

MICROORGANISMOS ASOCIADOS A LA ENFERMEDAD CONOCIDA COMO PUDRICIÓN SUAVE DEL FRUTO DE BANANO (*Musa* SP.) Y ALTERNATIVAS DE CONTROL MICROBIOLÓGICAS Y QUÍMICAS A NIVEL IN VITRO*

Jose Pablo Vargas-Fernández^{1/**}, Amy Wang-Wong², Miguel Muñoz-Fonseca³

Palabras clave: Pudrición blanda de fruto; *Erwinia* sp.; *Dickeya chrysanthemi*; *Pectobacterium carotovorum*; Antagonismo; Inhibición.

Keywords: Fruit soft rot; *Erwinia* sp.; *Dickeya chrysanthemi*; *Pectobacterium carotovorum*; Antagonism; Inhibition.

Recibido: 05/11/2021

Aceptado: 27/01/2022

RESUMEN

Introducción. La Pudrición Suave del Fruto (PSF) es una enfermedad precosecha que afecta a las musáceas. En renovación de plantaciones, las pérdidas por esta enfermedad alcanzan desde 0,3 hasta 1,2 t.ha⁻¹.año⁻¹ de fruta. **Objetivo.** Describir los síntomas de la PSF, a partir de los agentes asociados para evaluar a nivel in vitro posibles alternativas microbiológicas y químicas para su control. **Materiales y métodos.** La descripción de los síntomas, identificación de agentes asociados y pruebas de patogenicidad se realizaron a partir del análisis de tejido enfermo de frutos de 11 y 12 semanas de edad. El potencial de 13 formulaciones comerciales de cepas puras y mezclas de microorganismos, 4 formulaciones de cobre y una formulación de yodo fueron evaluadas contra los agentes asociados a la PSF, mediante la metodología del doble enfrentamiento. Se midió el diámetro menor y mayor del anillo de inhibición, a las 24, 48 y 120 horas.

ABSTRACT

Identification of banana soft rot associated microorganisms, and in vitro evaluation of microbiological and chemical control alternatives. Introduction. Fruit soft rot, a preharvest disease, affects banana fruit. In annual harvest plantations, its losses reach from 0,3 to 1,2 t.ha⁻¹.year⁻¹ of fruit. **Objective.** Identify associated microorganisms, describe disease symptoms, and evaluate in vitro microbiological and chemical control alternatives. **Materials and methods.** Symptom description, determination of associated microorganisms and pathogenicity tests were analyzed from diseased tissue. Using double confrontation methodology, inhibition potential of thirteen commercial formulations of pure strains and mixtures of microorganisms, four copper and one iodine formulations were evaluated on disease associated agents. Minor and major diameter of inhibition were measured at 24, 48 and 120 hours. Data ANOVA analysis was

* Esta investigación formó parte de la tesis de licenciatura del primer autor.

** Autor para correspondencia. Correo electrónico: jvargas2@freshdelmonte.com

1 Corporación de Desarrollo Agrícola Del Monte, S.A., Depto. de Investigaciones y Asistencia Técnica, Limón, Costa Rica.
 0000-0001-5603-1381.

2 Universidad de Costa Rica, Centro de Investigación en Protección de Cultivos, Instituto de Investigaciones Agrícolas, Costa Rica.
 0000-0002-6149-3035.

3 Standard Fruit Company de Costa Rica, Depto. de Investigación y Desarrollo, Río Frio, Sarapiquí, Costa Rica.
 0000-0002-7086-7959.

Se realizó un análisis de variancia (ANDEVA) con una prueba LSD Fisher y una probabilidad del 5%. **Resultados.** El agente asociado a PSF fue aislado de tejido enfermo e identificado como *Erwinia chrysanthemi* (*Dickeya chrysanthemi*). Debido a que siempre fue aislada del tejido enfermo, su patogenicidad se logró comprobar mediante los postulados de Koch. Se presume una participación conjunta de *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*) debido a que siempre fue aislada del tejido enfermo. El mejor efecto antagonista in vitro sobre *Erwinia chrysanthemi* se obtuvo con los microorganismos *Bacillus pumilus* cepa QST2808 y *Bacillus subtilis* cepa QST713. El mejor efecto in vitro de las fuentes químicas evaluadas se obtuvo con la dosis completa y media dosis de sulfato de cobre al 28,8%, y la dosis más alta de Iodo-Etanol al 2,5%. **Conclusión.** Se logró identificar el agente asociado a la enfermedad, además, se proponen alternativas microbiológicas y químicas con potencial inhibitorio in vitro para considerarse en pruebas de campo.

INTRODUCCIÓN

La Pudrición Suave del Fruto (PSF) en banano (Fruit soft rot), sinónimo de Pudrición Suave del Dedo, Pudre de Dedo y Dedo Podrido, es una enfermedad precosecha que afecta el fruto. En Centroamérica y el Caribe, en particular Costa Rica, Trinidad y Tobago, Honduras, Nicaragua y Panamá (Stover y Simmonds 1987, Guzmán y Wang 1998, Thwaites *et al.* 1999). Fue descrita en Costa Rica, Limón, existen registros desde 1991 aunque se reportó baja incidencia. La misma cobró importancia a partir de 1994, probablemente por la adopción de la desflora en campo y la renovación de plantaciones (Villalta *et al.* 2019). Se reportaron casos severos de incidencia de esta en Matina y Pococí en 1995 y 1996 (Guzmán y Wang 1998).

made using LSD Fisher test. **Results.** Diseased tissue associated agent was identified as *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*). Its pathogenicity was proved by Koch's postulates. It is also presumed that *Erwinia carotovora* (sin. *Pectobacterium carotovorum*) has joint participation in this pathosystem, since it was always isolated from diseased tissue. The best in vitro antagonistic effect was observed with *Bacillus pumilus* strain QST2808 and *Bacillus subtilis* strain QST713. Regarding to chemical alternatives, the best in vitro effect was observed with copper sulphide 28.8% complete dose, followed by its half dose, and Ethabol iodine 30 ml.L⁻¹. **Conclusion.** Disease associated microorganisms were identified, besides, there is proposed microbiological and chemical alternatives with in vitro potential that could be considered in field trials.

Se reporta como una enfermedad entre las que afectan el fruto, resultado final de las operaciones productoras de banano, una vez sometido a altas exigencias de calidad. La PSF constituye una causa importante de rechazo de fruta en las plantas empacadoras por daños desde la producción (Guzmán y Wang 1998). Se ha observado que, en plantaciones comerciales de banano, a partir del cuarto ciclo de producción, la incidencia alcanza entre 0,05 y 0,1%, que representa una pérdida entre 36 y 72 kg de fruta.ha⁻¹.año⁻¹. En los proyectos de renovación de plantaciones, la incidencia va desde 0,1 a 7%, equivalente a 0,3 y 1,2 Ton de fruta.ha⁻¹.año⁻¹. La cantidad de fruta afectada por la enfermedad asciende cuando se suman los frutos afectados indirectamente, como resultado del goteo de los exudados de las pudriciones y por el manejo operativo de las plantas

empacadoras, que preventivamente rechazan fruta adyacente a los que presentan síntomas de la enfermedad por el riesgo de maduración prematura (Villalta *et al.* 2019).

Las pudriciones bacterianas suaves en Musáceas son causadas por especies del género *Erwinia* (Gowen 1995). La PSF es atribuida a *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*) y *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Stover y Simmonds 1987, Choi *et al.* 1988, Samson *et al.* 2005, Snehatharani y Khan 2010). En Costa Rica, antes de 1998, se había investigado esta enfermedad lo requerido, sin embargo, estudios contemporáneos a este trabajo han presentado resultados sobre los agentes causales y algunos factores que participan en el desarrollo de la enfermedad (Guzmán *et al.* 2017, Villalta *et al.* 2019). Debido a que la sintomatología de las enfermedades bacterianas es generalmente similar, se ha afirmado que varios organismos pueden coexistir en una infección de este tipo (Gowen 1995), y en otros casos, estas bacterias afectan también el pseudotallo y tejidos en descomposición de la planta de banano (Ramírez *et al.* 2014).

En relación con las alternativas de control de la enfermedad, las recomendaciones giran alrededor de medidas sanitarias y culturales. Por ejemplo, remover restos de la planta en descomposición, minimizar heridas en los órganos de la planta, desinfección de las herramientas que se utilizan en las labores de calidad preventiva de la fruta como apuntalar, embolsar, desmanar, desdedar, desflorar y el deschire (Agrios 2005, Martínez *et al.* 2000, Guzmán *et al.* 2017), además de la eliminación en campo de frutos que presentan síntomas aparentes, y la suspensión de las prácticas de calidad preventiva en campo para reducir su posible dispersión. La suma de las prácticas de control propuestas no ha logrado, hasta el momento, disminuir la incidencia de la PSF y las pérdidas económicas que genera, por lo que se hace necesario evaluar otras prácticas de control.

La evaluación *in vitro* de productos formulados a base de antagonistas contra la PSF es una alternativa poco estudiada en el país. En Cuba, en áreas afectadas por la pudrición del

pseudotallo causada por *Erwinia* sp; Jiménez y Cordovés (1992), evidenciaron que especies aisladas de la rizosfera de plantas de banano tenían efecto antagonista *in vitro* contra aislamientos de *Erwinia chrysanthemi*. En esta misma línea de trabajo, se ha observado buen efecto antagonista de cepas de *Bacillus subtilis* (Goorani El y Hassanein 2008). También, algunas cepas de *Trichoderma* han sido evaluadas para el control *in vitro* de bacterias y patógenos de suelo que generan pudriciones (Hoyos *et al.* 2008). Observaciones similares fueron hechas por Nagaraj *et al.* (2012) quienes encontraron niveles aceptables de control sobre *Erwinia* con *Bacillus subtilis* y *Pseudomonas fluorescens*.

Adicionalmente, se considera que las alternativas químicas podrían constituir herramientas valiosas en un programa integrado de manejo de la PSF. Dos alternativas químicas con alto potencial, cuyo efecto *in vitro* no ha sido estudiado en nuestro país, son el uso de compuestos cúpricos y desinfectantes a base de yodo. El cobre ha sido descrito como uno de los fungicidas y bactericidas más antiguos. El hidróxido cúprico, oxiclورو cúprico, sulfato cúprico y el óxido cuproso han sido registrados en el control de enfermedades causadas por hongos e infecciones bacterianas (Ordax 2008, Arauz 2011). En Costa Rica, para el control de *Erwinia* sp. en plantaciones de mango, Coto y Wang 1995 obtuvieron buen control de este patógeno a partir del Caldo bordelés (80% Sulfato de Cobre) en aplicaciones foliares. Los productos comerciales formulados con Iodo han sido utilizados para el control de pudriciones vasculares y marchitamiento en banano y plátano, por lo que tiene un alto potencial para el control de la PSF (Gómez *et al.* 2001).

El objetivo general de este trabajo fue determinar los microorganismos asociados a la enfermedad conocida como pudrición suave del fruto de banano (*Musa* sp.). Dos objetivos específicos fueron planteados, en primer lugar, describir los síntomas de la Pudrición Suave del Fruto (PSF) y adicionalmente, determinar alternativas de control microbiológicas y químicas a nivel *in vitro*.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se realizó en el 2016, en Río Frío (Latitud 10° 20' N, Longitud 83° 57' O), del cantón de Sarapiquí. Las pruebas de laboratorio se realizaron en el Laboratorio de Aguas y Ensayos Biológicos de Standard Fruit Company, en esta misma localidad, y en los laboratorios de Fitopatología y Técnicas Moleculares Aplicadas a la Fitoprotección del Centro de Investigaciones en Protección de Cultivos (CIPROC), de la Universidad de Costa Rica, Montes de Oca. Las pruebas in vitro se realizaron en el laboratorio de Microbiología Agrícola del Centro de Investigaciones Agronómicas, de la Universidad de Costa Rica, Montes de Oca, y en el laboratorio de Aguas y Ensayos Biológicos de Standard Fruit Company de Costa Rica S.A. (Dole), Río Frío, Sarapiquí, Heredia.

Identificación de los microorganismos asociados a la PSF

Recolección de la muestra. Se recolectó una muestra de 15 frutos enfermos, con el síntoma típico de la enfermedad en planta empacadora. La muestra estaba compuesta de fruta que presentaba menos del 50% de tejido necrótico. Se descartaron frutos que presentaban ruptura de cáscara para reducir las posibilidades de contaminación por patógenos secundarios.

Procesamiento de la muestra. Los frutos enfermos fueron lavados con agua desionizada estéril y desinfectados con alcohol al 70% durante un minuto y cloro al 1% durante un minuto. Luego, fueron enjuagados 3 veces con agua desionizada estéril para remover restos de cloro y alcohol. Con ayuda de un bisturí esterilizado, se realizó una incisión rectangular en la cáscara, en la zona de avance de la enfermedad, para exponer la pulpa del fruto. Posteriormente, se utilizaron aproximadamente 10 g de pulpa y se maceró en 90 ml de agua desionizada estéril, en una bolsa plástica. Este macerado se incubó durante 24 horas a 26±1°C y bajo condiciones de oscuridad.

Por medio de la técnica de diluciones seriadas, se diluyó el macerado hasta 10⁸. Cada dilución se cultivó en platos Petri, con el medio MacConkey. Finalmente, los platos Petri fueron incubados durante 24 horas a 26±1°C y bajo condiciones de oscuridad. Transcurrido este tiempo, se observó el crecimiento microbiano en cada plato.

Clasificación y purificación del crecimiento microbiano. El crecimiento microbiano fue clasificado de acuerdo con la morfología de la colonia bacteriana, por color, forma, superficie y tipo de borde. Este procedimiento fue llevado a cabo en medio Agar Trypticase de Soya (ATS). Cada morfotipo fue separado y purificado para efectuarle las pruebas de patogenicidad e identificación.

Pruebas de patogenicidad. Este procedimiento se llevó a cabo bajo condiciones controladas de laboratorio, con fruta sana de 11 semanas de edad, proveniente de plantaciones comerciales con baja incidencia de la enfermedad. Los frutos recolectados fueron lavados con agua desionizada estéril y desinfectados con alcohol al 70% durante un minuto y cloro al 1% durante un minuto. Luego, fueron enjuagados 3 veces con agua desionizada estéril para remover restos de cloro y alcohol. Posteriormente, con ayuda de un palillo de madera, previamente esterilizado, se tomó una porción de cada morfotipo bacteriano y se inoculó en la fruta sana introduciéndolo 1 cm. La zona de inoculación fue cubierta con papel Parafilm. En total, se inocularon 10 frutos por cada morfotipo. Diez frutos fueron utilizados como testigos e inoculados con agua desionizada estéril, mediante el mismo procedimiento.

Los frutos inoculados fueron colocados en cámara húmeda a temperatura ambiente. Se realizaron inspecciones, a las 24, 48 y 120 horas después de inoculación, para determinar la aparición de los síntomas característicos de la enfermedad. Posteriormente, para la identificación, se seleccionaron los morfotipos bacterianos que manifestaron los síntomas característicos de la enfermedad.

Identificación de agentes causales de la enfermedad. La identificación de los agentes causales se llevó a cabo a partir de los aislamientos que resultaron positivos en las pruebas de patogenicidad. A estos aislamientos se les realizaron pruebas bioquímicas como la prueba de crecimiento en medio Agar Papa Dextrosa (PDA), rayado en discos de papa, prueba catalasa, prueba oxidasa, prueba TSI y tinción de Gram. Posteriormente, se realizó la identificación de las bacterias según el sistema BIOLOG GEN III y la técnica molecular de secuenciación mediante la Reacción en Cadena de la polimerasa (PCR), a partir de la región 16S del ARN.

El procedimiento para llevar a cabo la identificación mediante PCR, se realizó directamente con muestras de las colonias en el plato de cultivo, en el Laboratorio de Técnicas Moleculares aplicadas a la Fito protección del CIPROC, de la Universidad de Costa Rica (UCR), como se describe a continuación.

Extracción de ácido desoxirribonucleico (ADN). La extracción de ADN se realizó a partir de colonias frescas de las bacterias del plato de cultivo, con el método CTAB (Murray y Thompson 1985). El ADN fue cuantificado mediante un espectrofotómetro Bio Photometer Plus 6132 (Eppendorf) y se llevó a una concentración final de 80 ng.µl⁻¹.

Reacción en Cadena de la Polimerasa y secuenciación del ADN. La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) se realizó con los cebadores específicos para el gen ribosomal 16S: 27F (5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGTTAC-GACTT-3'), descritos por Lane *et al.* 1985, que amplifican la secuencia total del gen.

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 25 µl, que consistían en 15,25 µl de agua desionizada ultra pura, 2,5 µl de Buffer 10X (1X), 2,5 µl de dNTPs (1mM), 1,25 µl de cada cebador (0,5 µM) y 0,25 µl de DreamTaq DNA Polymerase (1U/µl) (Fermentas©). Se utilizó un control negativo que consistía en una reacción sin ADN. La reacción de amplificación se llevó a cabo a partir del siguiente perfil térmico:

pre-desnaturalización inicial a 96°C durante 2 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 96°C durante 1 minuto, anillamiento a 56°C por 1 minuto, extensión a 72°C por 2 minutos, seguidos de una extensión final a 72°C durante 10 minutos.

El producto de PCR, de aproximadamente 1500 pares de bases (pb), se confirmó mediante electroforesis en gel de agarosa (0,8%), comparándolo con un marcador de peso molecular de 100 pb, Gene Ruler de Fermentas. El producto de PCR se digirió con una endonucleasa llamada Exonuclease I (Fermentas). La secuenciación se realizó al producto purificado de PCR a una concentración de 50 ng.µl⁻¹ por la empresa MacroGen Inc; Corea. Se obtuvo secuencias en ambas direcciones para cada muestra generada a partir de ciclos fluorescentes, con un secuenciador modelo 3730XL (Applied Biosystems).

Alineamiento de las secuencias y análisis filogenéticos. La calidad de las secuencias se confirmó con un alineamiento bidireccional y por comparación con los cromatogramas con el programa Bio Edit (Hall 1999), se cortó las terminaciones 5' y 3' de las cadenas para facilitar el alineamiento. Además, se utilizó la herramienta informática Basic Local Alignment Search Tool (Blast) del National Center for Biotechnology Information (NCBI), por sus siglas en inglés, a partir del cual se comparó la secuencia generada frente a las secuencias de la base de datos del banco de genes (Gene Bank).

Descripción de síntomas de la PSF. Se realizaron inspecciones en planta empacadora en racimos en edad de cosecha (11 y 12 semanas) para determinar la presencia de frutos que presentaran diferentes estados de desarrollo de la enfermedad. Posteriormente, estos frutos fueron observados minuciosamente en el laboratorio para determinar las similitudes entre ellos, así como la sintomatología característica de la enfermedad. En campo, racimos de diferentes edades fueron inspeccionadas para detectar posible desarrollo de frutos enfermos en edades tempranas.

Evaluación in vitro de 13 formulaciones comerciales de microorganismos antagonistas sobre *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*), agente asociado a la PSF. Se utilizó la metodología de doble enfrentamiento (Chérif y Benhamou 1990). Cada unidad experimental constó de un plato Petri, con 4 discos de papel filtro, 2 impregnados con el tratamiento y

2 con los controles, el positivo con agua destilada y el negativo con un antibiótico (Gentamicina 1,2 ppm). En total 13 tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento. Los tratamientos fueron seleccionados según el posible potencial antagonista de los microorganismos incluidos en la formulación de los productos ofrecidos en el mercado y de acuerdo con la revisión de literatura (Tabla 1).

Tabla 1. Caracterización microbiológica de las formulaciones comerciales de cepas puras y mezclas de microorganismos evaluados en las pruebas de antagonismo con *Erwinia* sp. La dosis corresponde a la recomendación del fabricante para uso en campo. UFC.ml⁻¹. Unidades formadoras de colonias por mililitro de producto comercial. *Información no disponible debido a que el producto está registrado para uso diferente. **Información confidencial del fabricante.

Tratamiento	Composición (según etiqueta)	Empresa suplidora	UFC.ml ⁻¹	Dosis (según etiqueta)	
T1	Serenade®	<i>Bacillus subtilis</i> (cepa QST 713)	Bayer	1,0 x 10 ¹¹	1 L.ha ⁻¹
T2	Sonata ®	<i>Bacillus pumilus</i> (cepa QST 2808)	Bayer	1,0 x 10 ⁹	1 L.ha ⁻¹
T3	BSLIN®	<i>Bacillus subtilis</i> (cepa mog04)	Laboratorio Dr. Obregón	1,0 x 10 ⁹	14,8 L.ha ⁻¹
T4	Actinel®	<i>Streptomyces griseoviridis</i>	Laboratorio Dr. Obregón	1,0 x 10 ¹⁰	16 L.ha ⁻¹
T5	Biota Max	<i>Trichoderma</i> (<i>T. viridae</i> , <i>T. koningii</i> , <i>T. harzianum</i> , <i>T. polysporum</i>), <i>Bacillus</i> (<i>B. subtilis</i> , <i>B. laterosporus</i> , <i>B. licheniformis</i> , <i>B. megaterium</i> , <i>B. pumilus</i>), <i>Paenibacillus polymyxa</i>	Tecnobac S.A.	<i>Trichoderma</i> 2,5 x 10 ⁹ <i>Bacillus</i> 2,5 x 10 ⁹ <i>P. polymyxa</i> 5 x 10 ⁹	57 g.ha ⁻¹
T6	Environoc 401	<i>Trichoderma</i> sp; <i>Saccharomyces</i> sp; <i>Bacillus</i> sp; <i>Pseudomonas</i> sp; <i>Lactobacillus</i> sp; <i>Yarrowia</i> sp; <i>Rhodopseudomonas</i> sp; <i>Cellulomonas</i> sp.	Biodyne Costa Rica	1 x 10 ⁸	1,6 L.ha ⁻¹
T7	Magic Green	<i>Streptomyces</i> sp; <i>Azospirillum</i> sp; <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Lactobacillus</i> sp; <i>Nitrosomonas multiformis</i> , <i>Streptococcus</i> sp; <i>Aspergillus penicilloides</i> , <i>Mucor</i> sp; <i>Trichoderma</i> spp.	Granja Avícola Santa Marta	-*	30 L.ha ⁻¹
T8	Bactericida Horizon	<i>Penicillium</i> sp.	Horizon Bioagro	2,5 x 10 ¹²	2 L.ha ⁻¹
T9	Ultrazyme	<i>Lactobacillus</i> sp.	Cypher	3,6 x 10 ⁷	3 kg.ha ⁻¹
T10	Terrabiosa	Bacterias varias especies	Agrícola Piscis	5 x 10 ⁹	50 L.ha ⁻¹
T11	Ferbiol	Bacterias lácticas Levaduras Actinomicetos	Agrícola Piscis	9,5 x 10 ⁶ 6,1 x 10 ⁶ 2,0 x 10 ⁶	10 L.ha ⁻¹
T12	Fruit wash	Microorganismos benéficos	Biowish	-*	2 kg.ha ⁻¹
T13	Environoc 501	<i>Bacillus</i> sp; <i>Candida</i> spp; <i>Lactobacillus</i> sp; <i>Pseudomonas</i> sp.; <i>Sacchromyces</i> sp; <i>Streptomyces</i> sp.	Biodyne Costa Rica	-**	1,6 L.ha ⁻¹

Los productos comerciales formulados a base de microorganismos se enfrentaron a *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*). Se emplearon 10 repeticiones por tratamiento. El enfrentamiento se llevó a cabo en platos Petri en medio de cultivo Agar Nutritivo (AN) para 10 productos y Agar Tripticosa de Soya (ATS) para los 2 restantes. En cada plato se rayó y distribuyó, en 4 direcciones, con hisopos estériles, una suspensión igual al estándar Mc Farland #0,5, que equivale a $1,5 \times 10^8$ UFC.ml⁻¹ de *E. chrysanthemi*. Posteriormente, se preparó un volumen de 0,1 L de la dosis proporcionada en la etiqueta del tratamiento, del cual se tomó una alícuota de 7 mL y se colocó en los discos de papel filtro. Los platos Petri se colocaron en condiciones de oscuridad, en una incubadora (Shelton Sm 16) a $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Se midió el diámetro menor y mayor del anillo de inhibición de cada tratamiento, a las 24,

48 y 120 horas. El análisis de los datos se realizó mediante un análisis de variancia (ANDEVA) con una prueba LSD Fisher y una probabilidad del 5%, con el paquete estadístico InfoStat.

Evaluación in vitro de formulaciones de Iodo y cobre sobre *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*). Se utilizó la metodología de doble enfrentamiento (Chérif y Benhamou 1990). Cada unidad experimental constó de un plato Petri, con 4 discos de papel filtro, 2 impregnados con el tratamiento y 2 con los controles, el positivo con agua destilada y el negativo con un antibiótico (Gentamicina 1,2 ppm). En total quince tratamientos y 10 repeticiones por tratamiento. Los tratamientos consistieron en formulaciones comerciales de cobre y yodo ofrecidas en el mercado (Tabla 2).

Tabla 2. Formulaciones comerciales de cobre y yodo evaluadas en las pruebas de antagonismo con *Erwinia* sp. La dosis corresponde a la recomendación del fabricante para uso en campo.

Tratamiento	Descripción/dosis	Concentración		Dosis L.Ha ⁻¹
T1	Copper speed 100%	CuSO4	6% P/v	0,4
T2	Copper speed 50%	CuSO4	6% P/v	0,2
T3	Copper speed 25%	CuSO4	6% P/v	0,1
T4	Fulmicobre 100%	Cu3(PO3)2	5% p/v	1
T5	Fulmicobre 50%	Cu3(PO3)3	5% p/v	0,5
T6	Fulmicobre 25%	Cu3(PO3)4	5% p/v	0,25
T7	Foliveex cobre 100%	CuSO4	98% p/p	10
T8	Foliveex cobre 50%	CuSO4	98% p/p	5
T9	Foliveex cobre 25%	CuSO4	98% p/p	2,5
T10	Nutricop 20 100%	CuSO4	28,8% p/v	4
T11	Nutricop 20 50%	CuSO4	28,8% p/v	2
T12	Nutricop 20 25%	CuSO4	28,8% p/v	1
T13	Vanodine 5 ml.L ⁻¹	Iodo-Etanol	2,5%	0,125
T14	Vanodine 10 ml.L ⁻¹	Iodo-Etanol	2,5%	0,25
T15	Vanodine 30 ml.L ⁻¹	Iodo-Etanol	2,5%	0,75

Los productos comerciales formulados a base de yodo y cobre se enfrentaron a *E. chrysanthemi*. Se emplearon 10 repeticiones por tratamiento. El enfrentamiento se llevó a cabo en platos Petri en medio de cultivo Agar Nutritivo (AN) para 10 productos. En cada plato se rayó y distribuyó, en 4 direcciones, con hisopos estériles, una suspensión igual al estándar Mc Farland # 0,5, que equivale a $1,5 \times 10^8$ UFC.ml⁻¹ de *E. chrysanthemi*. Posteriormente, se preparó un volumen de 0,1 L de la dosis proporcionada en la etiqueta de cada tratamiento, del cual se tomó una alícuota de 7 mL y se colocó en los discos de papel filtro. Los platos Petri se colocaron en condiciones de oscuridad, en una incubadora (Shelton Sm 16) a $26 \pm 1^\circ\text{C}$.

Se midió el diámetro menor y mayor del anillo de inhibición de cada tratamiento, a las 24, 48 y 120 horas. El análisis de los datos se realizó mediante un análisis de variancia (ANDEVA) con una prueba LSD Fisher y una probabilidad del 5%, con el programa estadístico InfoStat.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Clasificación y purificación del crecimiento microbiano. De la etapa de aislamiento de la sintomatología característica de la PSF se obtuvo como resultado 7 morfotipos bacterianos. De estos, 3 morfotipos presentaron forma irregular, bordes ondulados, superficie plana y coloración parda o café claro, en medio MacConkey, característicos de enterobacterias como *Erwinia*, concordante con las observaciones de Guzmán y Wang (1998) en la identificación morfológica de *Erwinia* sp. Los 3 morfotipos fueron inoculados en fruta para probar su patogenicidad.

Identificación de los agentes asociados a la PSF. Los resultados obtenidos en las pruebas bioquímicas realizadas concuerdan con lo encontrado por varios autores para el género *Erwinia* (Tabla 3). Los 3 morfotipos tuvieron un resultado positivo en las pruebas de crecimiento en medio agar papa dextrosa (PDA), en agar nutritivo (AN), y en discos de papa. Estas pruebas son

positivas para los géneros de bacterias pectinolíticas, osea que tienen la capacidad de producir enzimas degradadoras de la pectina, como *Erwinia chrysanthemi* y *Erwinia carotovora*, que se traduce en la degradación de tejidos suculentos en la planta (Cedeño *et al.* 1990, Soriano *et al.* 2000, Ramírez *et al.* 2014). Se ha documentado que estas pruebas son claves para determinar la patogenicidad de *Erwinia chrysanthemi* (Beaulieu *et al.* 1993), y al respecto, Guzmán y Wang (1998), a partir de bacterias del género *Erwinia*, obtuvieron resultados positivos para estas pruebas.

Tabla 3. Caracterización bioquímica de los aislamientos SFC2, SFC4 y SFC7, obtenidos del síntoma de la Pudrición Suave del Fruto (PSF).

Prueba	Resultado
Catalasa	+
Oxidasa	-
Rayado en discos de papa	+ desnaturaliza el tejido
TSI	+ A/A
Tinción Gram	-
Crecimiento en PDA	+
Crecimiento en AN	+

Para los 3 morfotipos, la tinción Gram fue Gram negativa, catalasa positiva, oxidasa negativa, y TSI positiva para la fermentación de azúcares. Como señala la literatura, la gran mayoría de bacterias fitopatógenas son Gram negativas (Kunstmann *et al.* 2006, Ramírez *et al.* 2014), por otra parte, en su trabajo, Ramírez *et al.* 2009, señalan en la caracterización bioquímica de bacterias del género *Erwinia*, que estas son catalasa positiva y oxidasa negativa, además, describen la capacidad de este género para fermentar azúcares, lo que resulta en el viraje del color del medio de rojo a amarillo, en la prueba TSI.

Los morfotipos fueron analizados mediante la técnica bioquímica BIOLOG GEN III y la

técnica molecular de secuenciación mediante PCR. El resultado de ambas pruebas refuerza que los morfotipos SFC2, SFC4 y SFC7

corresponden a *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*) y *Erwinia carotovora* (sin. *Pectobacterium carotovorum*) (Tabla 4).

Tabla 4. Identificación de los aislamientos SFC2, SFC4 y SFC7 mediante el sistema BIOLOG GEN III y secuenciación mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de acuerdo con la amplificación del ARN de la región 16S.

Aislamiento	BIOLOG GEN III	Secuenciación mediante PCR
SFC2	<i>Erwinia carotovora</i> (<i>Pectobacterium carotovorum</i>)	99% similitud con <i>Erwinia chrysanthemi</i>
SFC4	<i>Erwinia carotovora</i> (<i>Pectobacterium carotovorum</i>)	99% similitud con <i>Erwinia chrysanthemi</i> y <i>Dickeya dadantii</i>
SFC7	<i>Erwinia</i> sp	99% similitud con <i>Erwinia chrysanthemi</i>

Con estos resultados se puede afirmar que los agentes asociados a la PSF son *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi* y *Dickeya dadantii*) y *Erwinia carotovora* (sin. *Pectobacterium carotovorum*). Estos resultados concuerdan con los agentes causales de las pudriciones blandas descritos recientemente en la literatura (Guzmán *et al.* 2017, Villalta *et al.* 2019), que señalan a *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya dadantii*), como el agente causal de pudriciones blandas en banano. El hallazgo de *Erwinia carotovora* (sin. *Pectobacterium carotovorum*) podría sugerir la participación conjunta de este organismo, ya que siempre fue aislada de los síntomas de la enfermedad y se logró comprobar, mediante los postulados de Koch, su patogenicidad.

Descripción de los síntomas característicos de la PSF. Los síntomas de esta enfermedad se observaron en fruta verde, a partir de 6 semanas de edad y se acentuaron cuando la fruta alcanzó edad comercial alrededor de 11 semanas. Los síntomas característicos fueron manchas acuosas debajo de la epidermis del fruto, que desencadenaron áreas necrosadas a lo largo del fruto. Los síntomas iniciaron por lo general en el extremo distal, que abarcó aproximadamente 0,5 cm de radio. La enfermedad avanza paulatinamente hasta llegar al pedúnculo. Internamente, en un estado avanzado, los tejidos de la pulpa se degradan, producto de la acción enzimática de los agentes causales y presentan mal olor, que da origen al síntoma típico de una pudrición blanda (Jeger *et al.* 1995, Guzmán y Wang 1998, Guzman *et al.* 2017) (Figura 1).



Figura 1. Síntomas característicos de la PSF en frutos individuales de 12 semanas de edad.
a. Necrosis externa en los tejidos de la cáscara del fruto.
b. Aspecto de los tejidos internos de la pulpa de un fruto afectado por la enfermedad.

La enfermedad progresa rápidamente; al término de 24 horas, la necrosis externa es evidente e internamente, la pudrición puede alcanzar entre 1 y 2 tercios del fruto (Guzmán y Wang 1998). En etapas avanzadas, los tejidos de la cáscara colapsan, producto de la pudrición interna y

externa, seguido de un goteo de exudados hacia la fruta de manos inferiores y adyacentes que causa manchas, estrías y decoloraciones que convierten fruta en condiciones óptimas para ser comercializada en fruta de desecho (Figura 2).

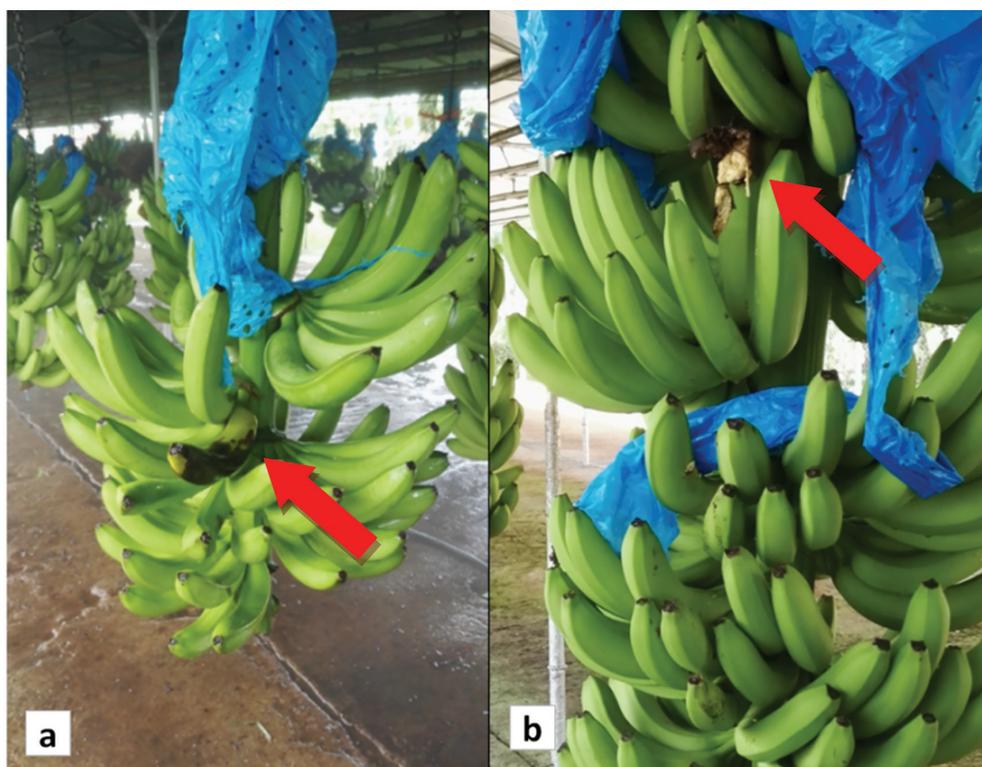


Figura 2. Síntomas característicos de la PSF en racimos de 12 semanas de edad.

a. Fruto íntegro con necrosis característica.

b. Fruto colapsado en la parte superior del racimo que genera goteo de exudados sobre fruta de manos inferiores y adyacentes.

Pruebas de patogenicidad. Los 3 morfotipos probados, fueron denominados SFC2, SFC4 y SFC7, y reprodujeron los síntomas característicos de la PSF. Los síntomas iniciales de la enfermedad, pequeñas áreas de apariencia húmeda en la cáscara fueron observados 24 horas después de la inoculación y se extendieron hasta alcanzar la totalidad del fruto, aproximadamente 120 horas después. Guzmán y Wang (1998), en su trabajo con *Erwinia* sp, señalan que al cabo de

5 días de inoculación (120 h), se alcanzó un 90% del fruto necrosado, dato que refuerza la rapidez con que estos patógenos afectan el fruto.

En este trabajo también se pudo constatar lo expuesto por Guzmán y Wang 1998 y Guzmán *et al.* 2017, quienes señalaron que una vez observado el síntoma externo en la cascara del fruto, los tejidos internos de la pulpa se encontraron degradados y con apariencia acuosa (Figura 3).

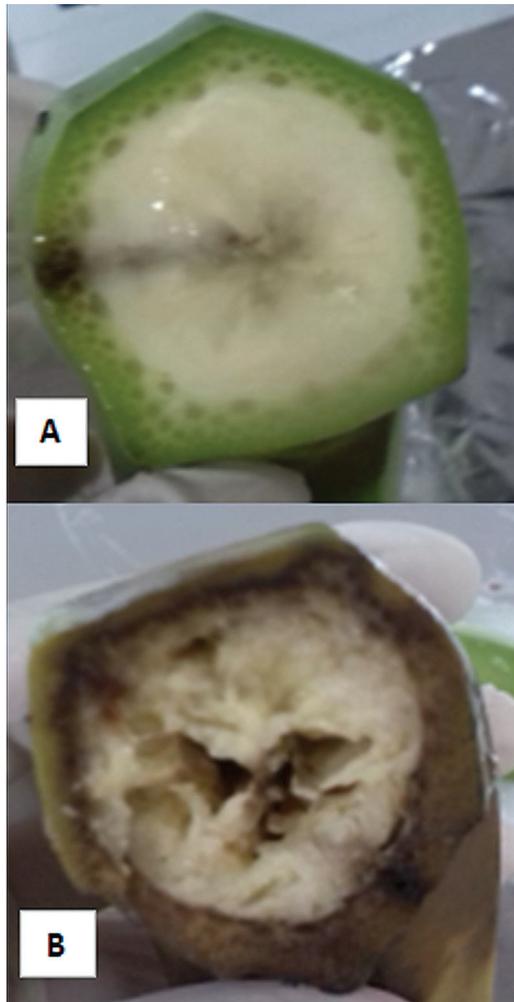


Figura 3. A. Aspecto de la pulpa de un fruto sano. B. Aspecto de la pulpa de un fruto afectado por la enfermedad.

Efecto antagonista in vitro de trece formulaciones comerciales de microorganismos antagonistas sobre *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*). El diámetro de inhibición sobre *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*) se observó a partir de 48 horas después de la inoculación. Como se indica en la Figura 4, el mayor diámetro de inhibición del crecimiento de la bacteria fue obtenido con *Bacillus subtilis* (cepa QST 713) y *Bacillus pumilus* (cepa QST 2808), a las 120 horas. Ambos productos lograron aproximadamente el doble del diámetro de inhibición del resto de tratamientos. Con el testigo positivo (agua destilada) y negativo (Gentamicina 1,2 ppm), el diámetro de inhibición alcanzado fue 0 cm y 2,5 cm respectivamente.

El efecto de ambos tratamientos puede deberse a que las cepas de las bacterias, *B. subtilis* y *B. pumilus*, han sido seleccionadas por su capacidad de antagonismo con patógenos de plantas causantes de múltiples enfermedades. La literatura indica que entre un 4 y 5% del genoma de ambas especies está dedicado a la producción de antibióticos. Tienen el potencial para producir más de 2 docenas de moléculas antimicrobianas diferentes, además de las enzimas líticas, celulasas, proteasas, 1,4- β -glucanasas e hidrolasas, las cuales contribuyen a la degradación de las paredes y membranas de las células del patógeno (Baysal *et al.* 2013).

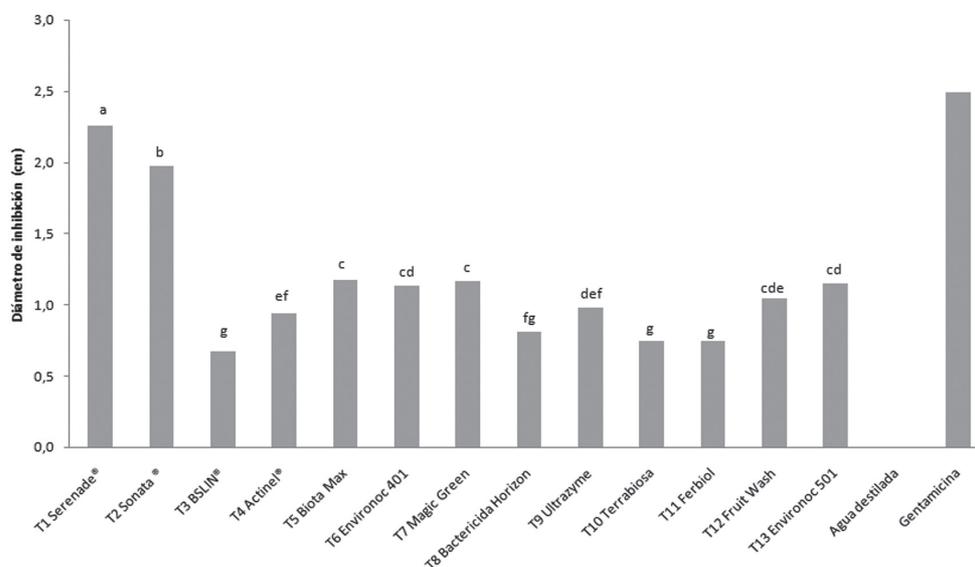


Figura 4. Inhibición del crecimiento in vitro de *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*) debido al efecto antagonista de los tratamientos a las 120 horas. Tratamientos seguidos de una misma letra no son significativamente diferentes (LSD Fisher 0,05).

Observaciones realizadas por Sharga y Lyon (1998), Reinoso *et al.* (2006), Nissen *et al.* (2008), Goorani El y Hassanein (2008) y Matar *et al.* (2009), indican la efectividad de ambas bacterias en la inhibición del crecimiento in vitro de especies de *Erwinia*. Por otra parte, en otros cultivos, se observó efecto inhibitorio por parte de estas bacterias al probarse en el control in vitro de 2 subespecies de *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* (*Pectobacterium carotovorum*) y *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (*Pectobacterium carotovorum*), causantes de la pudrición suave de la papa (Cladera *et al.* 2006). Por otra parte, Rashid *et al.* 2013, lograron un diámetro de inhibición de aproximadamente 2 cm con *Bacillus subtilis* en pruebas de control biológico in vitro contra *Erwinia* sp.

Se ha observado que los compuestos producidos por *Bacillus* mantienen su actividad en medios de cultivo hasta 8 horas después de producidos, y su actividad in vitro aumenta luego de 24 horas de la inoculación del microorganismo, cuando este ha logrado establecerse en el medio

(Bottone y Peluso 2003). Lo anterior puede explicar que el efecto inhibitorio de los 2 tratamientos comenzó a observarse después de las 24 horas de inoculación y el máximo se alcanzó a las 120 horas después, al terminar la fase de crecimiento exponencial e iniciar la fase estacionaria de estos microorganismos (Bottone y Peluso 2003).

Efecto de inhibición in vitro de fuentes comerciales de Iodo y cobre sobre *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*). El crecimiento de *E. chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*) se vio inhibido por las formulaciones de cobre y yodo. Los tratamientos que mostraron mayor efectividad fueron la dosis completa de Sulfato de Cobre 28%, media dosis de Sulfato de cobre 28% y la dosis más alta de Iodo etanol 30 ml.L⁻¹ (Figura 5). Cabe resaltar que la dosis más alta de Iodo etanol tuvo un desempeño similar a las mejores fuentes de cobre. Los resultados obtenidos pueden deberse a que el Sulfato de Cobre (28% P/V) presenta un contenido porcentual de cobre mayor a los demás

tratamientos evaluados. Por otra parte, el Sulfato de Cobre (98% P/V) no mostró un desempeño adecuado. A raíz de estos resultados, es necesario investigar la influencia de la concentración

y naturaleza sólida o líquida de las fuentes de cobre en la inhibición sobre *E. chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*).

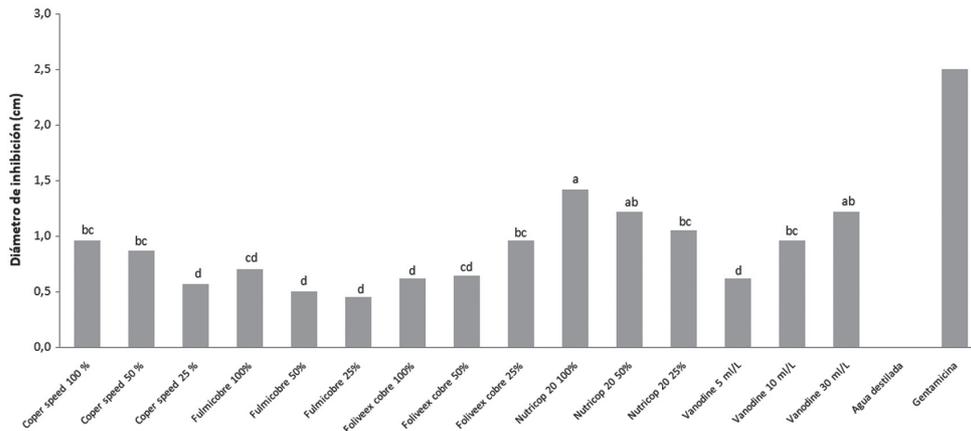


Figura 5. Inhibición del crecimiento in vitro de *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*) debido al efecto de los tratamientos a las 48 horas. Tratamientos seguidos de una misma letra no son significativamente diferentes (LSD Fisher 0,05).

El efecto observado se debe al efecto bacteriostático y bactericida descrito por la literatura para el Iodo y el cobre (Gómez *et al.* 2001, Ordax 2008, Arauz 2011), sin embargo, es importante determinar su uso potencial y la posible fitotoxicidad en fruta causada por estas fuentes de cobre y Iodo.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El agente asociado a la enfermedad PSF fue aislado de tejido enfermo e identificado como *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*).

Se presume que hay una participación conjunta de *Erwinia carotovora* (sin. *Pectobacterium carotovorum*), ya que siempre fue aislada de los síntomas de la enfermedad y se logró comprobar, mediante los postulados de Koch, su patogenicidad.

El mejor efecto antagonista in vitro sobre *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*) se obtuvo con los microorganismos *Bacillus pumilus* cepa QST 2808 y *Bacillus subtilis* cepa QST 713.

Por parte de las fuentes químicas, el mejor efecto in vitro sobre *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*) se obtuvo con la dosis completa y media dosis de Sulfato de Cobre al 28,8%, y la dosis más alta de Iodo-Etanol al 2,5%.

Se recomienda investigar el antagonismo in vitro, a partir del incremento de formulaciones comerciales de microorganismos antagonistas y controladores biológicos, para dar énfasis a productos elaborados a partir de cepas puras.

Se recomienda investigar la influencia de más fuentes a base de cobre y yodo, de diferente concentración, de naturaleza sólida o líquida sobre la inhibición de *Erwinia chrysanthemi* (sin. *Dickeya chrysanthemi*).

LITERATURA CITADA

- Agrios, GN. 2005. Plant diseases caused by prokaryotes: bacteria and mollicutes. Bacterial Soft Rots. Plant Pathology 4 ed. Amsterdam, Países Bajos, Harcourt, Academic Press. p. 434-437.
- Arauz, L. 2011. Fitopatología: Un enfoque agroecológico. 2. ed. San José, Costa Rica, Editorial Universidad de Costa Rica. 514 p.
- Baysal, Ö; LAI, D; XU, H; Siragusa, M; Çalişkan, M; Carimi, F; Tör, M. 2013. A Proteomic approach provides new insights into the control of soil-borne plant pathogens by *Bacillus* species. PLoS ONE 8(1):e53182. DOI: 10.1371/journal.pone.0053182
- Beaulieu, C; Boccara, M; Gijsegem, F. 1993. Pathogenic behavior of pectinase defective *Erwinia chrysanthemi* mutants on different plants. Molecular Plant-Microbe Interactions 6 (2):197-202.
- Bottone, E; Peluso, R. 2003. Production by *Bacillus pumilus* (MSH) of an antifungal compound that is active against Mucoraceae and *Aspergillus* species: preliminary report. Journal of Medical Microbiology 52(1):69-74.
- Cedeño, M; Nieves, M; Palacios, P. 1990. *Erwinia carotovora* subsp. atroseptica, causante de la pudrición blanda del plátano 'Harton' (Musa AAB) en Venezuela. Fitopatología Venezolana 3(1):6-9.
- Chérif, M; Benhamou, N. 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Phytopathology 80:1406-1414.
- Cladera, F; Caron, G; Motta, A; Souto, A; Brandelli, A. 2006. Bacteriocin-like substance inhibits potato soft rot caused by *Erwinia carotovora*. Canadian Journal of Microbiology 52(6):533-539.
- Coto, B; Wang, A. 1995. Evaluación de cinco tratamientos químicos para el combate de la bacteriosis (*Erwinia* sp.) en frutos de mango variedad Tommy Atkins, en Turrubares, Costa Rica. Agronomía Costarricense 19(1):15-20.
- Gómez, L; Echeverry, E; González, R. 2001. Evaluación de los controles cultural, químico y biológico sobre la pudrición vascular y marchitamiento del plátano (*Musa* AB Simmonds). Infomusa 10(1):17-21.
- Goorani El, M; Hassanein, F. 2008. The effect of *Bacillus subtilis* on in vitro growth and pathogenicity of *Erwinia amylovora*. Journal of Phytopathology 133(2):134-138.
- Gowen, S. 1995. Bananas and plantains. Londres, UK, Chapman and Hall. 599 p.
- Guzmán, M; Villalta, R; Martínez, I. 2017. Relación entre la desflora en el campo del racimo de banano (*Musa* AAA, cv. Grande Naine) y la pudrición bacteriana suave del dedo. CORBANA 37-43(63):47-61.
- Guzmán, M; Wang, A. 1998. Descripción de los síntomas, identificación del agente causal y determinación de la fuente de inóculo de la pudrición suave del dedo en banano (*Musa* AAA). CORBANA 23(50):109-124.
- Hall, T. 1999. BioEdit: A user-friendly biological sequences alignment editor and analysis program for Windows. Nucleic Acids Symposium Series 41:95-98.
- Hoyos, L; Duque, G; Orduz, S. 2008. Antagonismo in vitro de *Trichoderma* spp. sobre aislamientos de *Sclerotinia* spp. y *Rhizoctonia* spp. Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas 2(1):76-86.
- Jeger, M; Eden, S; Thresh, J; Johanson, A; Waller, J; Brown, A. 1995. Banana diseases. Bananas and Plantains. Londres, UK, Chapman & Hall. p. 317-382.
- Jiménez, G; Cordovés, M. 1992. Caracterización de bacterias de la rizosfera de plátano antagónicas a *Erwinia chrysanthemi* (en línea). Protección de Plantas Consultado 15 oct. 2016. Disponible en <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=CU2003100445#WE2YcSw4jA.mendeley>
- Kunstmann, J; Campi, L; Bohm, L; Barrera, S; Collado, L. 2006. Determinación de especies de *Erwinia* (grupo carotovora) como agentes causales de pudrición blanda en Cala (*Zantedeschia* spp.). Agricultura Técnica 66(3):247-255.
- Lane, D; Pace, B; Olsen, G; Stahl, D; Sogin, M; Pace, N. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:6955-6959.
- Martínez, I; Villalta, R; Guzmán, M. 2000. Plegable divulgativo N.º 2: Pudrición suave del dedo de banano (*Pectobacterium carotovorum* Waldee). Costa Rica, Corporación Bananera Nacional. 2 p.
- Matar, S; El-Kazazz, S; Wagih, E; El-Diwan, A; Moustafa, H; Abo-Zaid, G; Abd-Elsalam, H; Hafez, E. 2009. Antagonistic and inhibitory effect of *Bacillus subtilis* against certain plant pathogenic fungi. Biotechnology 8:53-61.
- Murray, M; Thompson, W. 1985. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. Nucleic Acids Research 8(19):4321-4325.
- Nagaraj, M; Umashankar, N; Palanna, K; Khan, A. 2012. Etiology and management of tip-over disease of banana by using biological agents. International Journal of Advanced Biological Research 2(3):483-486.
- Nissen, J; Carrión, J; Ciampi, L; Costa, M; Fuentes, R; Schöbitz, R. 2008. Biocontrol de *Erwinia carotovora* en Cala (*Zantedeschia* sp). Agro Sur 36(2):59-70.
- Ordax, M. 2008. Supervivencia de *Erwinia amylovora* en condiciones de estrés: influencia de la presencia de cobre y la limitación de nutrientes. Tesis Ph.D. Valencia, España, Universidad Politécnica de Valencia. 226 p.
- Ramírez, J; Jaraba, A; Buriticá, P. 2014. Manejo de la pudrición acuosa del pseudotallo (*Dikeya* sp.) en banano (*Musa* sp.) bajo condiciones de invernadero. Agronomía Costarricense 38(2):83-92.

- Ramírez, L; Castaño, S; López, R. 2009. Identificación de bacterias que afectan el establecimiento in vitro de segmentos nodales de *Guadua angustifolia* Kunth. Rev. Invest. Univ. Quindío 19:151-158.
- Rashid, M; Chowdhury, M; Sultana, N. 2013. In-vitro screening of some chemicals and biocontrol agents against *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, the causal agent of Soft Rot of Potato (*Solanum tuberosum*). The Agriculturists 11(2):1-9.
- Reinoso, Y; Casadesús, L; García, A; Gutiérrez, J; Pazos, V. 2006. Aislamiento, selección e identificación de bacterias del género *Bacillus* antagonistas de *Pectobacterium carotovorum*. Fitosanidad 10(3):187-191.
- Samson, R; Legendre, JB; Christen, R; Fisher-Lesaux, M; Achouak, W; Garden, L. 2005. Transfer of *Pectobacterium chrysanthemi* (Burkholder et al. 1953) Brenner et al. 1973 and *Brenneria paradisiaca* to the genus *Dickeya* gen. nov. as *Dickeya chrysanthemi* comb. nov. and *Dickeya paradisiaca* comb. nov. and delineation of four novel species, *Dickeya dadantii* sp nov; *Dickeya dianthicola* sp. nov; *Dickeya dieffenbachiae* sp. nov. and *Dickeya zea* sp. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 55:1415-1427.
- Sharga, B; Lyon, G. 1998. *Bacillus subtilis* BS 107 as an antagonist of potato blackleg and soft rot bacteria. Microbiol 4:777-783.
- Snehalatharani, A; Khan, A. 2010. Biochemical and physiological characterization of *Erwinia* species causing tip-over disease of banana. Archives of Phytopathology and Plant Protection 43(11):1072-1080.
- Soriano, M; Blanco, A; Diaz, P; Pastor, J. 2000. An unusual pectate lyase from a *Bacillus* sp. with high activity on pectin: cloning and characterization. Microbiology. 146:89-95.
- Stover, RH; Simmonds, NW. 1987. Bananas. 3rd edition. London, UK, Longman Scientific & Technical. 468 p.
- Thwaites, R; Eden-Green, SJ; Black, R. 1999. Diseases caused by bacteria. In Jones, DR (ed.). Diseases of banana, abacá and enset. New York, USA. CABI Publishing. p. 213-239.
- Villalta, R; Guzmán, M; Sánchez, M. 2019. Pudrición suave del dedo de banano. Costa Rica, Corporación Bananera Nacional. Hoja divulgativa N° 20. 2 p.
- Villalta, R; Sánchez, M; Conejo, A; Guzmán, M. 2019. Identificación del agente causal de la pudrición suave del dedo en fincas bananeras de la Vertiente del Caribe de Costa Rica y evaluación del riesgo de maduración prematura en racimos afectados por la enfermedad. In Informe Anual 2016-2017-2018 y 2019. Dirección de Investigaciones CORBANA, S.A. San José, Costa Rica, Corporación Bananera Nacional. p. 253-256.



Agronomía Costarricense. Universidad de Costa Rica. Se encuentra licenciada con Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Costa Rica. Para mayor información escribir a rac.cia@ucr.ac.cr