos, alumbre.

3.2. ABSTRACT

The application of biological control agents (BCAs) in the postharvest stage of fruits and vegetables presents variable and inconsistent results, influenced by the effect of different factors, which can be reduced by nutritional supplementation of microorganisms. The objectives of this chapter were (i) to evaluate the *in vivo* biological efficacy of BCAs with high antagonistic potential against *Colletotrichum musae* and *Fusarium proliferatum* and (ii) to determine the *in vivo* biological efficacy of these BCAs in combination with metabolic activators against *C. musae* and *F. proliferatum*. Two postharvest *in vivo* tests were carried out with banana mini cluster inoculated with the two pathogens. In the first one, bioferments produced by three ACBs were evaluated individually and in combination with alum; while in the second, three commercial products (metabolic activators) were tested individually and in combination with bioferments of two BCAs. The results indicated that there was no effective control by any biological treatment, the combination with alum or metabolic activators on the variables evaluated (crown rot, crown rot depth, crown mold, peduncle rot and anthracnose). On the other hand, the modified atmosphere and the metabolism of the fruit were not affected by the treatments, because no differences were generated in the maturation variable in the two experiments. It is concluded that only the commercial treatment (thiabendazole + azoxystrobin) showed an adequate control of the banana postharvest diseases evaluated.

Keywords: bioferments, *Bacillus*, *Trichoderma*, metabolic activators, alum.

3.3. INTRODUCCIÓN

La aplicación práctica de agentes de control biológico (ACB) en la etapa poscosecha de diferentes frutas y verduras presenta resultados variables e inconsistentes, influenciados por diferentes factores (Janisiewicz y Korsten 2002). Los ACB están expuestos a diversos tipos de estrés abiótico después de que se aplican a la fruta, tales como temperatura, humedad, pH, atmósferas modificadas y otros factores poscosecha que interactúan en el proceso poscosecha, los cuales pueden influir negativamente en su persistencia y rendimiento (Kredics *et al.* 2003, Marian y Shimizu 2019, Ren *et al.* 2020).

La supervivencia de los microorganismos ante factores abióticos, se correlaciona con la acumulación intracelular de protectores celulares (Potts 1994). Los ACB son capaces de absorber altos niveles de sacáridos y aminoácidos aplicados exógenamente, que se acumulan en el citoplasma y mejoran la tolerancia al estrés abiótico, como lo son las altas y bajas temperaturas (Streeter 2003, Sui *et al.* 2012, Zheng *et al.* 2019). Bajo este escenario, una estrategia para aumentar la tolerancia a elementos que afectan el desempeño de los ACB, es la suplementación nutricional con compuestos como la glucosa, sacarosa, aminoácidos, lo cual mejora su persistencia y aumenta su agresividad contra los patógenos (Marian y Shimizu 2019).

Actualmente, en el mercado existen diversos productos que funcionan como activadores metabólicos en plantas y están indicados para evitar y superar procesos de estrés tanto por factores físicos como químicos. Ante lo anterior, los objetivos de este capítulo fueron (i) evaluar la eficacia biológica *in vivo* de ACB con alto potencial antagonista (ver Capítulo 2) contra *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum* y (ii) determinar la eficacia biológica *in vivo* de estos ACB en combinación con activadores metabólicos contra *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum*.

3.4. MATERIALES Y METODOS

3.4.1. Localización y período de estudio

Esta etapa de la investigación fue realizada en el Laboratorio de Control Biológico y en las cámaras de simulación de transporte, que pertenecen a la Dirección de Investigaciones de la Corporación Bananera Nacional (CORBANA S.A.), ubicados en La Rita, cantón de Pococí, provincia de Limón, Costa Rica. El período experimental se ubicó entre los meses de agosto y diciembre del 2021.

3.4.2. Evaluación *in vivo* de ACB seleccionados para el combate de enfermedades poscosecha del banano.

Se realizaron dos pruebas *in vivo* poscosecha independientes con el fin de evaluar la eficacia biológica de los ACB con alto potencial antagonista. Los mismos fueron seleccionados a partir de los resultados del capítulo II y evaluados contra los principales agentes causales involucrados en las enfermedades poscosecha del banano. Los experimentos se llevaron a cabo mediante la metodología de mini gajos de Marin *et al.* (1996) modificada por CORBANA, la cual permite evaluar con eficiencia una mayor cantidad de tratamientos en poco espacio y a un menor costo. La primera prueba consistió en la evaluación individual de tres ACB seleccionados, solos y en combinación con sulfato de aluminio y amonio (alumbre) al 1 %. En la segunda prueba se evaluaron tres activadores metabólicos de manera individual y en combinación con dos de los ACB con alto potencial antagonista a una temperatura de almacenamiento de 14 °C.

3.4.2.1. Material y diseño experimental

Para las dos pruebas *in vivo* poscosecha, se seleccionó fruta de banano (*Musa* AAA) del subgrupo Cavendish con los requerimientos de primera calidad para exportación. Se utilizó un diseño de Bloques Completos al Azar (DBCA), en donde cada bloque estuvo conformado por una caja de banano de exportación modificada para empacar como máximo doce mini gajos. Como unidad experimental se utilizaron gajos de banano con cuatro dedos y se realizaron diez repeticiones por tratamiento (diez bloques).

a. Experimento 1

Los tratamientos estuvieron conformados por los biofermentos de los tres ACB (PS-83, LVQ-02 y CRB-15) y una combinación entre las dos bacterias (*Bacillus subtilis*, PS-83 + CRB-15) al 10 %. Además, fueron evaluados en combinación con alumbre (10 g/L de mezcla). Se incluyeron tres tratamientos testigos, uno comercial, uno relativo (alumbre al 1 %) y uno absoluto. En el Cuadro 14 se detallan los tratamientos y dosis evaluadas en este experimento.

Cuadro 14. Tratamientos y dosis de los biofermentos y productos evaluados en el primer experimento *in vivo* con los ACB seleccionados con mayor potencial.

Tratamiento	Descripción	Dosis (ml o mg/L)	Alumbre (g/L)
1	PS-83	100	-
2	CRB-15	100	-
3	LVQ-02	100	-
4	PS-83 + CRB-15	50 + 50	-
5	PS-83 + alumbre	100	10
6	CRB-15 + alumbre	100	10
7	LVQ-02 + alumbre	100	10
8	PS-83 + CRB-15 + alumbre	50 + 50	10
9	Testigo relativo (alumbre)	-	10
10	Testigo comercial (azoxystrobin + tiabendazol + alumbre)	150 + 150	10
11	Testigo absoluto	-	-

b. Experimento 2

En este experimento se evaluaron los biofermentos microbianos de los dos mejores ACB seleccionados mediante las pruebas *in vitro* (PS-83 y LVQ-02) a una concentración del 10 %, en combinación con tres activadores metabólicos formulados comercialmente (Foliveex®, Eva 21 y ATP UP®) al 1 %. La composición química de cada producto se presenta en el Anexo 8. Dichos productos también fueron evaluados solos (sin microorganismo) para determinar el aporte individual de estos sobre las enfermedades poscosecha del banano. Además, se incluyeron tres tratamientos testigo: comercial, biológico comercial y absoluto. En el Cuadro 15 se detallan los tratamientos y dosis evaluadas en esta prueba.

Cuadro 15. Tratamientos y dosis de los biofermentos y productos evaluados en el segundo experimento *in vivo* con los ACB seleccionados con mayor potencial.

Tratamiento	Descripción	Dosis ACB (ml/L)	Dosis producto (ml, g o mg/L)
1	Foliveex®	-	10
2	Eva 21	-	10
3	ATP UP®	-	10
4	PS-83 + Foliveex®	100	10
5	LVQ-02 + Foliveex®	100	10
6	PS-83 + Eva 21	100	10
7	LVQ-02 + Eva 21	100	10
8	PS-83 + ATP UP®	100	10
9	LVQ-02 + ATP UP®	100	10
10	Testigo comercial (azoxystrobin + tiabendazol + alumbre)	-	150 + 150 + 10
11	Testigo biológico (Bio-Save® 10 LP)	-	4
12	Testigo absoluto	-	-

3.4.2.2. Preparación del inóculo

El inóculo se preparó a partir de cultivos monoconidiales de *C. musae* y *F. proliferatum* con 8 días de incubación en oscuridad a 27 ± 1 °C, con los cuales se realizó una suspensión de conidios en agua estéril más Tween® 20 al 0,25 %. Seguidamente, se efectuó un conteo para determinar la concentración de conidios con la ayuda de un hematocitómetro (Hausser Scientific) y se ajustó la concentración a $2,5 \times 10^3$ conidios/ml de cada patógeno.

3.4.2.3. Preparación de tratamientos

Según los resultados obtenidos en las pruebas de antagonismo *in vitro* del capítulo II, los biofermentos microbianos de los ACB seleccionados se llevaron a cabo en medio de cultivo líquido de fermentación. La biofermentación se realizó a partir de cultivos puros siguiendo la metodología expuesta en el apartado 2.4.5.2.b. Cabe mencionar que de cada tratamiento se prepararon 500 ml de mezcla y fueron preparados el mismo día del montaje de los experimentos.

a. Experimento 1

Los tratamientos que incluyeron únicamente los biofermentos a una concentración del 10 % (v/v) se realizaron diluyendo el biofermento en un erlenmeyer en agitación con 500 ml agua destilada estéril. Las mezclas de los biofermentos con alumbre al 1 % se elaboraron vertiendo y agitando el biofermento en un erlenmeyer con el 50 % del total de agua destilada estéril a preparar. Luego, en otro erlenmeyer con el otro 50 % de agua destilada estéril, se preparó en agitación una solución de alumbre. Finalmente, se agregó despacio la solución de alumbre al recipiente con el biofermento diluido, se agitó por 2 minutos y así obtener una mezcla de biofermento al 10 % (v/v) y alumbre al 1 % (p/v).

b. Experimento 2

Para los tratamientos conformados únicamente por los activadores metabólicos, se realizó una mezcla de estos con 500 ml de agua destilada estéril, a una concentración del 1 % (p/v o v/v). Las mezclas de los biofermentos con los activadores metabólicos se elaboraron vertiendo y agitando el biofermento en un beaker con el 50 % del volumen total de agua destilada estéril a preparar. Luego, en un erlenmeyer con el otro 50 % de agua destilada estéril se preparó, en agitación, una solución del producto (Foliveex[®], Eva 21 o ATP UP[®]) a utilizar. Finalmente, se agregó poco a poco el biofermento diluido al recipiente con el activador metabólico y se agitó por 2 minutos, para así obtener una mezcla de biofermento al 10 % (v/v) y el activador metabólico al 1 % (p/v o v/v) (Figura 29).



Figura 29. Preparación de las mezclas con biofermentos al 10 % y activadores metabólicos al 1 %, utilizadas en la segunda prueba *in vivo* poscosecha.

c. Tratamientos testigo

Debido a la formulación de los fungicidas utilizados para el testigo comercial, se debió seguir un procedimiento especial para evitar la separación de la mezcla. En primer lugar, se disolvió el Bankit® 25 SC en un 45 % del total de agua destilada estéril a preparar, luego se agregó el Mertec® 50 SC, siempre manteniendo la agitación. Posteriormente, se añadió esta mezcla a una solución de alumbre al 1 % previamente preparada en un 55 % del total de agua destilada estéril y se agitó por 2 minutos para homogenizar. El testigo relativo del primer experimento se elaboró agregando 10 g de alumbre en un litro de agua destilada estéril, para el testigo biológico del segundo experimento se utilizó el producto comercial Bio-Save® 10 LP a una dosis de 4 g/l (recomendada por el fabricante) y el testigo absoluto estuvo conformado por solamente agua destilada estéril.

3.4.2.4. Obtención de mini gajos

Los mini gajos se obtuvieron de racimos de banano con 12 semanas de edad (floración-cosecha) provenientes de una finca comercial de banano del Caribe de Costa Rica. Posteriormente, fueron trasladados al Laboratorio de Fitopatología de

CORBANA S.A, donde se procedió con el desmane, lavado y procesamiento según los procedimientos convencionales de una planta de cosecha. A partir de estas manos, se conformaron gajos de cuatro dedos con una porción de corona de aproximadamente 2 cm de largo y se pasaron a un contenedor con agua potable por 15 minutos para la remoción del látex y limpieza final. Finalmente, los mini gajos se dejaron secar y se identificaron con el respectivo número de tratamiento y repetición con un marcador indeleble (Figura 30).



Figura 30. Proceso de obtención de mini gajos para pruebas *in vivo* poscosecha, simulando a pequeña escala el procedimiento convencional de una planta empacadora. **A.** lavado de manos de banano. **B.** conformación de mini gajos de banano. **C.** deslataxado y limpieza final de mini gajos. **D.** Secado e identificación de tratamientos.

3.4.2.5. Aplicación de tratamientos

Previo a la aplicación de los tratamientos, los mini gajos se inocularon con aproximadamente 3 ml (dos aspersiones sobre la corona y una sobre la cáscara de la fruta) de la suspensión de conidios de los hongos patógenos poscosecha y se dejaron secar por un periodo de 2 minutos antes de proceder con la aplicación de los tratamientos. Una vez secos los mini gajos inoculados, se asperjaron con aproximadamente 3 ml del respectivo tratamiento (dos aspersiones sobre la corona y una sobre la cáscara), de forma que la fruta quedara totalmente humedecida por el tratamiento. Finalmente, los mini gajos se dejaron secar por otros 2 minutos antes de ser empacados. La inoculación y aplicación de los tratamientos se realizó con la ayuda de bombas manuales de 500 ml de capacidad total (Figura 31).



Figura 31. Aplicación de tratamientos sobre la corona y cascara de mini gajos de banano (A) y bomba manual de 500 ml de capacidad total para aplicación (B).

3.4.2.6. Manejo poscosecha

Las unidades experimentales fueron empacadas en cajas de cartón modificadas de 18,14 kg, separadas entre sí por bandas de polipropileno que evitan el contacto entre ellas. Luego se cubrieron con una bolsa tipo Banavac® de alta densidad y se

cerró el extremo de éstas. Las cajas fueron debidamente rotuladas y trasladadas a las cámaras de maduración del Centro de Investigaciones La Rita en CORBANA S.A., para simular un viaje transoceánico (Figura 32).

Ambos experimentos se almacenaron durante 19 días a 14 °C. Después de ese tiempo, se indujo la maduración por 6 días mediante el aumento de la temperatura (18 °C) y la liberación controlada de etileno (Madurex®) dentro de la cámara por 24 horas, con la ayuda de un generador catalítico (Catalytic Generator®, Catalytic Generators Inc., Norfolk, VA).



Figura 32. Manejo poscosecha brindado a las pruebas *in vivo* realizadas, simulando el procedimiento de empaque y las condiciones para un envío transoceánico. **A.** empaque de fruta en cajas de cartón modificadas. **B.** rotulado y bolsa tipo Banavac® de alta densidad. **C.** acomodo de unidades experimentales. **D.** cámara de maduración.

3.4.2.7. Evaluación

La evaluación se llevó a cabo seis días después de inducir la maduración y se realizó con respecto a las siguientes variables: pudrición de la corona, profundidad de la pudrición de la corona, moho en la corona, pudrición del pedúnculo, antracnosis y grado de maduración. La cuantificación de las variables pudrición externa de la corona y moho en la corona se hizo mediante escalas, utilizando la siguiente escala de 4 grados:

Grado 0: corona sana.

Grado 1: menos de 25 % de la corona afectada.

Grado 2: de un 25 % hasta un 50 % de la corona afectada.

Grado 3: más de 50 % de la corona afectada.

Para la profundidad de la pudrición de la corona se calculó el porcentaje de daño midiendo la altura de la corona que tenga cada mini gajo y la profundidad de daño que alcanzó la enfermedad (Figura 33). Con respecto a la pudrición del pedúnculo y antracnosis, se contabilizó el número de mini gajos con lesiones de estas dos variables para calcular un porcentaje de daño y posteriormente, el porcentaje de control. La maduración fue evaluada mediante una escala de siete niveles, basada en el cambio de color de la fruta (Figura 34).



Figura 33. Metodología utilizada por CORBANA para el cálculo del porcentaje de pudre de corona en la prueba de mini gajos (Sánchez 2018).

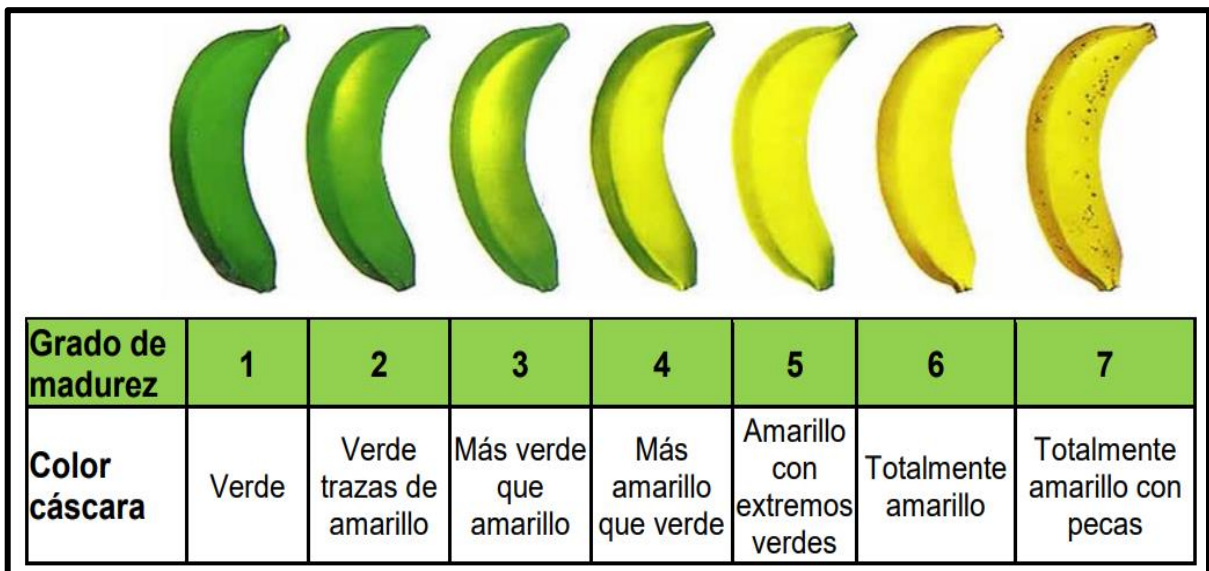


Figura 34. Escala para la evaluación de la maduración de la fruta del banano (Chacón *et al.* 1987).

3.4.3. Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos obtenidos en cada evaluación se realizó por separado, considerando cada experimento como ensayos independientes. En el experimento 1, para las variables profundidad de pudrición de la corona y pudrición del pedúnculo, se analizaron los promedios mediante un análisis de varianza y una prueba de contrastes para comparar los tres tratamientos testigos. En el caso de la variable pudrición del pedúnculo, se excluyó el tratamiento comercial ya que obtuvo un 100 % de control sobre la enfermedad. Además, se realizó un análisis de varianza con arreglo factorial para evaluar la interacción entre tratamientos. Los dos factores fueron: niveles de alumbre (dos) y niveles de biofermentos (cinco, incluyendo el testigo absoluto o relativo). Para las variables pudrición de la corona, moho en la corona y antracnosis, se calculó las frecuencias relativas según los cuatro grados de la escala de afección o los dos porcentajes de control encontrados.

Para el experimento 2, se analizó la variable profundidad de pudrición de la corona mediante la elaboración de promedios y errores estándar a los cuales se les realizó un análisis de varianza y una prueba de contrastes para la comparación de testigos. También, se realizó un análisis de varianza con arreglo factorial para evaluar la interacción entre tratamientos. La misma estuvo conformada por dos factores: niveles de activadores metabólicos (tres) y niveles de biofermentos (tres, incluyendo el testigo absoluto). Las variables pudrición de la corona, moho en la corona, antracnosis y pudrición del pedúnculo fueron analizadas mediante el cálculo de frecuencias relativas según los grados de la escala utilizada o los porcentajes de control encontrados. Los datos obtenidos para la variable maduración en las dos pruebas no se sometieron a un análisis estadístico, ya que todos los tratamientos presentaron grado 4 de madurez. Las dos pruebas *in vivo* poscosecha fueron procesadas con el programa estadístico R en su versión 4.0.2 y la prueba de Tuckey con una significancia del 5 %.

3.5. RESULTADOS

3.5.1. Experimento 1

3.5.1.1. Profundidad de la pudrición de la corona y pudre del pedúnculo

Al realizar el análisis de varianza para comparar los tratamientos testigo de la variable profundidad de la pudrición de la corona (PPC), se encontraron diferencias estadísticas entre ellos ($P < 0,0001$), indicando que el tratamiento comercial difiere estadísticamente de los testigos absoluto ($P < 0,0001$) y relativo ($P < 0,0001$), pero estos dos últimos fueron estadísticamente iguales ($P = 0,0933$). En el caso de la variable pudre del pedúnculo (PP), tampoco existieron diferencias significativas entre testigo el absoluto y relativo ($P = 0,8638$).

El tratamiento comercial (azoxystrobin + tiabendazol) mostró el porcentaje más bajo de daño de pudrición de la corona, con 6,71 % de la corona afectada por la enfermedad. Mientras que, con el uso de los demás tratamientos no se logró ningún tipo de control ($\geq 85,2$ %), al igual que en el testigo absoluto (91,69 %) y relativo (80,69 %) (Figura 35 y Figura 36). Para la variable PP, únicamente la fruta expuesta al tratamiento comercial evidenció tener un control total sobre la enfermedad, inhibiendo su desarrollo en un 100 % (Figura 37) (Anexo 9).

La aplicación combinada de microorganismos y alumbre al 1 % no produjo ningún cambio significativo en las variables PPC y PP, ya que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con o sin la aplicación del alumbre ($P = 0,5208$ y $P = 0,2300$). Tampoco se observaron diferencias significativas entre los biofermentos producidos por los ACB ($P = 0,9729$ y $P = 0,8295$) ni en la interacción de biofermentos con alumbre ($P = 0,6150$ y $P = 0,7991$).

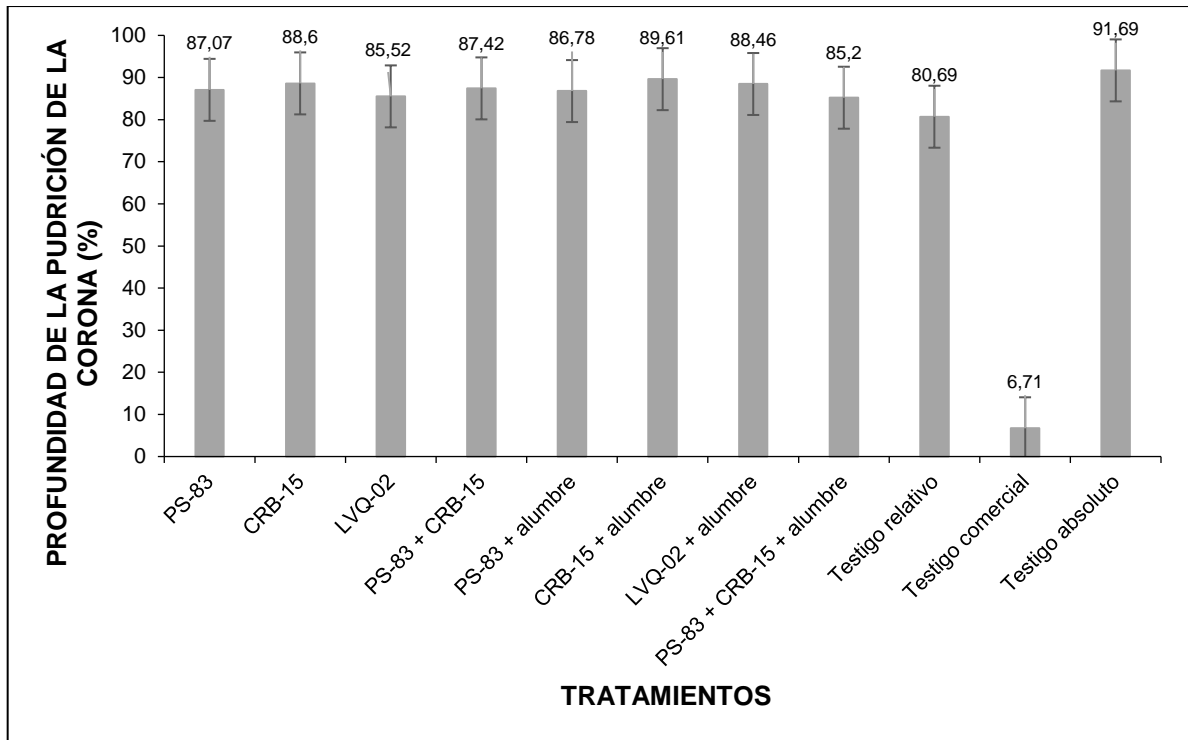


Figura 35. Efecto sobre la variable profundidad de pudrición de la corona encontrado en fruta tratada con biofermentos producidos por tres ACB aplicados individualmente al 10 %, en combinación con alumbre al 1 % y almacenada por 25 días a 14 °C.

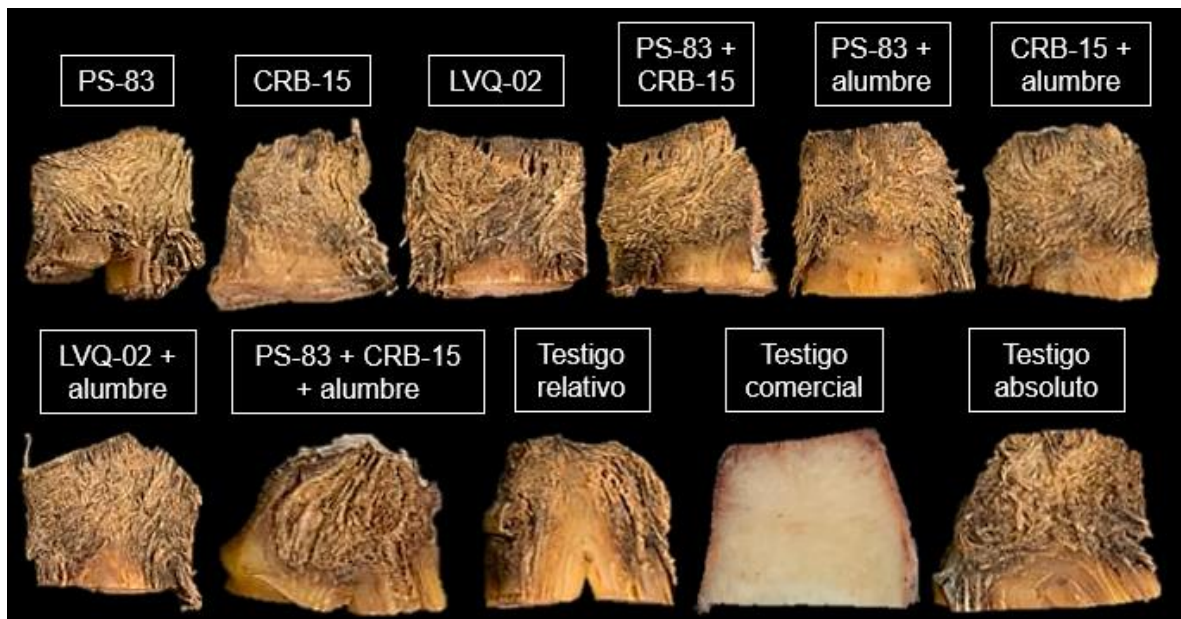


Figura 36. Profundidad de pudrición de la corona observada en fruta tratada con biofermentos producidos por tres ACB aplicados individualmente al 10 %, en combinación con alumbre al 1 % y almacenada por 25 días a 14 °C.

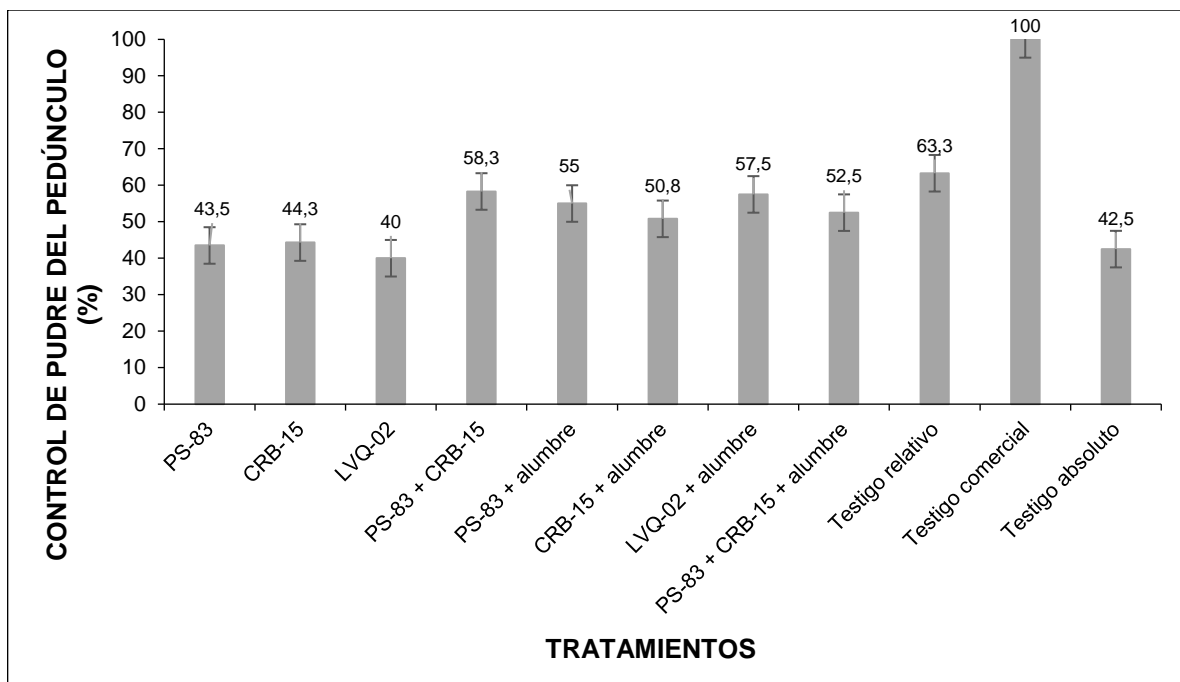


Figura 37. Efecto sobre la variable pudrición del pedúnculo encontrado en fruta tratada con biofermentos producidos por tres ACB aplicados individualmente al 10 %, en combinación con alumbre al 1 % y almacenada por 25 días a 14 °C.

3.5.1.2. Pudrición de la corona y moho en la corona

El testigo comercial (azoxystrobin + tiabendazol) mostró el porcentaje más alto de gajos con grado 0 de infección de pudrición de la corona, encontrándose un 80 % de los frutos en esta condición. Mientras que con el uso de los demás tratamientos, la mayoría de los gajos evaluados se encontraron en el grado más alto de la escala (grado 3) (Anexo 9). Con respecto a la presencia de moho en la corona del banano, no se presentó fruta en grado 0 de la escala. El testigo comercial presentó un 90 % de los gajos en grado 1 (menos de 25 % de la corona afectada) y los demás tratamientos presentaron más de un 90 % de la fruta en el grado 3 de la escala (Cuadro 16) (Anexo 9).

Cuadro 16. Frecuencias relativas de las variables pudre del pedúnculo (PC) y moho en la corona (MC) encontradas en fruta tratada con biofermentos producidos por tres ACB aplicados individualmente al 10 %, en combinación con alumbre al 1 % y almacenada por 25 días a 14 °C.

	Tratamiento	PC (%)				MC (%)			
		Grado de escala				Grado de escala			
		0	1	2	3	0	1	2	3
1	PS-83	0	0	0	100	0	0	0	100
2	CRB-15	0	0	20	80	0	0	0	100
3	LVQ-02	0	0	10	90	0	0	0	100
4	PS-83 + CRB-15	0	0	0	100	0	0	0	100
5	PS-83 + alumbre	0	0	10	90	0	0	10	90
6	CRB-15 + alumbre	0	0	0	100	0	0	0	100
7	LVQ-02 + alumbre	0	0	0	100	0	0	0	100
8	PS-83 + CRB-15 + alumbre	0	0	10	90	0	0	10	90
9	Testigo relativo	0	10	0	90	0	0	10	90
10	Testigo comercial	80	20	0	0	0	90	10	0
11	Testigo absoluto	0	0	0	100	0	0	0	100

*Los valores corresponden al porcentaje de gajos dentro de cada una de las escalas asignadas a cada una de las variables (n=10). **Escala de evaluación: grado 0: corona sana; grado 1: menos de 25 % de la corona afectada; grado 2: de un 25 % hasta un 50 % de la corona afectada; grado 3: más de 50 % de la corona afectada.

3.5.1.3. Antracnosis y maduración

En cuanto a la variable antracnosis, en el Cuadro 17, se muestran las frecuencias relativas de todos los tratamientos en donde la mayoría de ellos mostró 100 % de control sobre la enfermedad, inclusive el testigo absoluto que presentó 80 % de los gajos evaluados sin síntomas de antracnosis (Anexo 9). La maduración no se vio alterada por ninguno de los tratamientos y todos los mini gajos se encontraron en grado 4 de madurez (más amarillo que verde) (Anexo 9).

Cuadro 17. Frecuencias relativas de la variable antracnosis encontradas en fruta tratada con biofermentos producidos por tres ACB aplicados individualmente al 10 %, en combinación con alumbre al 1 % y almacenada por 25 días a 14 °C.

	Tratamiento	Control (%)	
		75	100
1	PS-83	10	90
2	CRB-15	20	80
3	LVQ-02	10	90
4	PS-83 + CRB-15	10	90
5	PS-83 + alumbre	10	90
6	CRB-15 + alumbre	10	90
7	LVQ-02 + alumbre	10	90
8	PS-83 + CRB-15 + alumbre	0	100
9	Testigo relativo	0	100
10	Testigo comercial	0	100
11	Testigo absoluto	20	80

*Los valores corresponden al porcentaje de gajos dentro del 75 o 100 % de control obtenido para la variable antracnosis (n=10).

3.5.2. Experimento 2

3.5.2.1. Profundidad de la pudrición de la corona

Los tratamientos testigos evaluados presentaron diferencias estadísticas entre sí ($P < 0,0001$). El tratamiento comercial difirió estadísticamente de los testigos absoluto ($P < 0,0001$) y biológico ($P < 0,0001$), pero estos dos últimos fueron estadísticamente iguales ($P = 0,5423$). La aplicación de activadores metabólicos para mejorar la tolerancia al estrés abiótico y aumentar la eficacia biológica a una temperatura de 14 °C no produjo las mejoras esperadas, ya que no hubo diferencias significativas entre los tratamientos con o sin la aplicación de los productos ($P = 0,7484$). Tampoco se observaron diferencias significativas entre los biofermentos ($P = 0,3996$) ni en la interacción de biofermentos con activadores metabólicos ($P = 0,1768$). El tratamiento comercial mostró el porcentaje más bajo de daño en la corona (4,31 %), mientras que los demás tratamientos mostraron un daño similar al testigo absoluto y biológico comercial; a excepción del producto Foliveex® que ejerció cierto control sobre la enfermedad (Figura 38 y Figura 39).

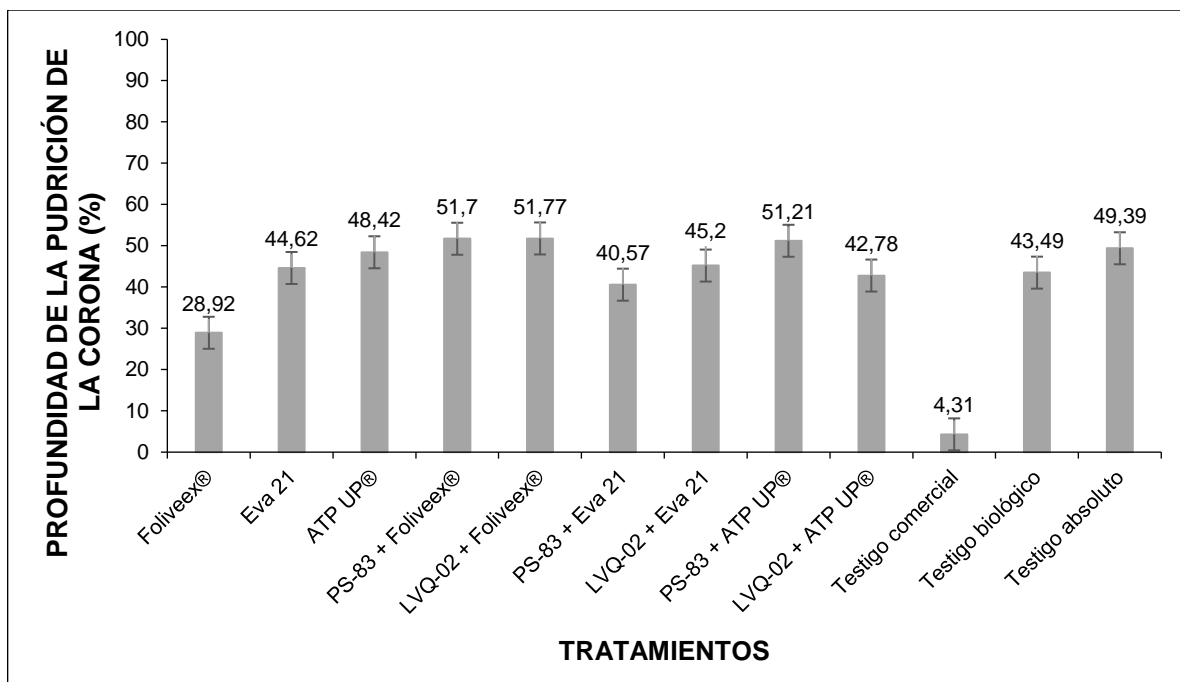


Figura 38. Efecto sobre la variable profundidad de pudrición de la corona encontrado en fruta tratada con tres activadores metabólicos aplicados individualmente al 1 %, en combinación con dos biofermentos microbianos al 10 % y almacenada por 25 días a 14 °C.

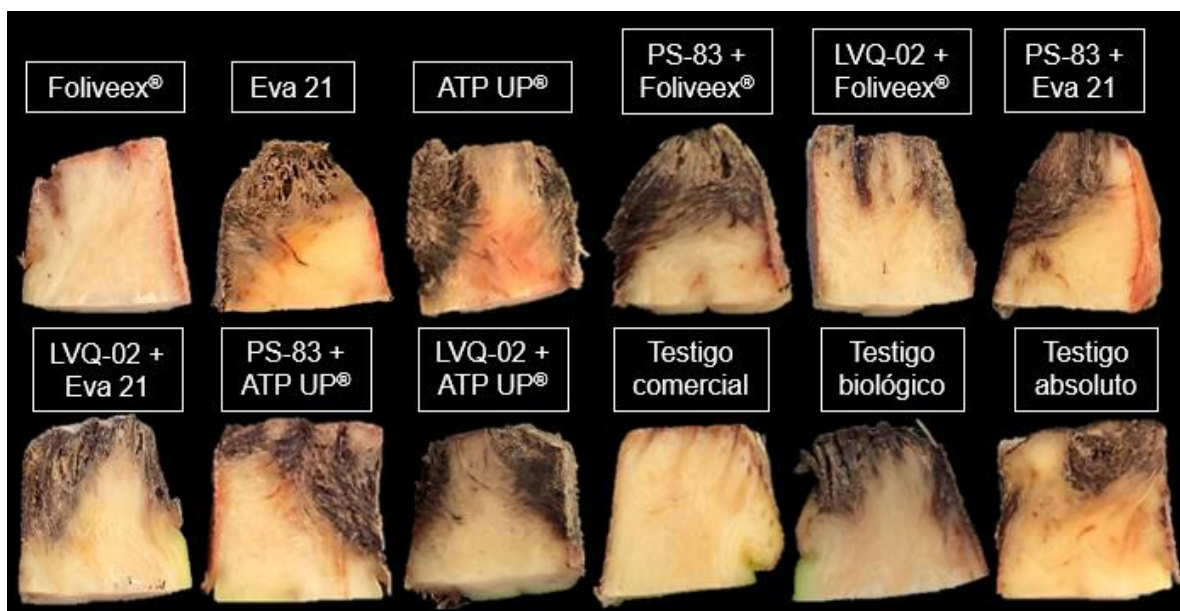


Figura 39. Profundidad de pudrición de la corona observada en fruta tratada con tres activadores metabólicos aplicados individualmente al 1 %, en combinación con dos biofermentos microbianos al 10 % y almacenada por 25 días a 14 °C.

3.5.2.2. Pudrición de la corona y moho en la corona

En la evaluación de la pudrición de la corona, se aprecia que el tratamiento que mayor número de mini gajos sanos presentó fue el testigo comercial, contabilizándose un 80 % de la fruta en esta condición. Solo los tratamientos Foliveex®, PS-83 + Eva 21 y el testigo biológico comercial, presentaron un 10, 20 y 10 % de gajos en grado 0 de la escala, respectivamente. Los demás tratamientos no mostraron gajos con grado 0, todos los gajos evaluados presentaron grados entre 1 y 3 de la escala, al igual que el testigo absoluto (Cuadro 18) (Anexo 10).

Con respecto a la variable moho en la corona, ningún tratamiento exhibió mini gajos de banano con la corona completamente sana (grado 0). El testigo comercial fue el que presentó el mayor porcentaje de gajos con menos afección, siendo un 70 % de la fruta con menos de 25 % de la corona afectada. El resto de los tratamientos presentó un 50 % o más de mini gajos con más de la mitad de corona afectada por la enfermedad (grado 3), siendo el tratamiento LVQ-02 + Foliveex® el más infectado (Cuadro 18) (Anexo 10).

Cuadro 18. Frecuencias relativas de las variables pudre de la corona (PC) y moho en la corona (MC) encontradas en fruta tratada con tres activadores metabólicos aplicados individualmente al 1 %, en combinación con dos biofermentos al 10 % y almacenada por 25 días a 14 °C.

	Tratamiento	PC (%)				MC (%)			
		Grado de escala				Grado de escala			
		0	1	2	3	0	1	2	3
1	Foliveex®	10	40	50	0	0	40	60	
2	Eva 21	0	40	30	30	0	10	10	80
3	ATP UP®	0	40	30	30	0	20	10	70
4	PS-83 + Foliveex®	0	50	10	40	0	10	10	80
5	LVQ-02 + Foliveex®	0	50	40	10	0	10	0	90
6	PS-83 + Eva 21	20	20	40	20	0	20	30	50
7	LVQ-02 + Eva 21	0	20	40	40	0	0	30	70
8	PS-83 + ATP UP®	0	60	10	30	0	0	30	70
9	LVQ-02 + ATP UP®	0	60	10	30	0	20	30	50
10	Testigo comercial	80	20	0	0	0	70	10	20
11	Testigo biológico	10	30	30	30	0	0	30	70
12	Testigo absoluto	0	50	10	40	0	20	10	70

*Los valores corresponden al porcentaje de gajos dentro de cada una de las escalas asignadas a cada una de las variables (n=10). **Escala de evaluación: grado 0: corona sana; grado 1: menos de 25 % de la corona afectada; grado 2: de un 25 % hasta un 50 % de la corona afectada; grado 3: más de 50 % de la corona afectada.

3.5.2.3. Antracnosis, pudre del pedúnculo y maduración

En los Cuadro 19 Cuadro 20 se observan las frecuencias relativas para las variables antracnosis y pudre del pedúnculo. Todos los tratamientos para las dos variables presentaron la mayoría de sus mini gajos evaluados con un 100 % control sobre las enfermedades (Anexo 10). Inclusive, el testigo absoluto no mostró ningún gajo de banano afectado por la antracnosis. En el caso de la pudre del pedúnculo, el testigo absoluto mostró un 70 % de gajos sanos. Con respecto a la variable maduración, esta no se vio afectada por ninguno de los tratamientos y toda la fruta se encontró en grado 4 de madurez (más amarillo que verde) (Anexo 10).

Cuadro 19. Frecuencias relativas de la variable antracnosis encontradas en fruta tratada con tres activadores metabólicos aplicados individualmente al 1 %, en combinación con dos biofermentos al 10 % y almacenada por 25 días a 14 °C.

	Tratamiento	Control (%)	
		75	100
1	Foliveex®	0	100
2	Eva 21	0	100
3	ATP UP®	0	100
4	PS-83 + Foliveex®	0	100
5	LVQ-02 + Foliveex®	0	100
6	PS-83 + Eva 21	0	100
7	LVQ-02 + Eva 21	0	100
8	PS-83 + ATP UP®	10	90
9	LVQ-02 + ATP UP®	10	90
10	Testigo comercial	0	100
11	Testigo biológico	0	100
12	Testigo absoluto	0	100

*Los valores corresponden al porcentaje de gajos dentro de los dos porcentajes de control obtenidos para la variable antracnosis (n=10).

Cuadro 20. Frecuencias relativas de la variable pudre del pedúnculo encontradas en fruta tratada con tres activadores metabólicos aplicados individualmente al 1 %, en combinación con dos biofermentos al 10 % y almacenada por 25 días a 14 °C.

	Tratamiento	% de control			
		33,33	66,67	75	100
1	Foliveex®	0	0	0	100
2	Eva 21	0	0	0	100
3	ATP UP®	0	0	0	100
4	PS-83 + Foliveex®	10	0	10	80
5	LVQ-02 + Foliveex®	0	0	30	70
6	PS-83 + Eva 21	0	0	0	100
7	LVQ-02 + Eva 21	0	0	0	100
8	PS-83 + ATP UP®	0	10	0	90
9	LVQ-02 + ATP UP®	0	0	0	100
10	Testigo comercial	0	0	0	100
11	Testigo biológico	0	0	0	100
12	Testigo absoluto	0	0	30	70

*Los valores corresponden al porcentaje de gajos dentro de los cuatro porcentajes de control obtenidos para la variable pudre del pedúnculo (n=10).

3.6. DISCUSIÓN

En los estudios sobre el combate biológico de enfermedades, muchas veces se encuentra que los tratamientos aplicados *in vivo* generan resultados menos satisfactorios con respecto a los encontrados en condiciones *in vitro*. Resultados similares se obtuvieron en la presente investigación; la literatura reporta que esto puede ser debido a una variedad de factores bióticos (complejo de patógenos) y abióticos (condiciones ambientales y factores que interactúan en el proceso) que afectan el desempeño de los ACB (Trueggelmann *et al.* 2017).

Ninguno de los ACB seleccionados para este estudio logró alcanzar el control del daño e incidencia de la pudrición de la corona y moho en la corona que proporcionó el testigo comercial (azoxystrobin y tiabendazol). Además, la mezcla de biofermentos con alumbre no generó diferencias en el control de las enfermedades con respecto a la no adición, lo que indica que el sulfato de amonio y aluminio no fue el factor principal que limitó la bioeficacia *in vivo* de los ACB evaluados. En cuanto a la pudre del pedúnculo, a pesar de que los porcentajes de control fueron entre el 40 y 60 %, comparado con el testigo comercial que alcanzó un control del 100 %, se evidencia aún más el reducido control de los ACB estudiados, ya que esta pudrición aparece en un estado avanzado de la enfermedad.

Por otra parte, los activadores metabólicos aplicados individualmente o en combinación con los ACB biofermentados no propiciaron ningún control del daño de la pudrición de la corona ni contra el moho en la corona. Es importante mencionar que los niveles más bajos de enfermedad presentados en el segundo experimento, comparado con el primero, no son atribuibles a algún control biológico, pues estos no presentaron mayores diferencias porcentuales con respecto al testigo absoluto. Adicionalmente, el alto control encontrado en todos los tratamientos para la variable pudrición del pedúnculo, indica que el estado de la pudrición no fue avanzado; atribuyéndole este comportamiento a algún posible problema con la inoculación de los patógenos.

Con respecto a la antracnosis, los resultados encontrados en los dos experimentos no permiten asegurar un control biológico efectivo sobre la enfermedad, dado que

el mecanismo principal de *Colletotrichum musae* para causar infección es la colonización de heridas en la fruta (Souza-Pollo y Goes 2020) y los gajos de banano con presencia de antracnosis, presentaron lesiones las cuales se observaron como daños mecánicos ocasionados durante el empaque de la fruta. Es así como se demuestra que en las lesiones colonizadas por el patógeno, no hubo un combate eficaz por parte del antagonista contra los patógenos. Por otro lado, la variable maduración no se vio afectada por los tratamientos en ninguno de los dos experimentos, indicando que la atmósfera modificada y el metabolismo del fruto no sufrió cambios.

El resultado de no haber obtenido un mayor control de enfermedades poscosecha con la utilización de ACB en los dos experimentos puede estar influenciado por dos factores principales: la temperatura y la capacidad de colonizar la superficie de la corona. La prueba de crecimiento *in vitro* a 14 °C del capítulo 2, evidenció que el crecimiento de los microorganismos se ve limitado a esa temperatura y por ende, su bioeficacia también será afectada. En condiciones *in vivo*, Williamson *et al.* (2008) encontraron que la cepa ESC-11 de *Pseudomonas syringae* por sí sola no es efectiva en controlar la pudrición de la corona y la antracnosis a 13-14 °C. Además, la capacidad del antagonista para colonizar la superficie de la corona es igualmente importante. Alwindia y Natsuaki (2008, 2009) encontraron que el uso de antagonistas “nativos”, como *B. amyloliquefaciens* y *T. harzianum* aislados del fruto de banano, presentaron una mejor capacidad de crecer sobre la corona y por ende un mejor biocontrol de la pudrición de la corona. Por lo que, si se utilizan microorganismos mesófilos y con poca capacidad de colonizar la superficie de la corona, la eficacia de los ACB se verá afectada.

Otro factor que puede influir en los altos niveles de daño en la corona observados, es la posible capacidad de que algún antagonista genere pudrición en la herida de las frutas. Este comportamiento ha sido descrito por Adebisin *et al.* (2009), quienes encontraron que cinco cepas de *T. asperellum* eran capaces de generar pudriciones mayores a las de *C. musae* y *F. oxysporum* cuando se inocularon individualmente en frutos de banano. Recientemente, Yang *et al.* (2021) aislaron e identificaron una

cepa de *T. asperellum* que inhibía eficazmente el crecimiento *in vitro* de patógenos comunes del camote (*Fusarium solani* y *Rhizopus nigricans*) pero que también era el agente causal de la enfermedad del moho verde en camote, manzanas y peras.

Además, Johanson y Blázquez (1992) recuperaron de coronas enfermas de banano provenientes de islas del Caribe distintas bacterias como *Erwinia herbicola*, *Pseudomonas* spp., *Bacillus* spp., *Enterobacter* spp. y algunas levaduras, considerándolas como saprófitas y otorgándoles poca importancia en el desarrollo de la podredumbre de la corona, con excepción del género *Bacillus* spp., al cual consideran que podría estar involucrado como un organismo secundario en la afectación de los tejidos. De manera que, es importante considerar una posible patogenicidad de los microorganismos antes de ser evaluados como potenciales ACB.

Ante esto, algunos estudios indican que el uso de bacterias, levaduras y hongos aislados de bajas temperaturas o adaptados a estas, son capaces de generar un alto control de enfermedades poscosecha en cultivos que se almacenan a bajas temperaturas como manzana, durazno y pera (Vero et al. 2013, Fenice 2016, Wallace et al. 2017). El aislamiento y selección de microorganismos psicrófilos o psicrotolerantes surge como una alternativa para que el control biológico de enfermedades poscosecha del banano obtenga mejores resultados (Torracchi et al. 2020). Esto disminuye el riesgo de que las enzimas sufran cambios a bajas temperaturas, como puede suceder con las producidas por microorganismos mesófilos, causando que su actividad y reacciones químicas se reduzcan al caer la temperatura (Pankaj et al. 2010). Sin embargo, en términos de bioseguridad, el perfil toxicológico de un microorganismo y sus metabolitos secundarios debe ser estudiado antes de ser utilizado como ACB en poscosecha, ya que se han identificado algunos casos donde bacterias (*Bacillus cereus*) presentan un riesgo para la salud humana (Janisiewicz y Korsten 2002, Young-Ji et al. 2016).

3.7. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este estudio permiten formular las siguientes conclusiones:

1. En los dos experimentos poscosecha, los ACB seleccionados no mostraron eficacia biológica para ninguna de las variables en estudio.
2. Agregar alumbre a las mezclas de ACB biofermentados, no causó diferencias en el control de enfermedades poscosecha del banano.
3. La utilización de tres productos formulados con activadores metabólicos no mejoró la eficacia biológica poscosecha de los ACB seleccionados.
4. Únicamente el tratamiento comercial (tiabendazol + azoxystrobin) mostró un adecuado control de las enfermedades poscosecha del banano evaluadas.
5. Para la variable antracnosis en ambos experimentos, los gajos con presencia de la enfermedad se asociaron con daños mecánicos colonizados por el patógeno y en donde no hubo evidencia de combate biológico de la enfermedad.
6. La atmósfera modificada y el metabolismo de la fruta no se vio afectada por los tratamientos ya que no se generó diferencias en la variable maduración en ninguno de los dos experimentos.

3.8. RECOMENDACIONES

Con base en los resultados obtenidos se recomienda lo siguiente:

1. Para el combate biológico de enfermedades poscosecha del banano, es importante incursionar en el aislamiento y la selección de microorganismos antagonistas que crezcan y logren ejercer su capacidad antagónica bajo una temperatura de 14 °C.
2. Evaluar *in vivo* el comportamiento y antagonismo de extractos crudos con alto potencial producidos mediante un proceso de fermentación optimizado contra enfermedades poscosecha del banano.
3. Elaborar pruebas que determinen la capacidad de un posible agente de combate biológico (ACB) para colonizar el sustrato de la corona y la cáscara del banano.
4. Realizar pruebas de patogenicidad a los ACB seleccionados con mayor potencial para evaluaciones *in vivo* poscosecha, para descartar su posible capacidad de generar pudrición en la corona.

3.9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adebesin, A; Odebode, C; Ayodele, A. 2009. Control of postharvest rots of banana fruits by conidia and culture filtrates of *Trichoderma asperellum*. Journal of Plant Protection Research 49(3):302-308. DOI: <https://doi.org/10.2478/v10045-009-00496>.

Alvindia, D; Natsuaki, K. 2008. Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana fruit surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. Crop Protection 27(8):1200-1207. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.02.007>.

Alvindia, D; Natsuaki, K. 2009. Biocontrol activities of *Bacillus amyloliquefaciens* DGA14 isolated from banana fruit surface against banana crown rot-causing pathogens. Crop Protection 28(3):236-242. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2008.10.011>.

Chacón, S; Víquez, F; Chacón, G. 1987. Escala de maduración de banano: caracterización fisicoquímica según grado de madurez. Centro de Investigaciones en Tecnología de Alimentos (CIA), Convenio Cooperativo Ministerio de Agricultura y Ganadería. 1p.

Fenice, M. 2016. The psychrotolerant Antarctic fungus *Lecanicillium muscarium* CCFEE 5003: a powerful producer of cold-tolerant chitinolytic enzymes. Molecules 21(4):1-13. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules21040447>.

Janisiewicz, W; Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. Annual Review of Phytopathology 40(24):411-441. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.40.120401.130158>.

Johanson, A; Blazquez, B. 1992. Fungi associated with banana crown rot on field-packed fruit from the Windward Islands and assessment of their sensitivity to the fungicides thiabendazole, prochloraz and imazalil. Crop Protection 11(1):79-83. DOI: [https://doi.org/10.1016/0261-2194\(92\)90084-I](https://doi.org/10.1016/0261-2194(92)90084-I).

Kredics, L; Antal, Z; Manczinger, L; Szekeres, A; Kevei, F; Nagy, E. 2003. Influence of environmental parameters on *Trichoderma* strains with biocontrol potential. *Food Technology and Biotechnology* 41(1):37-42.

Marin, D; Sutton, T; Blankenship, S; Swallow, W. 1996. Pathogenicity of fungi associated with crown rot of bananas in Latin America on Grande Naine and disease-resistant hybrid bananas. vol.80. p. 525-528 DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-80-0525>.

Marian, M; Shimizu, M. 2019. Improving performance of microbial biocontrol agents against plant diseases. *Journal of General Plant Pathology* 85(5):329-336. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10327-019-00866-6>.

Marin, D; Sutton, T; Blankenship, S; Swallow, W. 1996. Pathogenicity of fungi associated with crown rot of bananas in Latin America on Grande Naine and disease-resistant hybrid bananas. vol.80. p. 525-528 DOI: <https://doi.org/10.1094/PD-80-0525>.

Pankaj, M; Piyush, J; Shekhar, B; Jaideep, B; Govindan, S. 2010. Cold-Tolerant Agriculturally Important Microorganisms. In *Plant Growth and Health Promoting Bacteria*, p. 274-290.

Potts, M. 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiological Reviews* 58(4):755-805. DOI: <https://doi.org/10.1128/membr.58.4.755-805.1994>.

Ren, X; Zhang, Q; Zhang, W; Mao, J; Li, P. 2020. Control of aflatoxigenic molds by antagonistic microorganisms: inhibitory behaviors, bioactive compounds, related mechanisms, and influencing factors. *Toxins* 12(24):1-21.

Sánchez, M. 2018. Actividad fungicida de extractos metanólicos de hojas de *Musa* sobre hongos causantes de enfermedades poscosecha en banano. Tesis de maestría, Tecnológico de Costa Rica. 68 p.

Souza-Pollo, A; Goes, A. 2020. Banana pathology and diseases. Handbook of banana production, postharvest science, processing technology, and nutrition 1989:45-59. DOI: <https://doi.org/10.1002/9781119528265.ch3>.

Streeter, J. 2003. Effect of trehalose on survival of *Bradyrhizobium japonicum* during desiccation. Journal of Applied Microbiology 95(3):484-491. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02017.x>.

Sui, Y; Liu, J; Wisniewski, M; Droby, S; Norelli, J; Hershkovitz, V. 2012. Pretreatment of the yeast antagonist, *Candida oleophila*, with glycine betaine increases oxidative stress tolerance in the microenvironment of apple wounds. International Journal of Food Microbiology 157(1):45-51. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.010>.

Torrracchi, J; Morel, M; Tapia-Vázquez, I; Castro-Sowinski, S; Batista-García, R; Yarzabal, L. 2020. Fighting plant pathogens with cold-active microorganisms: biopesticide development and agriculture intensification in cold climates. Applied Microbiology and Biotechnology 104:8243-8256.

Trueggelmann, L; Chavez, S; Escamillan, B; Rizal, F. 2017. Bio-efficacy evaluation of Serenade AS® (QST 713 dried strain of *Bacillus subtilis*) as postharvest treatment in Cavendish banana. Acta Horticulturae 1179(19):125-132. DOI: <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1179.19>.

Vero, S; Garmendia, G; Gonzáles, M; Bentancur, O; Wisniewski, M. 2013. Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management of postharvest diseases of apple (*Malus x domestica*). FEMS Yeast Research 13:189-199. DOI: <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12021>.

Wallace, R; Hirkala, D; Nelson, L. 2017. Postharvest biology and technology postharvest biological control of blue mold of apple by *Pseudomonas fluorescens* during commercial storage and potential modes of action. Postharvest Biology and Technology 113:1-11. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.07.003>.

Williamson, S; Guzmán, M; Marin, D; Anas, O; Jin, X; Sutton, T. 2008. Evaluation of *Pseudomonas syringae* strain ESC-11 for biocontrol of crown rot and anthracnose













of banana. *Biological Control* 46(3):279-286. DOI:
<https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2008.05.016>.

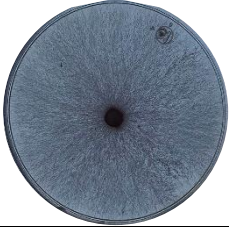
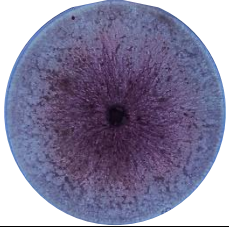

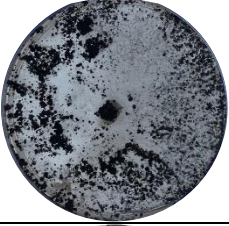


Yang, Y; Fang, B; Feng, S; Wang, Z; Luo, Z; Yao, Z; Zou, H; Huang, L. 2021. Isolation and identification of *Trichoderma Asperellum*, the novel causal agent of green mold disease in sweetpotato. *Plant Disease* 105(9):1711-1718.

Zheng, F; Zhang, W; Sui, Y; Ding, R; Yi, W; Hu, Y; Liu, H; Zhu, C. 2019. Sugar protectants improve the thermotolerance and biocontrol efficacy of the biocontrol yeast, *Candida oleophila*. *Frontiers in Microbiology* 10(FEB):1-8. DOI:
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00187>.

4. ANEXOS

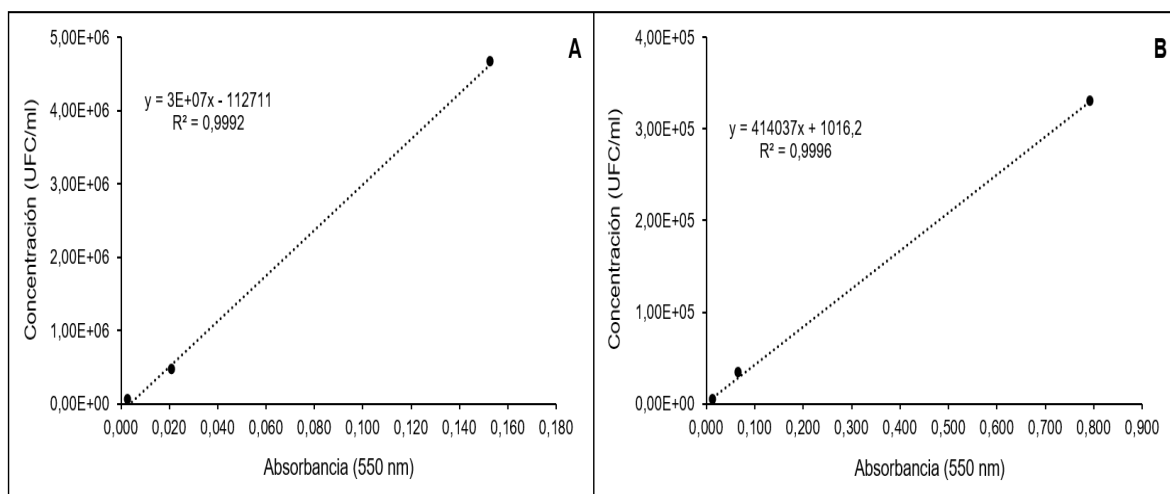
Anexo 1. Resultados de producción de enzimas líticas de los ACB evaluados.

Aislamiento	Hidrolisis de la quitina	Foto	Hidrolisis del glucano	Foto
PS-83	x		✓	
CRB-15	x		✓	
AQ-112	✓		✓	
AQ-113	✓		✓	
AQ-115	✓		✓	
ACT-123	✓		✓	

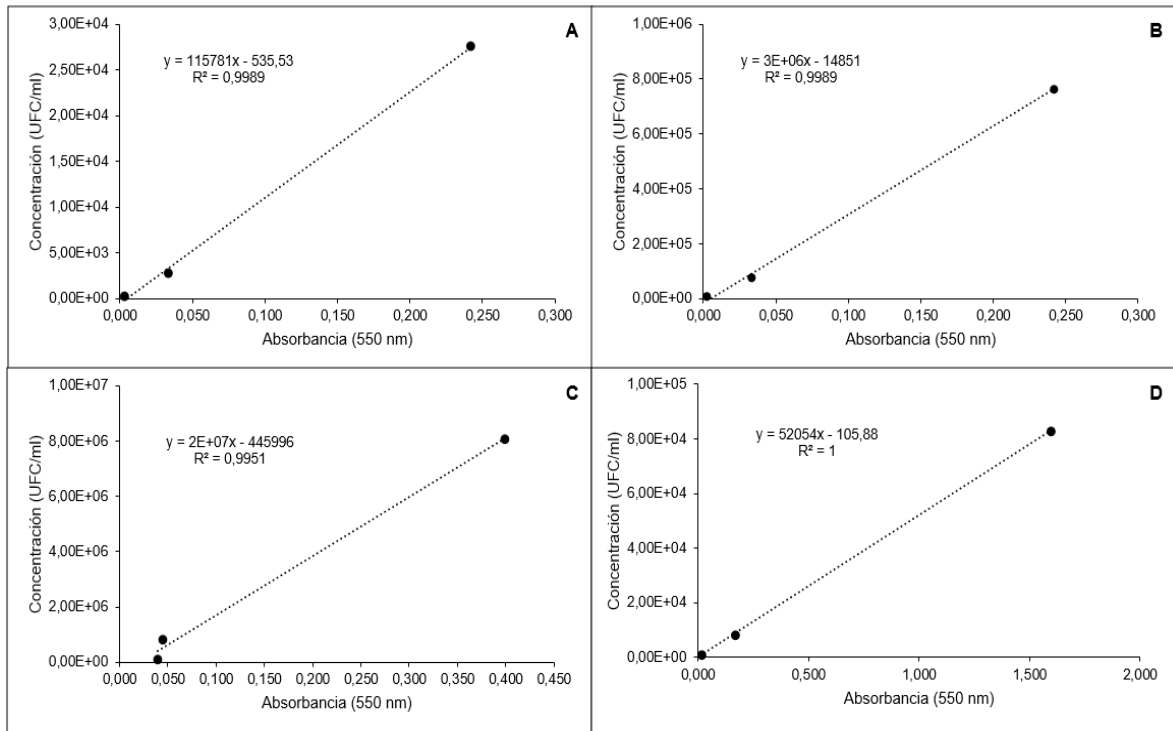
HQ-35	x		x	
LVQ-02	✓		x	
Testigo	-		-	

*✓: compatibles. x: no compatibles.

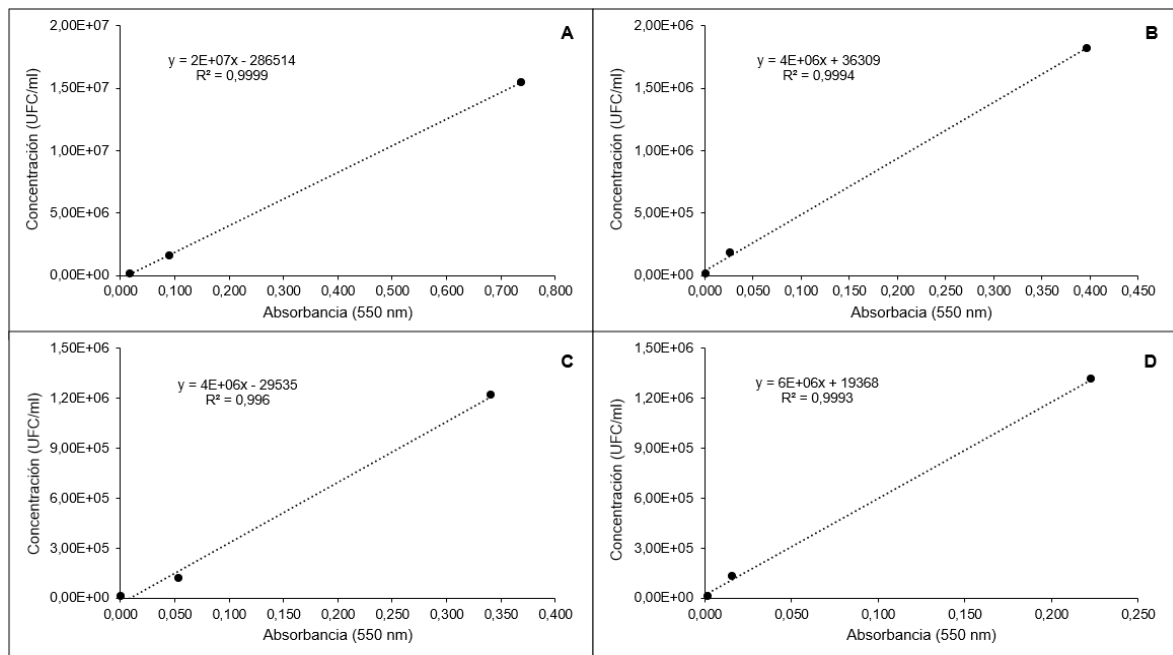
Anexo 2. Curvas de absorbancia para estimar concentración de bacterias. A. PS-83 (*Bacillus subtilis*). B. CRB-15 (*Bacillus subtilis*).



Anexo 3. Curvas de absorbancia para estimar concentración de actinomicetos. **A.** AQ-112 (*Streptomyces* sp.). **B.** AQ-113 (*Streptomyces* sp.). **C.** AQ-115 (*Streptomyces* sp.). **D.** ACT-123 (*Streptomyces* sp.).



Anexo 4. Curvas de absorbancia para estimar concentración de hongos antagonistas y patógenos. **A.** LVQ-02 (*Trichoderma* sp.). **B.** HQ-35 (*Fusarium* sp.). **C.** *Colletotrichum musae*. **D.** *Fusarium proliferatum*.



Anexo 5. Resultados de identificación molecular mediante secuenciación de los agentes de combate biológico y patógenos poscosecha del banano evaluados.

#	ID BM	ID Usuario	Organismo (s) coincidentes RDP	% conf	Organismo (s) coincidentes NCBI	% ident
1	3-430	CRB-15	<i>Bacillus</i> spp.	95	<i>Bacillus subtilis</i>	100
2	3-433	PS-83	<i>Bacillus</i> spp.	95	<i>Bacillus subtilis</i>	100
3	3-432	AQ-112	<i>Streptomyces</i> spp.	95	<i>Streptomyces virginiae</i> <i>Streptomyces manipurensis</i> <i>Streptomyces flavotricini</i> <i>Streptomyces</i> spp.	99
4	3-431	AQ-113	<i>Kitasatospora</i> spp.	95	<i>Streptomyces</i> spp.	100
					<i>Kitasatospora xanthocidica</i>	99
5	3-436	AQ-115	<i>Kitasatospora</i> spp.	95	<i>Streptomyces</i> spp. <i>Kitasatospora xanthocidica</i>	100
6	3-435	ACT-123	<i>Streptomyces</i> spp.	95	<i>Streptomyces scabiei</i> <i>Streptomyces</i> spp.	99
7	3-429	LVQ-02	<i>Trichoderma pubescens</i>	95	<i>Trichoderma asperellum</i> <i>Trichoderma</i> sp. <i>Trichoderma hamatum</i> <i>Trichoderma yunnanense</i>	100
8	3-428	HQ-35	<i>Gibberella fujikuroi</i>	95	<i>Fusarium verticillioides</i> <i>Fusarium sacchari</i> <i>Fusarium</i> sp. <i>Fusarium fujikuroi</i> <i>Fusarium temperatum</i>	100
9	3-426	Fusarium spp poscosecha	<i>Gibberella fujikuroi</i>	95	<i>Fusarium</i> spp.	99
					<i>Fusarium proliferatum</i>	100
10	3-427	C. musae	Glomerellaceae	95	<i>Colletotrichum musae</i>	98

Técnica utilizada: PCR punto final. Secuenciación (Macrogen Inc).

Instrumento o equipo utilizado: GeneAmp® PCR System 9700. Applied Biosystems

ANA MARIA
CONEJO
BARBOZA
(FIRMA)

Digitally signed by
ANA MARIA CONEJO
BARBOZA (FIRMA)
Date: 2021.05.13
10:43:35 -06'00'

Responsable: M.Sc. Ana María Conejo Barboza

Tel: 40 02 46 85

Email: anconejo@corbana.co.cr

Anexo 7. Porcentaje de conidios de *Colletotrichum musae* y *Fusarium proliferatum* obtenidos en la categoría de referencia frente a extractos crudos al 5 % (v/v) de ACB producidos en tres medios de cultivo líquidos. F. medio de fermentación. Y. medio YEGK. L. medio de actividad lítica.

Tratamiento	Medio de cultivo	% de conidios según categoría de referencia (NG + CD)		
		<i>Colletotrichum musae</i>	<i>Fusarium proliferatum</i>	
1	PS-83	F	100	100
2	PS-83	Y	100	100
3	PS-83	L	6	4
7	CRB-15	F	86	100
8	CRB-15	Y	14	0
9	CRB-15	L	0	0
13	AQ-112	F	2	0
14	AQ-112	Y	0	38
15	AQ-112	L	2	0
19	AQ-113	F	2	0
20	AQ-113	Y	8	0
21	AQ-113	L	2	2
25	AQ-115	F	0	0
26	AQ-115	Y	10	4
27	AQ-115	L	10	46
31	ACT-123	F	2	4
32	ACT-123	Y	96	100
33	ACT-123	L	0	0
37	LVQ-02	F	0	0
38	LVQ-02	Y	0	0
39	LVQ-02	L	0	0
43	HQ-35	F	0	0
44	HQ-35	Y	0	0
45	HQ-35	L	54	0

*(NG + CD): sumatoria de los conidios no germinados, conidios cortos y conidios distorsionados.

Anexo 8. Productos utilizados como activadores metabólicos en el segundo experimento poscosecha.



COMPOSICIÓN QUÍMICA	P/V
L-aminoácidos libres	13.00%
Proteínas, péptidos y carbohidratos	15.00%
Extracto de algas marinas	25.00%
Polisacáridos	17.00%
Vitaminas, reguladores de pH y diluyentes	30.00%

Presentación: 0,5 litros, 1 litro, 3,5 litros, 5 litros, 9,5 litros, 19 litros y 20 litros.

Everest® es un activador metabólico altamente tecnificado que incrementa la actividad fisiológica global de las plantas y promueve el potencial genético productivo de los cultivos. Everest® está indicado para evitar y superar procesos de estrés tanto por factores de clima adversos, factores bióticos y para estimular los sistemas de defensas naturales de la planta.

Recomendaciones de uso

Preparación de la mezcla:

Cultivos en general, coloque al menos 50% del agua de la mezcla total, agregue Everest®, agite, luego agregue los demás foliares y fitosanitarios y complete con el resto del agua. Banano: Es compatible con la mayoría de los fungicidas protectantes y sistémicos utilizados actualmente en el combate de la Sigatoka Negra, puede usarse en mezclas solo en agua o en emulsiones.

Dosis recomendada:

Aplicación foliar: de 1 a 3 litros por hectárea.

Al suelo: aplique a razón de 2 a 3 litros de producto por hectárea preferiblemente al momento del trasplante, en siembra directa, o inmediatamente después. Se puede repetir la aplicación una semana después. Puede ser aplicado en drench en cualquier etapa del cultivo.

En invernaderos y almácigos: aplique con agua de riego, desde la siembra o emergencia de las plántulas; utilice una dosis de 3 litros por hectárea.

Cultivos en que se usa:

Piña, tomate, papa, chile, remolacha, cebolla, café, crucíferas, chayote, cucurbitáceas, zanahoria, arroz, cítricos, mango, melón, banano, ornamentales, hule, maní y hortalizas en general.



¿QUÉ HACE?

Promueve la recuperación y el restablecimiento del metabolismo en los cultivos sometidos a estrés (calor, sequía, toxicidad, baja luminosidad o baja temperatura, etc.).

¿CÓMO LO HACE?

Los ácidos "ECCA Carboxy" de esta formulación inducen la síntesis de polifenoles, que actúan como solutos compatibles para hidratar la célula y protectores enzimáticos, que en conjunto con la cantidad de fósforo que se incorpora a las moléculas energéticas de ATP, restablecen la actividad metabólica de la planta de manera rápida y prolongada.

CARACTERÍSTICAS

PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS		
pH: 3.0 ± 0.3 a 20 °C	Forma: Líquido	Color: Café
Densidad: 1.36 ± 0.03 g/cm³ a 20 °C	Corrosividad: No corrosivo.	Inflamabilidad: No inflamable.
PROPIEDADES GENERALES		
Almacenamiento: Conservar cerrado en lugar fresco y seco.	Ambiental: No residual, de muy bajo impacto.	Incompatibilidad: No mezclar con agentes oxidantes fuertes.
		Toxicidad: Ligeramente tóxico

BENEFICIOS

- Disminuye pérdidas de rendimiento o calidad ocasionados por factores estresantes bióticos o abióticos.
- Recupera los cultivos después de un estrés por manejo.
- Restablece el vigor del cultivo después del trasplante o de periodos de aletargamiento.
- Previene y corrige desórdenes ocasionados por el deficiente metabolismo del carbono, ejemplo: fiebre de primavera.
- Disminuye el efecto fitotóxico provocado por inadecuadas aplicaciones de agroquímicos.

RECOMENDACIONES DE USO

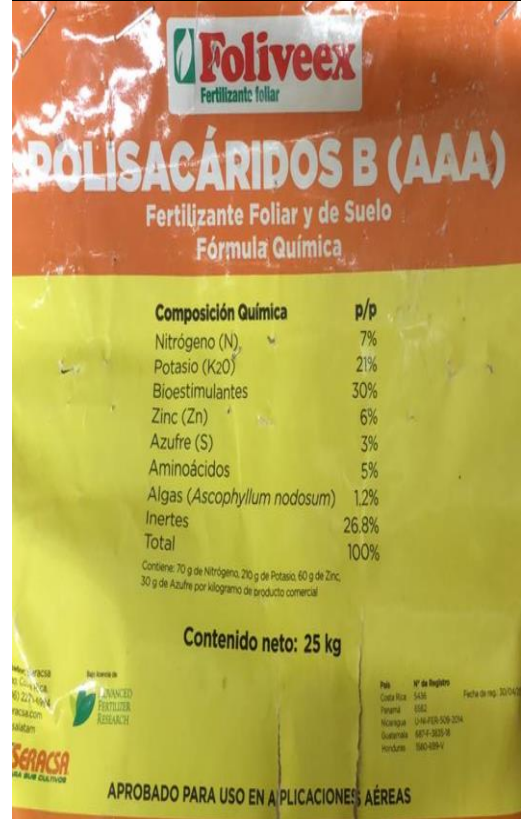
Se aplica por aspersión foliar, mezclado con suficiente agua para lograr una adecuada cobertura del follaje pudiendo ser mezclado con otros fertilizantes, haciendo una prueba previa de compatibilidad.

ESPECIFICACIONES

INGREDIENTE ACTIVO	% p/v
Nitrógeno (N)	7.0
Fósforo expresado (P ₂ O ₅)	25.0
Ácidos Orgánicos	26.0

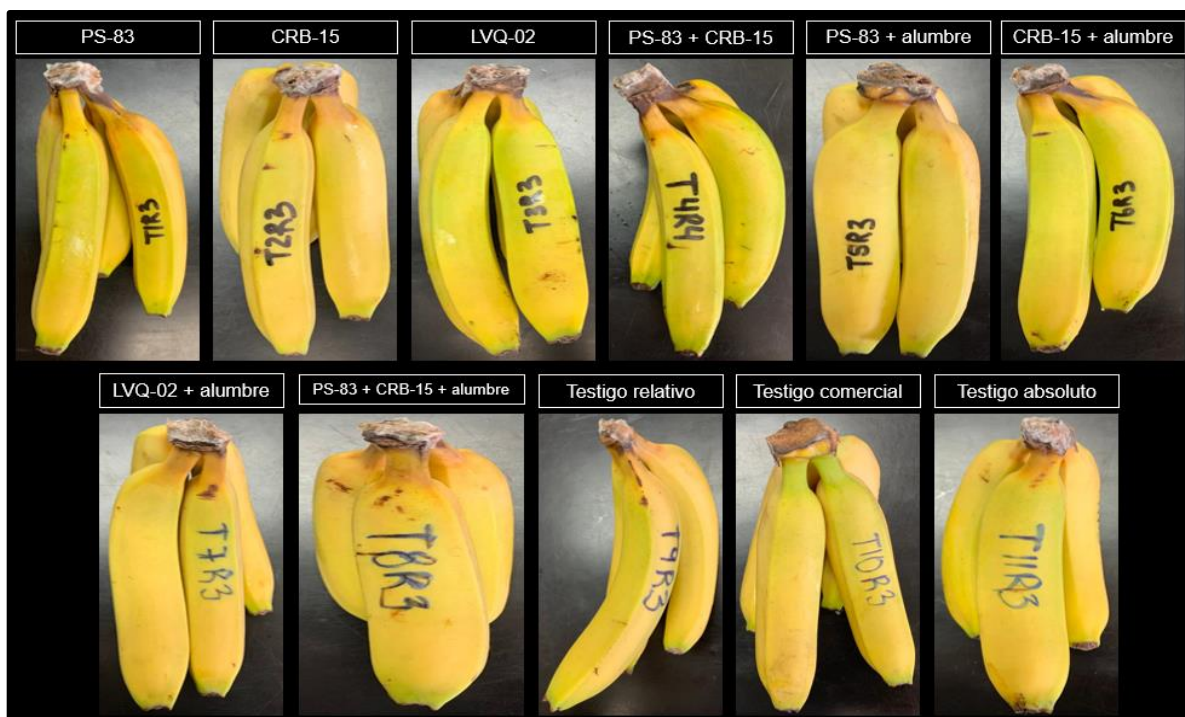
DOSIS

CULTIVO	DOSIS	APLICACIONES/OBSERVACIONES
Arroz (<i>Oryza sativa</i>), Banano (<i>Musa sp.</i>), Caña de azúcar (<i>Saccharum officinarum</i>), Piña (<i>Ananas comosus</i>), Algodón (<i>Gossypium hirsutum</i>), Maíz (<i>Zea mays</i>), Frijol (<i>Phaseolus vulgaris</i>), Palma aceitera (<i>Elaeis guineensis</i>)	0.5 a 3.0 L/ha	En una sola aplicación.
Brassicas: Brócoli, Coliflor, Repollo (<i>Brassica oleracea</i>).	0.5 a 3.0 L/ha	En una sola aplicación.
Solanáceas: Chile (<i>Capiscum annuum</i>), Papa (<i>Solanum tuberosum</i>), Tomate (<i>Lycopersicon esculentum</i>), Berenjena (<i>Solanum melongena</i>).	0.5 a 3.0 L/ha	En una sola aplicación.
Cucurbitáceas: Melón (<i>Cucumis melo</i>), Sandía (<i>Citrullus lanatus</i>), Pepino (<i>Cucumis sativus</i>), Ayote, Zapallo, Calabacín (<i>Cucurbita spp.</i>), Chayote (<i>Sechium edule</i>), Apio (<i>Apium graveolens</i>), Cebolla (<i>Allium cepa</i>), Culantro (<i>Coriandrum sativum</i>), Caliente cayote (<i>Eryngium foetidum</i>), Lechuga (<i>Lactuca sativa</i>), Espárrago (<i>Asparagus officinalis</i>), Zanahoria (<i>Daucus carota</i>), Fresa (<i>Fragaria sp.</i>), Mora (<i>Morus sp.</i>)	0.5 a 3.0 L/ha	En una sola aplicación.
Café (<i>Coffea arabica</i>), Chiricos (<i>Citrus sp.</i>), Mango (<i>Mangifera indica</i>), Macadamia (<i>Macadama integrifolia</i>), Aguacate (<i>Persea americana</i>), Papaya (<i>Carica papaya</i>), Maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>), Rambután (<i>Nephelium lappaceum</i>), Pimienta negra (<i>Piper nigrum</i>).	0.5 a 3.0 L/ha	En una sola aplicación.
Flores, Ornamentales, Helécho hoja corriente (<i>Pteris adiantiformis</i>)	0.5 a 3.0 L/ha	En una sola aplicación.
Rizos y tubérculos Nampi (<i>Colocasia esculenta</i>), Ñame (<i>Dioscorea alata</i>), Malanga (<i>Colocasia sp.</i>), Tiquique (<i>Xanthosoma sp.</i>), Yuca (<i>Manihot esculenta</i>), Kamote (<i>Ipomoea batatas</i>), Jengibre (<i>Zingiber officinale</i>), Cúrcuma (<i>Curcuma longa</i>).	0.5 a 3.0 L/ha	En una sola aplicación.



*Eva21 es una modificación del activador metabólico Everest, con un aumento en la concentración de aminoácidos y bioestimulantes.

Anexo 9. Fruta de la evaluación individual de tres ACB seleccionados y en combinación con sulfato de aluminio y amonio (alumbre) al 1 %, a una temperatura de almacenamiento de 14 °C (experimento 1).



Anexo 10. Fruta de la evaluación de tres activadores metabólicos de manera individual y en combinación con dos ACB seleccionados, a una temperatura de almacenamiento de 14 °C (experimento 2).

