

## AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DEL MOHO CAUSANTE DE ANTRACNOSIS EN MUSA PARADISIACA L. (PLÁTANO) EN COOPERATIVA SAN CARLOS, EL SALVADOR Y AISLAMIENTO DE MOHOS Y LEVADURAS CON CAPACIDAD ANTAGONISTA

Rosa M. Morales<sup>1</sup>  
Grace E. Henríquez<sup>2</sup>  
Recibido: 15/03/20  
Aceptado: 04/01/21

### RESUMEN

La antracnosis es una enfermedad causada por una diversidad de hongos, las especies varían de acuerdo con el clima y condiciones ambientales de cada país. Esta enfermedad afecta a los frutos de plátano reduciendo su calidad y vida de anaquel y como consecuencia provocan pérdidas cuantiosas para los agricultores, en El Salvador esta enfermedad se combate con el uso de pesticidas que contaminan el medio ambiente y exponen la salud del trabajador y consumidor. Los escasos estudios dentro del país acerca de la identidad de los hongos que afectan al plátano con esta enfermedad reducen la posibilidad de implementar alternativas de control contra esta enfermedad. Este estudio se centró en el aislamiento y la identificación del hongo causante de antracnosis con mayor patogenicidad, el estudio se realizó en los cultivos de plátano de la Cooperativa San Carlos El Paisnal, El Salvador. Se demostró la capacidad de los aislados de causar lesiones en el fruto del plátano y a partir de los valores obtenidos se seleccionó el microorganismo que presentó mayor patogenicidad y se realizó una identificación molecular obteniendo como resultado que la enfermedad es causada por la especie *Fusarium dimerum*. Además, se realizaron aislamiento de hongos candidatos a antagonistas, y se logró aislar una levadura con capacidad del 100 % inhibitoria para la especie patógena *Fusarium dimerum*.

**Palabras clave:** Hongos, levaduras, *Fusarium dimerum*, antagonistas, El Salvador.

1 Laboratorio de microbiología, Facultad de Química y Farmacia, Universidad de El Salvador. ORCID <https://orcid.org/0000-0001-8705-0411> [moralesrose8@gmail.com](mailto:moralesrose8@gmail.com).

2 Centro Nacional de Investigaciones Científicas de El Salvador. ORCID <https://orcid.org/0000-0002-0666-3927> [liza.8@yahoo.com](mailto:liza.8@yahoo.com)

## ISOLATION AND IDENTIFICATION OF THE MOLD THAT CAUSES ANTHRACNOSE IN *MUSA PARADISIACA* L. (PLANTAIN) IN COOPERATIVE SAN CARLOS, EL SALVADOR AND ISOLATION OF MOLDS AND YEASTS WITH ANTAGONISTIC CAPACITY

### ABSTRACT

Anthracnose is a disease caused by a variety of fungi, the species to vary according to the weather and environmental conditions of each country, this disease affects the banana fruits by reducing their quality and shelf life and as consequence they cause losses for farmers. In El Salvador this disease is controlled with pesticides that pollute the environment and expose the health of the workers and consumers. The few studies under in El Salvador about the identity of the fungi that affect the bananas with this disease reduce the possibility of implementing alternatives of control for this disease. This investigation focused on the isolation and identification of the fungus causing anthracnose with higher pathogenicity, the study was carried out in banana plantations of Cooperativa San Carlos El Paisnal, El Salvador. The ability of the isolates to cause lesions in banana fruit was demonstrated and, from the values obtained, the microorganism with the highest pathogenicity was selected and a molecular identification was made, obtaining as a result that the disease is caused by the species of *Fusarium dimerum*. Also, isolation of fungi candidates for antagonists was carried out, and was isolated a yeast with a capacity of 100% inhibitory for the pathogenic species *Fusarium dimerum*.

**Key words:** Fungi, Yeast, *Fusarium dimerum*, antagonist, El Salvador.

### Introducción

Antracnosis es una enfermedad causada por una diversidad de hongos patógenos que ocasionan importantes daños económicos a los cultivos de plátano en las zonas tropicales, subtropicales y las regiones templadas como El Salvador. Su impacto económico ha dado lugar a la necesidad de realizar estudios sobre aspectos de la diversidad genética, patogenicidad y el control biológico haciendo uso de microorganismos fúngicos como antagonistas de esta enfermedad.

Esta enfermedad, causa síntomas que se presentan como lesiones ovaladas, oscuras y hundidas, con presencia de acérvulos, el fruto normalmente se infecta en el campo durante su desarrollo; pero permanece latente hasta que el fruto madura<sup>1</sup>, por lo que los síntomas se manifiestan mayormente durante el almacenamiento y, muchas veces, en el supermercado cuando ocurren aumentos en los niveles de etileno como resultado

de la maduración<sup>2</sup>. Hay una diversidad de estudios que indican que el patógeno causante de esta enfermedad no solamente se engloba en un solo microorganismo, sino que hay una diversidad de patógenos que son capaces de producirla, entre ellos; *Lasiodiplodia theobromae*, *Colletotrichum musae*, *Thielaviopsis paradoxa*<sup>3</sup> y un complejo de *Fusarium spp*<sup>4</sup>.

A pesar del impacto económico, en El Salvador, se han realizado pocos estudios sobre los aspectos fundamentales de la biología que describe con mayor precisión al patógeno, estos aspectos pueden conducir al desarrollo de estrategias de control biológico para reducir temporalmente las pérdidas. El propósito de la investigación es ampliar la información sobre los patógenos causantes de la antracnosis en los cultivos de plátano en El Salvador, proporcionando más información sobre la patogenicidad de la cepa y una alternativa de control biológico que disminuya en gran parte la enfermedad, logrando reducir pérdidas económicas a largo plazo, aumentando la calidad del fruto y evitando el uso de químicos en las cosechas.

En este estudio se realizó el aislamiento e identificación de los patógenos causantes de antracnosis en el plátano utilizando muestras del fruto infectado con la enfermedad, procedentes de la Cooperativa San Carlos, municipio de El Paisnal. Con los resultados obtenidos de la identidad del patógeno se procedió la búsqueda de un hongo o levadura que presentase características antagonistas que disminuyan o inhiban el crecimiento del hongo patógeno. La investigación se desa-

rolló en las instalaciones de los laboratorios de microbiología de la Facultad de Química y Farmacia, y la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad de El Salvador en los meses de agosto del año 2016 a marzo del 2017.

## Materiales y métodos

**Localización del área de estudio.** La presente investigación realizó los laboratorios de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia, y la Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas de la Universidad de El Salvador del Centro Nacional de Investigaciones Científicas de El Salvador.

Se tomaron muestras de frutos en etapa de maduración que presentaran las características de infección por antracnosis, y frutos verdes sanos procedentes de una plantación en la Cooperativa San Carlos, el Paisnal.

**Aislamiento de hongos patógenos:** se lavaron con agua y jabón las muestras obtenidas, se cortaron fragmentos de 5x5 mm de tejido con síntomas de la infección y se sumergieron en hipoclorito de sodio al 0.525 % por 5 minutos, posteriormente se lavaron 3 veces con agua destilada para retirar los restos de hipoclorito de sodio y se secaron con papel toalla estéril, se introdujo 1 gramo de estos fragmentos de tejido en 9mL de solución estéril de plátano al 0.1 % y se incubaron por 24 horas a temperatura ambiente, concluidas estas 24 horas se realizaron diluciones seriadas 1:10 del cultivo líquido llegando hasta la dilución 1:1000, se esparció 0.1 mL de cada dilución por duplicado en placas con agar PDA y se incubaron

a temperatura ambiente por 7 días. Se aislaron los hongos que presentaran características diferentes utilizando un asa metálica y PDA<sup>5</sup>.

### Prueba de patogenicidad de los hongos aislados:

se seleccionaron frutos de plátano maduros que no presentaran ninguna lesión de infección por antracnosis y fueron desinfectados con torundas de algodón humedecidas con etanol 70 %, se lavaron con agua estéril para eliminar los restos de alcohol y se secaron con papel toalla estéril. Se tomaron dos muestras de plátano por cada moho o levadura aislada.

Haciendo uso de 10 alfileres #1 estériles firmemente atados con goma, se indujeron dos heridas leves de aproximadamente 0.5 cm de diámetro con una distancia de 6 cm entre ambas lesiones en la primera muestra de plátano maduro y en la otra muestra se hicieron dos marcas con marcador permanente con una distancia de 6 cm entre cada marca, en ambos frutos se inocularon discos miceliales de 7 días de incubación del patógeno aislado de 0.5 cm de diámetro en cada una de las marcas realizadas. Se realizó una muestra control que contenía en lugar de discos de micelio del patógeno, discos de agar PDA. Las muestras se mantuvieron en bolsas plásticas estériles a temperatura ambiente por 4 días, llevando la medición el diámetro crecimiento de las lesiones cada día. Se calculó la velocidad de ampliación de la lesión utilizando la fórmula<sup>3</sup>:

$$VA = \frac{[2 \times Gr^1]}{1} + \frac{[2 \times (Gr^1 + Gr^2)]}{2} + \frac{[2 \times (Gr^1 + Gr^2 + Gr^3)]}{3} + \frac{[2 \times (Gr^1 + Gr^2 + Gr^3 + Gr^4)]}{4}$$

VA: velocidad de ampliación. Grx: radio de la lesión después de la inoculación

(x = días 1 al 4)

2: referencia a dos puntos de inoculación por fruta

### Identificación molecular del hongo patógeno:

**Aislamiento de ADN:** se colocaron 3 discos miceliales del hongo patógeno aislado procedentes de un cultivo PDA de 7 días, en un Erlenmeyer con 100 mL de caldo Sabouraud y se incubaron por 7 días a temperatura ambiente. Se filtró el micelio contenido en el caldo Sabouraud después de los 7 días de incubación en papel filtro Watman N°1 estéril, y se secó haciendo uso del mismo papel, se trituró el micelio con mortero y pistilo estéril en presencia de nitrógeno líquido. Se colocaron en tubos de microcentrifuga de 1.5 mL muestras de aproximadamente 0.05 g del micelio triturado y se adicionaron 750µL de solución Buffer de extracción 1, y 50µL de dodecilsulfato sódico al 20%, mezclando con agitación vigorosa, y se incubaron en baño de agua a 65°C por 10 minutos, pasados estos 10 minutos se añadieron 250µL de acetato de potasio 5M con agitación vigorosa, y se incubó la muestra a 0°C durante 20 minutos. La muestra se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos y cuidadosamente usando una micropipeta se extrajo el sobrenadante y se recibió en un tubo de microcentrifuga que contenía 700µL de isopropanol y se mescló invirtiéndolo 20 veces, se incubó a -20°C durante 30 minutos, se centrifugó la muestra a 1200 rpm durante 15 minutos, se retiró cuidadosamente el sobrenadante, se lavó el precipitado obtenido con etanol 70 % y se retiró cuidadosamente con una micropipeta. Se invirtió el tubo de microcentrifuga sobre toallas de pa-

pel estériles y se dejó secar durante 10 minutos. Se disolvió el ADN obtenido con 700 µL de TE y se dejó reposar toda la noche a 4°C, se centrifugó la muestra a 1200 rpm durante 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo con 75 µL de acetato de sodio 3M y 500 µL de isopropanol, se mezcló invirtiendo el tubo 20 veces y centrifugó por 30 segundos a 1200 rpm para sedimentar el ADN, se lavó con 500 µL de etanol 70 % y se dejó secar en papel toalla estéril<sup>6</sup>. Se verificó la integridad de ADN en Nanodrop y gel de Electroforesis.

### Amplificación por PCR de regiones ITS:

Para la identificación se utilizó la amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) del fragmento comprendido entre ITS-

5.8S-ITS Con los primers:

ITS4(5'CGTATAGTTATTTCGCCTCCT

3') e ITS5

(5'GGAACAATGCTGAAAATGAAGG

3'). Para llevar a cabo la reacción de

PCR se preparó una mezcla de reactivos (máster mix); Buffer estándar de PCR (15 mM MgCl<sub>2</sub>) 1x,

MgCl<sub>2</sub> 2 mM, dNTPs 0.2mM,

Iniciadores ITS5 e ITS4 1pmol cada uno, Taq DNA polimerada 1U,

Muestra problema de ADN 100 ng.

Tabla 1. Condiciones utilizadas para el PCR

CONDICIÓN	TEMP	MIN	CICLO
Desnaturalización inicial	95 °C	2 min	1
Desnaturalización	95 °C	1 min	30
Alineamiento	55 °C	30 s	
Extensión	72 °C	1 min	
Extensión final	72 °C	5 min	1
Final	4 °C	-	1

**Aislamiento de hongos epifitos del plátano antagonistas de antracnosis:** se colectaron en la plantación muestras de plátanos verdes sin lesiones y se lavaron con agua estéril y jabón, posteriormente se frotaron con torundas de algodón humedecidas en agua estéril, este procedimiento se realizó para 10 frutos, juntando las 10 torundas de algodón en un Erlenmeyer con 100 ml de agua estéril, con una pipeta estéril se tomó 1 mL de la solución y se trasladó a un tubo con 9 mL de solución de plátano estéril al 0.1% para obtener la dilución 1:10 y se hicieron diluciones hasta 1:1000, se tomó 0.1 mL de cada dilución y se inculó en placas con PDA incubando por 5 días a temperatura ambiente. Se aisló cada hongo con características utilizando un asa metálica y PDA<sup>7</sup>.

**Prueba de incubación dual:** se sembró por estriado en un tercio de la placa con PDA el moho o

levadura presuntamente antagonista y se incubó a temperatura ambiente por 48 horas, luego de este tiempo se colocó en el centro de las placas un tapón micelial de 4 mm 7 días de incubación del patógeno causante de antracnosis. Se realizó un control del patógeno sembrando un disco micelial en una placa con PDA e incubando por 7 días a temperatura ambiente. Se calculó el índice de inhibición de crecimiento con la fórmula<sup>7</sup>

$$IC = \frac{Kr - r1}{Kr} \times 100$$

Kr= distancia medida en mm desde el punto central de inoculación hasta el margen de la colonia de la placa control.

r1= margen de distancia del crecimiento de hongos desde el centro hasta la dirección del antagonista.

### Análisis y discusión de resultados prueba de patogenicidad

**Aislamiento de hongos patógenos:** Se obtuvieron 14 cepas entre mohos y levaduras a partir de 6 plátanos maduros enfermos con lesiones características de antracnosis, manchas oscuras y profundas, dichas cepas presentaron un rápido crecimiento y se les verificaron sus características morfológicas. Entre ellas la cepa que presentó mayor patogenicidad fue la cepa marcada como #4.

**Tabla 2. Descripción macroscópica y microscópica de muestra 4**

Aislamiento de hongos presuntamente patógenos	
Descripción macroscópica	Descripción microscópica
	
Moho esponjoso irregular de color blanco en la periferia, con centro de color naranja.	Conidióforo, fialide, conidios en racimos y esporas.

Por las características de los hongos aislados se sospechó que algunos de los hongos aislados pertenecían a la familia Fusarium y Colletotrichum.

**Prueba de patogenicidad:** Se determinó cuáles mohos y levaduras aisladas promovían el crecimiento de síntomas de antracnosis, es decir, que se pueden considerar patógenos. Se consideraron patógenas aquellas que presentaron velocidad de amplitud de lesión en plátanos sanos mayor 0 cm y en plátanos heridos mayor a 0.5 cm

Aislamiento e identificación del moho causante de antracnosis en musa paradisiaca I.(plátano) en cooperativa San Carlos, El Salvador y aislamiento de mohos y levaduras con capacidad antagonista

Rosa M. Morales, Grace E. Henríquez

págs. 84 - 94



Tabla 3. Mediciones tomadas diariamente de la velocidad de amplitud de la lesión

Día	Sano (cm)		$\bar{X}$	VA	Herido (cm)		VA
1	0.0	0.0	0.0		0.2	0.1	
2	0.0	0.0	0.0	0.4	0.4	0.2	2.8
3	0.0	0.0	0.0		1.0	0.6	
4	0.7	0.9	0.8		1.2	1.0	

VA: velocidad de ampliación de la lesión Sano: plátanos sin incisiones.  
Heridos: plátanos con incisiones.

Figura 1. Prueba de patogenicidad.



Figura 2. Gráfico de velocidad de amplitud de la lesión de patógenos en plátanos maduros sanos.

La muestra N° 4 presentó mayor velocidad de amplitud de la lesión de 2.8 en plátanos heridos y aunque en el plátano sano la velocidad no fue tan alta (0.4), es bastante significativa ya que este patógeno presenta la capacidad de producir lesiones de antracnosis sin importar las condiciones de susceptibilidad del fruto. No todos los mohos y levaduras sometidas a esta prueba demostraron la capacidad de crecer usando las heridas en los plátanos como sustrato esto sucede debido a que dentro de la composición de la cascara del plátano se encuentran sustancias antimicrobianas, metanol, etanol, pectinas y enzimas<sup>8</sup>, a los que pueden ser susceptibles algunos de los microorganismos sometidos a esta prueba.

### Identificación molecular

Se realizó la extracción de ADN del patógeno seleccionado en la prueba de patogenicidad (muestras N° 4) a partir del micelio sembrado en agar sabouraud con 7 días de incubación. Los productos de amplificación de PCR de la región ITS del patógeno se consideró una amplificación de tamaño estándar de ADN, la secuencia en eucariotas oscila entre 500 y 800 pb, coincidiendo con la banda encontrada en el patógeno cuya longitud aproximada es de 600 pb.

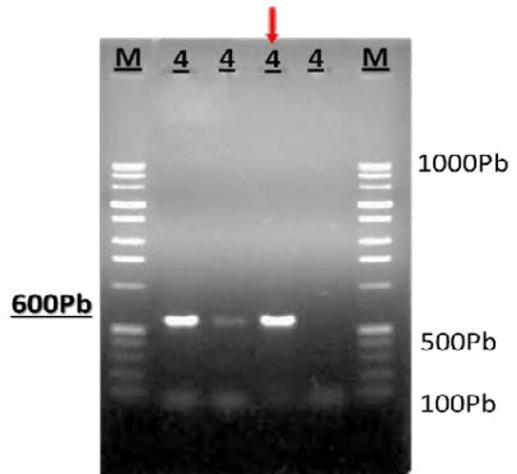


Figura 3. Gel de electroforesis al 1 % de agarosa para las muestras amplificadas por PCR.

Secuencia de ADN encontrada:

```

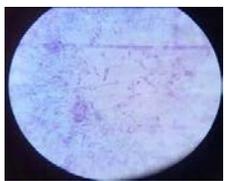
CCGCCGCTGGAGGGACGCGCG
ATGCCCAACACCAAGCCCGGAGG
GGCTTGAGGGATGTAATGACGCTC
GAACAGGCATGCCCCGCCAGAGTA    CT-
GGCGGGCGCAATGTGCGTTCA
AAGATTTCGATGATTCACTGAATTCT
GCAATTCACATTACTTATCGCATTT    CGCT-
GCGTTCTTCATCGATGCCAG    AACCAAGA-
GATCCGTTGTTGAAAG
TTTTAATTGATTGTGTTTTCACTCA
GAAGATACTGAAAATAACAGGGTT    TGTT-
GGTCCTCTGGCGGGCCGC
TCCCGTGTTACGGGGAGGCGGGG
GTCCGCCGAGGCAACGTTGTAGG
    
```

TATGTTACAGGGGTTTGGGAGTT GTAA-  
 ACTCGGTAATGATCCCTCCG  
 CTGGTTCACCAACGGAGACCTTGT  
 TAAAATTTTAAAATCAAAAAAAAAA  
 AAAAAAAAAATAAGCTTGCAAATGAT  
 CATAGCTGATCCGAGGTCACATTC  
 AGAAAGTTGGGTTGTTTTACGGCG  
 TGGCCTACGCTCCGTCCCAGTGC  
 GAGATGTTACTACTACGCAGAGGA  
 GCCGGGGCGAGACCGCCACTGT ATTT-  
 GGGGCACG

Al hacer la comparación de la secuencia de ADN del patógeno con el banco de genes, se observó que el porcentaje de homología del patógeno aislado con respecto a la especie *Fusarium dimerum* CBS 108944 es de 99 % de la secuencia de ADN<sup>9</sup>.

**Aislamiento de hongos antagonistas.** Se aislaron 13 microorganismos entre mohos y levaduras

**Tabla 4. Descripción macroscópica y microscópica de levadura con perfil antagonista**

Aislamiento de hongos presuntamente antagonistas	
Descripción macroscópica	Descripción microscópica
	
Levadura con aspecto liso, céreo, color crema, crecimiento circular de las colonias.	Blastoconidias ovaladas, unicelulares, cilíndrica y curva.

Se llevó a cabo la prueba de incubación dual donde se comprobó la capacidad de los microorganismos aislados de inhibir el crecimiento del patógeno *Fusarium dimerum*. Los mohos y levaduras que inhibieron el crecimiento en más del 25% se consideraron como candidatos a antagonistas y posibles candidatos a agentes de control biológico.

**Figura 4. Prueba de incubación dual *Fusarium dimerum* contra levadura aislada.**



Diámetro de patógeno control: 17.5 mm

Diámetro del patógeno desde el punto de inoculación en dirección al antagonista: 0.0 mm

$17.5\text{mm} - 0.0\text{mm}$

$IC = \times 100$

$17.5\text{mm}$

**IC= 100.0 %**

A pesar de que hay una gran variedad de hongos y levaduras que se lograron aislar de los plátanos verdes sanos, no todos presentaron actividad antagonista.

## Conclusiones

De acuerdo con la prueba de patogenicidad, los valores de velocidad de ampliación de la lesión evidencian que, de las 14 cepas aisladas presuntamente patógenas, 13 de estas presentan capacidad de causar lesiones características de antracnosis considerándose como patógenas. El moho causante de la antracnosis corresponde a la cepa de *Fusarium dimerum*, presentando un patrón de coincidencia en la secuencia de ADN del 99 % para este hongo. De los 13 aislados de la flo-

ra epífita del plátano verde sano, se logró obtener una muestra con un 100 % de inhibición hacia el patógeno.

## Recomendaciones

Realizar estudios comparativos con las cosechas de plátano a nivel nacional para verificar si hay más especies dentro del país que podrían estar causando la antracnosis en el fruto del plátano. Realizar la identificación molecular de la levadura antagonista que presentó inhibición del 100 % del patógeno, y realizar pruebas de antagonismo in vivo, así como también formular un proceso para la obtención de metabolitos secundarios para la utilización de estos como control biológico que elimine la antracnosis en el plátano.

## Agradecimientos

Cooperativa San Carlos, El Paisnal, quienes donaron las muestras para la investigación.

Centro Nacional de Investigaciones Científicas de El Salvador (CICES) -Facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

Docentes asesoras: Dr. Tania Cuadra. MSc. María Elsa Zelaya. Lic.

Eugenia Sorto.

A nuestras familias por el apoyo para el desarrollo de esta investigación.

## Fuentes consultadas

1. Raut, S. P., & Ranade, S. (2004). Diseases of banana and their management. In *Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II* (pp. 3752). Springer Netherlands.
2. Adaskaveg, J. E., & Hartin, R. J. (1997). Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology*, 87(9), 979-987.
3. Alvindia, D. G., Kobayashi, T., Yaguchi, Y., & Natsuaki, K. T.. (2002). Pathogenicity of Fungi Isolated from "Non-Chemical Bananas". *Tokyo University of Agriculture*, 46(4), 215-223.
4. Alvindia, D. G., Kobayashi, T., Yaguchi, Y., & Natsuaki, K. T. (2000). Symptoms and the Associated Fungi of Postharvest Diseases on Non-Chemical Bananas Imported from the Philippines. *Tokyo University of Agriculture*, 44(2), 87-93.
5. Contreras Hernández, C.A (2006). Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum* spp. Obtenidos de frutos de lulo, tomas de árbol, granadilla, mango y tallos de mora con síntomas de antracnosis. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.
6. Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant molecular biology reporter*, 1(4), 19-21.
7. Alvindia, D. G., & Natsuaki, K. T. (2008). Evaluation of fungal epiphytes isolated from banana fruit surfaces for biocontrol of banana crown rot disease. *Crop Protection*, 27(8), 1200-1207.
8. López, G. B., & Montaña, F.J.G. (2014). Propiedades funcionales del plátano (*Musa* sp). *Med UV*, 2226.
9. Chuang, T.Y. y Yang, H. R. (1993). Control Biológico de Antracnosis en Plátano. *Boletín Plant Pathology*. Volumen 2; p. 71-77.