

## ASPECTOS DE LA BIOLOGÍA DE *COLLETOTRICHUM MUSAE* (BERK. & CURT.) V. ARX Y *FUSARIUM PALLIDOROSEUM* (COOKE) SACCARDO, AGENTES CAUSALES DE LA PUDRICIÓN DE LA CORONA DE LOS BANANOS (*MUSA* SP.) EN CUBA

Luis Pérez e Ibis Vidal

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600, c.e.: inisav@ceniai.inf.cu

### RESUMEN

Se estudió el efecto de la temperatura sobre la germinación de los conidios, el desarrollo de las colonias, la esporulación en cultivo in vitro, el período de incubación y el desarrollo de las necrosis en coronas de bananos del clon Cavendish gigante artificialmente inoculadas. Se obtuvieron ecuaciones de regresión cuadráticas para ajustar los valores de germinación de los conidios y de crecimiento de las colonias en función de la temperatura. La temperatura óptima para la germinación de los conidios y el crecimiento de las colonias de *F. pallidoroseum* y *C. musae* fue 27°C. En temperaturas inferiores a 15 °C, la germinación y el crecimiento de las colonias fue muy inhibida. La evolución de la pudrición de la corona en frutos inoculados artificialmente fue retrasada a temperaturas debajo de 15 °C en relación con las incubadas a 25-27 °C. Los conidios de ambas especies requieren de la presencia de una lámina de agua libre para la germinación. *C. musae* crece bien en agar Saboreaud, PDA y agar malta; en donde la esporulación fue más intensa. *C. musae* crece y esporula abundantemente a temperatura de 25-30 °C en un pH comprendido entre 5-6. Los resultados demuestran la importancia de someter la fruta tan pronto como sea posible posterior a la cosecha a temperaturas entre 13-14 °C.

Palabras claves: bananos, pudrición de la corona, *Colletotrichum musae*, *Fusarium pallidoroseum*, biología, medios de cultivo, incubación en diferentes temperaturas

### ABSTRACT

The effect of temperature on conidial germination, colony growth, sporulation in vitro, incubation period and development of crown rot on artificially inoculated Giant Cavendish banana fruits was studied. It was obtained quadratic regression equations to fit the values of germination and colony growth as a function of temperature and to determine the optimal temperature for germination and colony growth. The optimal temperature for *F. pallidoroseum* and *C. musae* conidial germination and colony growth was 27°C. At temperatures below 15 °C, germination and colony growth were strongly inhibited. Crown rot development on artificially inoculated fruits, was strongly delayed at temperatures below 15 °C with regard to development on fruits incubated at 25-27 °C. Conidia of both species requires the presence of free water laminae for germination. *C. musae* growth abundantly on Saboreaud agar, PDA and malt agar; but on malt agar the sporulation was higher. *C. musae* grows and sporulates optimally at temperatures in the range of 25-30 °C in pH on the range of 5-6. The results show the importance of fruit refrigeration at temperature between 13-14°C as short as possible after harvesting and boxing.

Key words: banana, rot crown, *Colletotrichum musae*, *Fusarium pallidoroseum*, biology, culture media, incubation at different temperatures

### INTRODUCCIÓN

En la década del sesenta, el clon Gros Michel tuvo que ser remplazado por clones del subgrupo Cavendish debido a su susceptibilidad al mal de Panamá causado por *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense* (E. F. Smith) Snyder y Hansen, lo que hizo también necesario cambiar el procedimiento de empaquetamiento de la fruta de racimos enteros a manos aisladas y racimos dispuestos en cajas, debido a la alta susceptibilidad de los frutos Cavendish a los daños por manipulación y las pudriciones de poscosecha [Simmonds, 1966; Stover, 1972; Slabaugh y Grove, 1982; Snowdon, 1990; Slabaugh, 1994].

Se han informado muchas especies de hongos asociadas a la enfermedad de la pudrición de la corona de los bananos en diferentes partes del mundo [Greene y Goos, 1963; Lukezic *et al.*, 1967; Burden, 1974; Slabaugh y Grove, 1982; Slabaugh, 1994; Marin *et al.*, 1997]. En un estudio conducido entre 1986 y 1989 en Cuba, Pérez *et al.* (1990) determinaron las especies de hongos asociadas a este desorden en las dos mayores plantaciones de bananos Cavendish de Cuba. Las dos especies más frecuentemente aisladas resultaron ser *Fusarium pallidoroseum* (Cooke) Saccardo y *Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) v. Arx, con una frecuencia de más del 60 % de los aislados realizados. *Colletotri-*

*chum musae* es además el agente causal de la antracnosis de los bananos y plátanos [Stover 1972; Snowden, 1990; Slabaugh, 1994; Lapeyre de Bellaire y Mourichon, 1997]. El efecto de los factores ambientales sobre el ciclo de *C. musae* fue estudiado por Al-Zaemey *et al.* (1994).

En el presente informe se brindan los resultados del estudio del efecto de la temperatura y humedad relativa sobre la germinación de los conidios, el crecimiento de las colonias, la esporulación de *F. pallidoroseum* y *C. musae* y el desarrollo de las necrosis, así como del crecimiento de *C. musae*, en diferentes medios de cultivo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

*1. Efecto de la temperatura y humedad relativa (Hr) en la germinación de los conidios, el crecimiento de las colonias, la esporulación y el desarrollo de la pudrición de la corona causado por Fusarium pallidoroseum (Cooke) Saccardo y Colletotrichum musae (Berk. y Curt.) v. Arx.*

Fueron obtenidas suspensiones conidiales en agua destilada estéril de cultivos de 7-10 días de edad de *F. pallidoroseum* y *C. musae* cultivados en agar de papa dextrosa (PDA) y agar de extracto de malta al 2%, respectivamente. Se pusieron gotas de las suspensiones de conidios en portaobjetos (cuatro placas/temperatura), y se incubaron en cámaras húmedas a temperaturas de 5, 10, 15, 20, 25, 27, 30, 35 y 40°C. Después de veinticuatro horas de incubación se evaluó la germinación tomando cincuenta esporas/réplica.

Para determinar la humedad relativa (Hr) mínima y óptima para la germinación de los conidios, se utilizaron los provenientes de cultivos, que fueron colocados en portaobjetos secos, y a su vez en soportes en el interior de placas de Petri que tenían en el fondo soluciones salinas saturadas [Anónimo, 1985], que posteriormente se sellaron e incubaron a 25°C. Las variantes de Hr estudiadas fueron 61, 81, 88, 90, 99 y 100%. Para obtener la Hr del ciento por ciento, se utilizó agua bidestilada en el fondo de la placa. Se incluyó además un testigo con dos gotas de agua.

Para determinar el efecto de la temperatura sobre el crecimiento de las colonias, se sembraron placas de Petri de 90 mm de diámetro (que contenían 12 mL de PDA y de agar malta, para *Fusarium pallidoroseum* y *C. musae*, respectivamente), con discos micelio de 4 mm de diámetro provenientes de cultivos puros. Se incubaron cinco placas/temperatura en incubadoras a 10, 15, 20, 25, 27, 30, 35 y 40 °C. Se midió el diámetro de las colonias diariamente, hasta que cubrieron por completo la superficie del medio.

Para determinar el efecto de la temperatura sobre la formación de fructificaciones de *C. musae* después de siete días de incubadas las colonias, se procedió a

contar el número de acérvulos en un área de 1 cm<sup>2</sup>, en cuatro zonas de la placa Petri escogidas al azar, calculándose a partir de este dato la cantidad total de acérvulos en la superficie de la placa. Para determinar el efecto de la temperatura sobre la intensidad de la esporulación de *C. musae* y *F. pallidoroseum*, se procedió a tomar diariamente un disco de micelio de cada placa (cinco por temperatura), los que se suspendieron en 5 mL de agua en un tubo de ensayo, agitando fuertemente para lograr suspender los conidios. Se colocaron en portaobjetos cinco gotas (0,02 mL) de las suspensiones obtenidas de cada hongo, en las que se contó la cantidad de conidios en 10 campos del microscopio tomados al azar.

Racimos del clon Cavendish gigante fueron cuidadosamente desmanados, divididos en fragmentos (*clusters*) de 4-5 dedos. Las coronas se lavaron con agua corriente y fueron desinfectadas superficialmente con una solución de hipoclorito de sodio al 1% por tres minutos; se enjuagaron con agua estéril, se inocularon aplicando una suspensión conidial de ambos hongos (10 conidios/campo microscópico de 160 x) en el tejido de la corona expuesto y se pusieron en bolsas plásticas selladas con papel de filtro humedecido. Cuatro *clusters*/temperatura y patógeno inoculado fueron entonces incubados a 10, 15, 20, 25, 30, 35, y 40 °C. Un *cluster* sin inocular fue incubado a cada temperatura para determinar el efecto de la infección natural sobre los resultados.

Se realizaron observaciones diarias para determinar la primera aparición de los síntomas y el desarrollo posterior de la pudrición de la corona usando la escala de severidad mostrada en la *Tabla 1*. Las observaciones fueron realizadas hasta que se alcanzó la completa pudrición de las coronas y los pedúnculos de todas las frutas.

**Tabla 1. Escala de severidad para evaluar el desarrollo de la pudrición de la corona en frutas**

Escala	
Grado	Descripción
0	Sana
1	Evidencia de los primeros síntomas
2	1/3 tejido de la corona podrido
3	1/2 tejido de la corona podrido
4	2/3 tejido de la corona podrido
5	Pudrición del tejido de la corona pero los pedúnculos parecen sanos.
6	Principio de necrosis de los pedúnculos
7	1/2 de los pedúnculos podridos
8	Todos los pedúnculos de la fruta podridos.

*2. Crecimiento y esporulación de Colletotrichum musae en diferentes medios de cultivo y pH.*

Para determinar el medio de cultivo más idóneo para el crecimiento y la esporulación de *C. musae*, se prepararon los cultivos en placas de Petri de forma similar a la

explicada en el punto 1, pero todas las placas se incubaron a 27 °C. Los medios de cultivo utilizados fueron PDA, agar avena de maíz, agar Leonian, agar Saboreaud y agar malta. Se sembraron cinco placas de cada medio de cultivo. Las observaciones del crecimiento de las colonias y la esporulación se realizaron de forma similar a la explicada en el punto 1.

## RESULTADOS

*Efecto de temperatura en germinación de conidios, crecimiento de las colonias y el desarrollo de la pudrición de la corona causada por F. pallidoroseum y C. musae*

La acción de la temperatura sobre la germinación de los conidios de *F. pallidoroseum* y *C. musae* después de la incubación a diferentes temperaturas se muestran en la Fig. 1. Las temperaturas en el rango de 20 a 30°C son muy favorables a la germinación de los conidios. Las temperaturas óptimas para la germinación son 27 y 30°C para *C. musae* y *F. pallidoroseum*, respectivamente. A temperaturas inferiores a 20 °C se inhibe fuertemente la germinación; en el rango de 10-14°C la germina-

ción de los conidios de ambas especies es inferior al 20%. La germinación de los conidios de *C. musae* comenzó antes de ocho horas en las temperaturas de 20 y 35°C, y después de diez horas y media a 15 y 35°C.

En la Tabla 2 aparece la germinación de los conidios de *F. pallidoroseum* y *C. musae* en diferentes condiciones de humedad relativa. *F. pallidoroseum* requiere de la presencia de agua libre para germinar. *C. musae* germinó sólo en presencia de agua libre y a Hr de ciento por ciento. En general ambos patógenos requieren de la presencia de agua libre para su germinación.

El crecimiento de las colonias de *F. pallidoroseum* y *C. musae* en diferentes temperaturas se muestra en la Fig. 2. La temperatura óptima para el crecimiento de ambas especie fue 27°C. A temperaturas en el rango de 20-30 °C el crecimiento de los dos hongos fue intenso. En temperaturas inferiores a 20°C, ocurre una marcada reducción en la intensidad de crecimiento del micelio, más fuerte en el caso de *C. musae*; a 15 °C el crecimiento micelial de *C. musae* era menor del 15% del crecimiento máximo a temperatura óptima, mientras que el de *F. pallidoroseum* alcanzó el 40%.

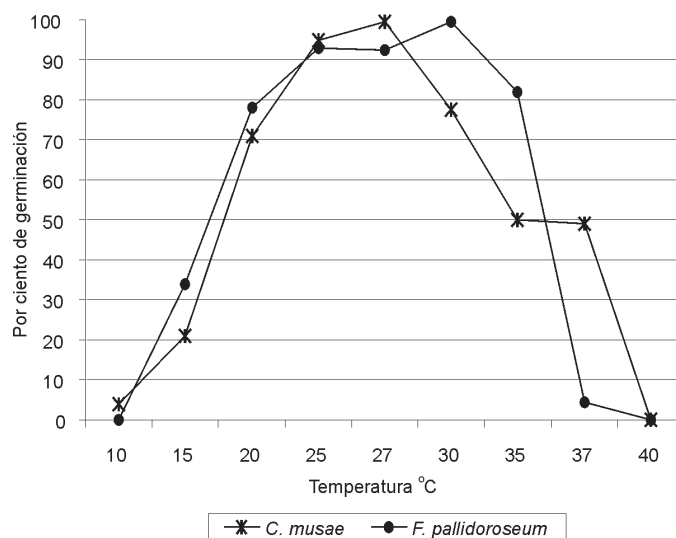


Figura 1. Efecto de la temperatura sobre la germinación de los conidios de *F. pallidoroseum* y *C. musae*

Tabla 2. Efecto de la humedad relativa (Hr) sobre la intensidad de la germinación de los conidios de *F. pallidoroseum* y *C. musae*

Humedad relativa	Porcentaje de conidios germinados	
	<i>F. pallidoroseum</i>	<i>C. musae</i>
Agua libre	100	61,5
100	0	7,5
97	0	0
95	0	0
91	0	0

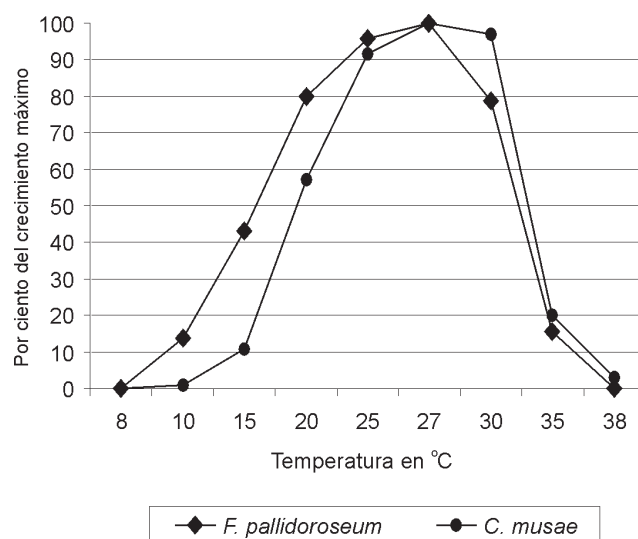


Figura 2. Crecimiento de las colonias de *Fusarium pallidoroseum* y *Colletotrichum musae* en diferentes temperaturas

En la Tabla 3 aparece la producción de acérvulos en las colonias de *C. musae* incubadas a diferentes temperaturas. Como puede apreciarse, la mayor producción de acérvulos ocurrió en el rango de 15-35 °C. La producción de acérvulos fue significativamente superior a la temperatura de 20 °C en relación con el resto de las temperaturas.

**Tabla 3. Efecto de la temperatura sobre la formación de acérvulos de *Colletotrichum musae***

°C	Cantidad de acérvulos/cm <sup>2</sup>	Signif. 5%
10	44,6	c
15	60,9	b
20	82,2	a
25	58,6	bc
30	57,4	bc
35	1,3	d
ES x	0,052	

La esporulación del patógeno (Fig. 3), comenzó a partir de tres días a las temperaturas de 20, 25, 27 y 30 °C. A 15 y 35 °C comenzó a partir de seis y cinco días respectivamente. La máxima formación de conidios ocurrió a 25 y 27 °C a los seis y siete días de incubación. Posteriormente a este período se observó una declinación en la producción de conidios. La máxima producción de conidios a 15 °C fue inferior al 12% de los producidos a 25 °C.

En la Tabla 4 aparece la duración de la incubación de los frutos inoculados con *C. musae* y *F. pallidoroseum* en diferentes temperaturas. Como puede apreciarse en la tabla, la temperatura tiene un efecto marcado en la duración de la incubación de la enfermedad. En ambos

patógenos, a 10 °C la duración de la incubación fue entre tres y seis veces más larga que a 25 y 30 °C.

La evolución de la pudrición de la corona a diferentes temperaturas en frutas inoculadas con *F. pallidoroseum* y *C. musae*, se muestra en las Figs. 4 y 5, respectivamente. Hubo una inhibición fuerte del desarrollo de la pudrición a temperaturas por debajo de 15 °C, que se expresó en días de retraso de la aparición de los síntomas y su desarrollo. La rapidez del desarrollo de la pudrición de la corona en diferentes temperaturas en las frutas inoculadas se correlacionó con el efecto de temperatura en el crecimiento de las colonias. A 15 °C la tasa de desarrollo de la pudrición de la corona fue aproximadamente la mitad de la tasa de desarrollo a 25-30 °C. En las frutas incubadas a 10 °C se observó un retraso de la primera aparición de los síntomas de doce y ocho días para *F. pallidoroseum* y *C. musae*, respectivamente, en relación con las incubadas a 25- 30 °C.

**Tabla 4. Efecto de la temperatura sobre la duración de la incubación de frutos inoculados con *F. pallidoroseum* y *Colletotrichum musae***

Temperatura °C	Duración de la incubación (días)	
	<i>C. muae</i>	<i>F. pallidoroseum</i>
10	9	13
15	5	3
20	5	–
22	–	3
25	3	2
27	–	2
30	2	2
35	7	2

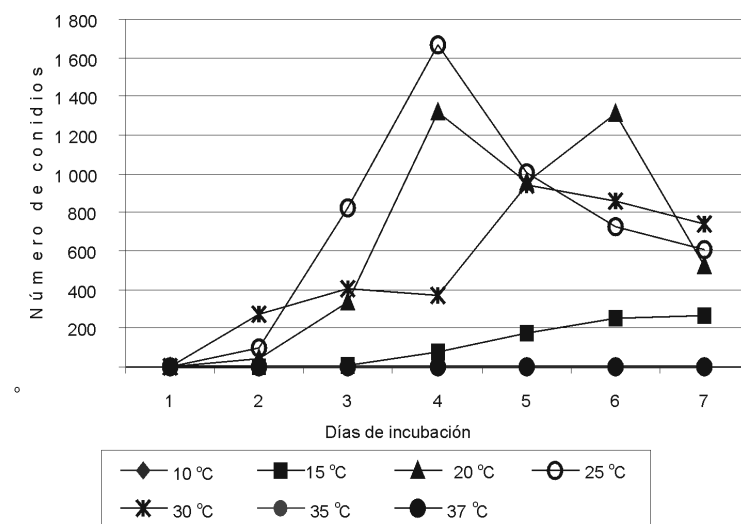


Figura 3. Efecto de la temperatura en la esporulación de *C. musae*

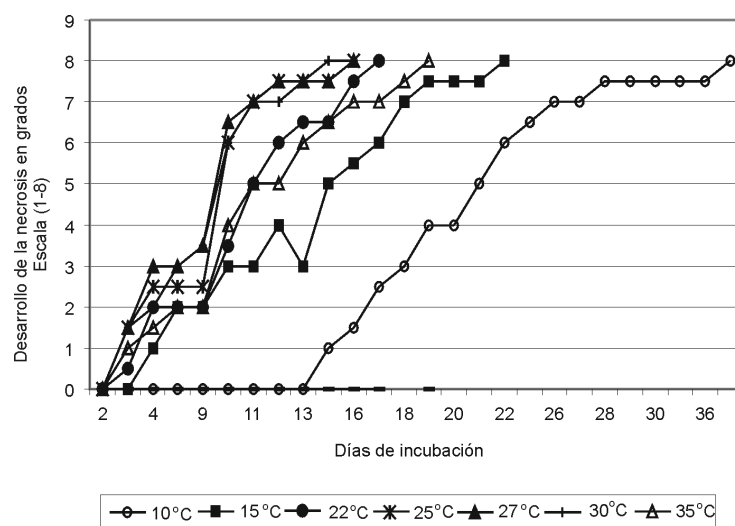


Figura 4. Efecto de la temperatura de incubación en la velocidad de desarrollo de la pudrición de la corona en clusters de bananos Cavendish gigante inoculados con *Fusarium pallidoroseum*

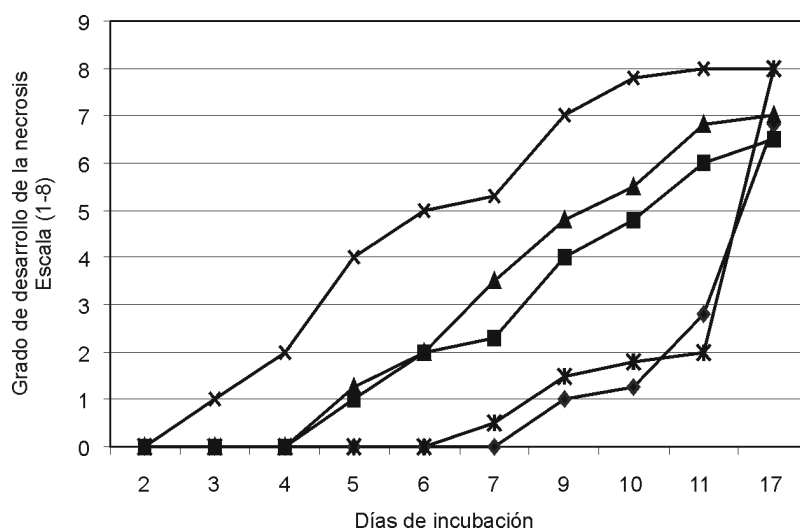


Figura 5. Efecto de la temperatura de incubación en la velocidad de desarrollo de la pudrición de la corona en clusters de bananos Cavendish gigante inoculados con *Colletotrichum musae*



38

sin síntomas

sin síntomas

## 2. Crecimiento y esporulación de *Colletotrichum musae* en diferentes medios de cultivos y pH

En la Fig. 6, aparecen las curvas del crecimiento de las colonias de *C. musae* en diferentes medios de cultivo. El hongo creció bien en los medios agar de papa dextrosa (PDA), Saboreaud, avena y malta, sin diferencias entre ellos después de una semana de incubación. Sin embar-

go, la mejor esporulación (Fig. 7), fue obtenida en el medio malta y seguidamente en agar Saboreaud. A partir de los ocho días puede observarse una abundante cantidad de conidios en medio malta, y el máximo a los 13 días. En el resto de los medios la esporulación fue muy pobre.

Las colonias de *C. musae* crecen óptimamente en el rango de pH de 5-7. Sin embargo, la mayor producción de conidios se obtuvo a pH 5 después de nueve días de incubación (Figs. 8 y 9). Se observó una disminución de

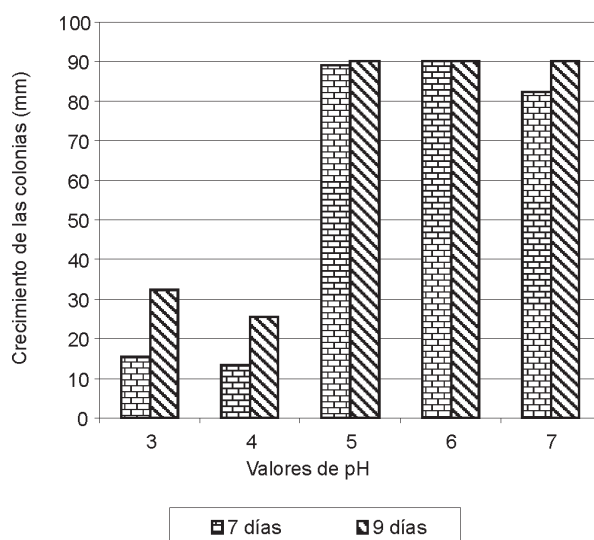


Figura 6. Crecimiento de las colonias de *Colletotrichum musae* en diferentes medios de cultivo

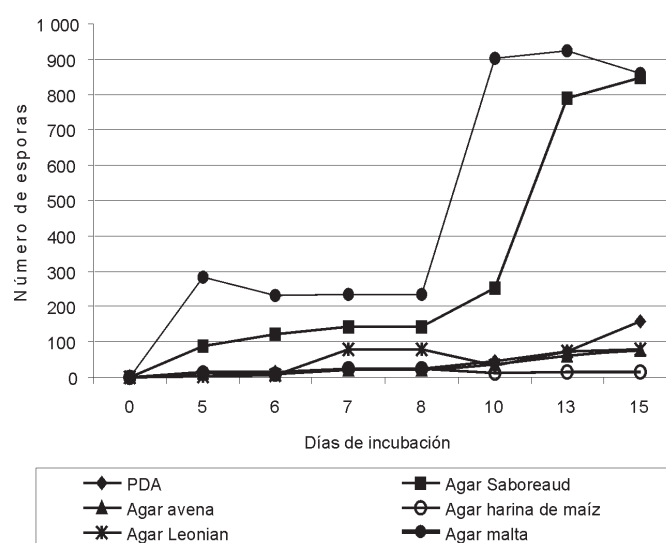


Figura 7. Esporulación de *Colletotrichum musae* en diferentes medios de cultivo

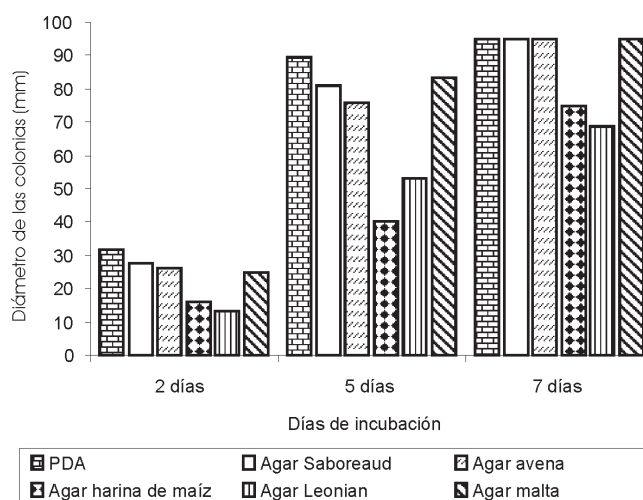


Figura 8. Efecto del pH sobre el cumplimiento de las colonias de *Colletotrichum musae* en el medio agar malta

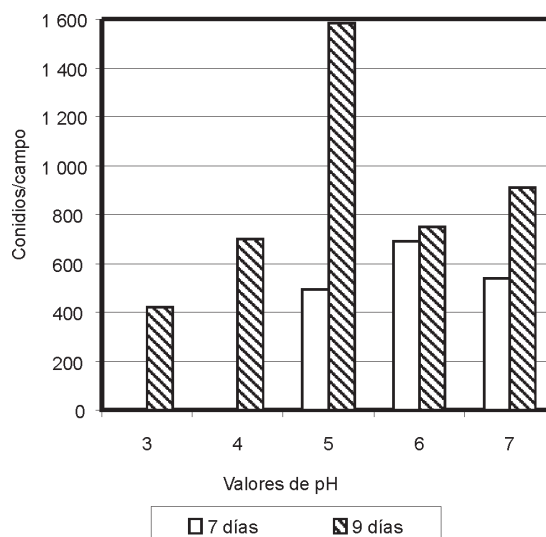


Figura 9. Efecto del pH en la esporulación de *Colletotrichum musae* en medio agar malta

la esporulación a partir del noveno día de incubación, que puede deberse al cambio de pH del medio.

## DISCUSIÓN

La temperatura tiene un efecto marcado en la germinación, esporulación, la velocidad e intensidad de crecimiento de las colonias de *C. musae* y *F. pallidroseum*, así como en la velocidad de desarrollo de pudrición de la corona causado por estos hongos en las frutas inoculadas. Ambos crecen óptimamente en el rango de 25-30 °C y se inhiben fuertemente por temperaturas inferiores a 15 °C. Estos datos están en concordancia con informes de Goos y Tshirsch (1962), sobre el efecto de temperatura en *C. musae* y Lukesic *et al.* (1967), sobre *F. roseum* (sinónimo *F. pallidroseum*; Booth y Sutton, 1984). El

desarrollo de la pudrición de la corona está bien correlacionado con el crecimiento de estos patógenos a las mismas temperaturas. Los datos indican que un factor importante que ha de tenerse en cuenta en el manejo de la enfermedad es el tiempo transcurrido entre la cosecha de la fruta y su refrigeración. El período de la incubación a temperaturas inferiores a 15 °C es de más de cinco días, por lo que es muy importante refrigerar la fruta lo más pronto posible. Los resultados con los diferentes fungicidas en los ensayos con refrigeración y sin ella, apoyan esta sugerencia.

Tanto *F. pallidroseum* como *C. musae* requieren para la germinación de las esporas de la presencia de una película de agua. Esto explica la mayor frecuencia de aislamiento de ambas especies en los meses más lluviosos y calientes del año [Pérez *et al.* 1990]. No obstante, Bad-

ger (1965) planteó que tanto *C. musae* como *F. pallidroseum* son resistentes a condiciones de baja humedad, y concluyó que pueden permanecer por largos períodos en el campo en condiciones de sequía extrema.

Las colonias de *C. musae* crecen bien en un amplio rango de medios de cultivo a pH entre 5-7. No obstante, la esporulación fue más intensa en medio malta. La formación de conidios fue obtenida a temperatura de 27°C en medio malta a partir de los cinco días, y fue máxima a partir de los nueve en pH de 5-6. Tanto el PDA como el medio malta permiten obtener un abundante crecimiento micelial y producción de esporas.

## CONCLUSIONES

- Los conidios de *Fusarium pallidroseum* germinan en agua en el rango de temperaturas comprendido entre 16 y 38 °C y óptimamente a 27 °C. Las colonias crecen en el rango de 10 a 38 °C, y óptimamente a 27 °C. En temperaturas inferiores a 15 °C se inhibe el crecimiento de las colonias. La esporulación de las colonias ocurre entre 10-35 °C, y más intensamente a 27 °C.
- Los conidios de *Colletotrichum musae* y *F. pallidroseum* germinan en agua en el rango de temperaturas comprendido entre 10-38 °C y óptimamente en 27 °C. La temperatura mínima para el crecimiento de las colonias es de 10 °C, la óptima de 27 y la máxima de 38-40 °C. A temperaturas inferiores a 15 °C se inhibe la germinación de los conidios, el crecimiento de las colonias, la esporulación, la incubación de la enfermedad y el crecimiento de las lesiones. La esporulación de las colonias ocurre a temperaturas entre 15-35 °C, y óptimamente a 27 °C.
- La velocidad de desarrollo de la pudrición de la corona en frutos inoculados con *F. pallidroseum* y *C. musae* depende de la temperatura de incubación, y está correlacionada con su efecto sobre el desarrollo de los patógenos. A temperaturas por debajo de 15 °C el desarrollo de las necrosis de las coronas es lento.
- *Colletotrichum musae* puede ser eficientemente cultivado en los medios agar malta, agar Saboreaud y agar de papa dextrosa, en los que produce una abundante cantidad de micelio y conidios.

- El pH 5 resultó óptimo para el crecimiento y formación de conidios de *C. musae*. La máxima producción de conidios fue obtenida en agar malta a 27 °C en un pH de 5 después de nueve y diez días de incubación.

- Los datos obtenidos indican que es imprescindible refrigerar la fruta tan pronto como sea posible posterior a la cosecha y beneficio para reducir la incidencia y desarrollo de la pudrición de la corona.

## REFERENCIAS

- Al -Zaemey, A. B., N. Magan; A. K. Thompson: «*In vitro* Studies of the Effect of Environmental Conditions on the Anthracnose Pathogen of Bananas, *Colletotrichum musae*», *International Biodeterioration and Biodegradation* 33 (4): 369-381, 1994.
- Anónimo: «Plant Pathologist's pocketbook», CMI-FAO, 1985.
- Badger, A. M.: «Influence of Relative Humidity on Fungi Causing Crown Rot of Boxed Bananas», *Phytopathology* 55: 688-692, 1965.
- Booth, C.; B. C. Sutton: «*Fusarium pallidroseum* the Correct Name for *Fusarium semitectum* Auct», *Transaction of the British Mycological Society* 83 (4): 702 -704, 1984.
- Burden, O. J.: «Report on Banana Fruit Quality Research Project», Windward Island Banana Research Scheme. 1970-1973. Tropical Products Institute. Ministry of Overseas Development, Londres, 1974.
- Goos, R. D.; M.Tschirsch: «Effects of Environmental Factors on Spore Germination Spore Survival and Growth of *Gloeosporium musarum*», *Mycology* 54: 353-367, 1962.
- Greene, C. L.; R. D. Goos: «Fungi Associated with Crown Rot of Boxed Bananas», *Phytopathology* 53: 271-275, 1963.
- Griffie, P. J.; O. J. Burden: «Incidence and Control of *Colletotrichum musae* on Bananas in the Windward Islands», *Annals of Applied Biology*, 77 (1): 1-16, 1974.
- Lapeyre de Bellaire, L.; X. Mourichon: «The Pattern of Fungal Contamination of the Banana Bunch During its Development and Potential Influence on Incidence of Crown Rot and Anthracnose Diseases», *Plant Pathology*, 46 (4): 481-489, Inglaterra, 1997.
- Lukesic, F. L.; W. J. Kaiser; M. Martínez: «The Incidence of Crown Rot of Bananas in Relation to Microbial Populations of the Crown Tissue», *Canadian Journal of Botany* 45: 413-421, 1967.
- Marín, D. H.; T. B. Sutton; S. M. Blakeship; W. H. Swallow: «Pathogenicity of Fungi Associated With Crown Rot of Bananas in Latin America», *Plant Disease* 80 (5) 525-528, 1995.
- Pérez, L., M. Sáenz; M. Milanés; M. O. López: «Pudrición de la corona de los bananos en Cuba. Etiología y dinámica de las especies de hongos asociadas», informe final de Proyecto, INISAV, 1990.
- Slabaugh, W. R.: «Crown Mold, Crown Rot and Pedicel Rot», *Compendium of tropical fruit diseases*, APS Press, St. Paul, MN, Estados Unidos, 1994, pp. 8- 9.
- Slabaugh, W. R.; M. D. Grove: «Postharvest Diseases of Bananas and their Control», *Plant Disease* 66 (8): 747-750, 1982.