

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR  
FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**



**AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE HONGOS CAUSANTES DE  
ANTRACNOSIS EN *Musa paradisiaca* L. (PLATANO) Y HONGOS  
ANTAGONISTAS**

**TRABAJO DE GRADUACION PRESENTADO POR:**

**GRACE ELIZABETH HERNANDEZ HENRIQUEZ  
ROSA MARIA MORALES RIVAS**

**PARA OPTAR AL GRADO DE  
LICENCIADA EN QUIMICA Y FARMACIA**

**JUNIO 2017**

**SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMERICA**

**UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR**

**RECTOR**

MAESTRO. ROGER ARMANDO ARIAS ALVARADO

**SECRETARIO GENERAL**

MAESTRO. CRISTOBAL HERNAN RIOS BENITEZ

**FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA**

**DECANO**

LIC. SALVADOR CASTILLO AREVALO

**SECRETARIO**

MAE. ROBERTO EDUARDO GARCIA ERAZO

## **DIRECCION DE PROCESOS DE GRADUACION**

### **DIRECTORA GENERAL**

MSc. Cecilia Haydeé Gallardo de Velásquez

### **TRIBUNAL EVALUADOR**

### **COORDINADORAS DE AREA DE MICROIOLOGIA**

MSc. Coralia de los Ángeles González de Díaz.

MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez

### **DOCENTES ASESORAS**

Dra. Tania Ethel Cuadra Zelaya

Licda. María Elsa Romero de Zelaya

Licda. Eugenia Sorto Lemus

## **AGRADECIMIENTOS**

Expresamos nuestros más sinceros agradecimientos a las docentes asesoras: MSc. María Elsa Zelaya, Dra. Tania Ethel Cuadra, Licda. Eugenia Sorto; asimismo a los docentes del tribunal evaluador: MSc. Coralia González de Díaz y MSc. Amy Elieth Morán Rodríguez, quienes han dirigido el presente trabajo de investigación, por sus consejos, sugerencias y enseñanzas. Expresamos nuestra gratitud al Gerente Salomón Zelada y los trabajadores de la Cooperativa San Carlos, el Paisnal por su apoyo y donación de las muestras, así mismo, al Ing. Oscar Mauricio Coto del Programa de Frutales del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal Enrique Álvarez Córdova (CENTA) por facilitarnos los contactos para la obtención de las muestras y por su guía para la obtención de información valiosa en la investigación. Agradecemos a la PhD. Santa Romero Jovel coordinadora del CICES y a su equipo de trabajo quienes muy amablemente nos acogieron en sus instalaciones para poder llevar a cabo la parte de extracción molecular, por sus valiosos consejos, por su apoyo material y moral. A los laboratoristas de Microbiología de la Facultad de Química y Farmacia. Agradecemos a los docentes del Laboratorio de Cultivo in vitro de células y tejidos vegetales de la Facultad de Ciencias Naturales y Matemática de la Universidad de El Salvador por su profesionalismo y su disponibilidad en el laboratorio. A Ing. Jenny Ángel del Laboratorio de Biotecnología Agrícola de la Facultad de Ciencias Agronómicas por su amable hospitalidad y por facilitarnos el uso del equipo para llevar a cabo parte de nuestros análisis. Al PhD. Dionisio Alvindia quien nos proporcionó documentación valiosa para la investigación. A todos gracias y que Dios les bendiga, deseándoles muchos éxitos en sus labores.

Grace Hernández y Rosa Morales

## DEDICATORIA

En primer lugar quiero agradecer a Dios a quien dedico todos mis logros, por darme el don de la perseverancia, sabiduría y la fuerza de voluntad necesaria para alcanzar mis metas, y por guiarme para tomar una de las mejores decisiones de mi vida.

A mi mamá Rosa Aminta por ser un gran ejemplo de perseverancia y valentía en mi vida, y por su apoyo para poder culminar mi carrera, por sus consejos y amor que siempre llenan mi corazón, gracias por enseñarme a dar gracias a Dios en todo momento y nunca olvidar de él. A mis hermanos por creer en mí y nunca dejarme sola, por apoyarme en todos mis proyectos de superación, por su ejemplo de superación, humildad, sacrificio. A mi papá que desde el cielo sé que me apoya y me cuida. A Grace Hernández (man) amiga y compañera de grado gracias por tu ayuda y comprensión. A mis amigos que siempre me han dado su apoyo incondicional, sus palabras de ánimo, por creer en mí gracias por estar conmigo en las buenas y en las malas y por compartir momentos inolvidables. a todos esos docentes que fueron ejemplo para querer seguir sus pasos, por sus enseñanzas y palabras de ánimo. A todas las personas que de alguna forma fueron parte de este trabajo por crecer en nuestro trabajo y brindarnos su apoyo.

Infinitas gracias a todos que Dios todopoderoso y la Virgencita los cuiden y les llenen de bendiciones sus vidas y sus hogares

«No te dejes llevar jamás por los que te desaniman, escucha la voz de Dios que es tu identidad»

Sin dudar esta meta solo es el comienzo de una gran aventura profesional, para lograr mi misión en este mundo.

Rosa María Morales Rivas

Al que me salvó por medio de su Hijo de una eternidad de sufrimiento: a Dios, quien me permitió culminar esta etapa en mis estudios, brindando aún más de lo necesario en cada paso de mi vida.

A toda mi familia, a mi abuelo, Salvador Henríquez Ahuerbach (QEPD) y a mi madre, Elizabeth Henríquez Cordón, por el apoyo, paciencia, tiempo, sacrificio y amor incondicional de siempre. No sé qué hubiera hecho sin ustedes.

A Christopher Abarca, mi novio y mejor amigo, por acompañarme y apoyarme en cada momento de mi carrera y las demás áreas de mi vida. Chris, tu paciencia no la tiene cualquiera, sos lo máximo.

A Xucit Cuestas, por haber traído a la UES ese regalo del ballet clásico, por su dedicación y comprensión a lo largo de mi carrera y trabajo de graduación. Maestra, gracias por las oportunidades brindadas y por haberme mostrado un camino diferente cuando llegué al final del mío.

Al Dr. Jaime Renderos, por su apoyo, tiempo y ayuda indispensable en la realización de este trabajo. Gracias por sus cuidados y el par de brazos prestados.

A mi compañera Rosa Morales y su familia, por su esfuerzo, dedicación y empeño. Ha sido un viaje largo y difícil, mi amiga, pero lo hemos logrado.

A todas las personas que directa o indirectamente fueron parte de esta aventura, y a mis amigos de la iglesia, del ballet y de estudio que mostraron su apoyo y me dieron palabras de ánimo en el camino, esto va para ustedes.

“Las preguntas que no podemos contestar son las que nos enseñan más. Nos enseñan a pensar. Si le das a alguien una respuesta, lo único que obtiene es cierta información, pero si le das una pregunta, buscará sus propias respuestas. Así, cuanto más difícil la pregunta, más difícil la búsqueda, más aprendemos...”

-Patrick Rothfuss

Grace E. H. Henríquez

## INDICE

	Pág. N°
Resumen	
Capítulo I	
1.0 Introducción	xxii
Capítulo II	
2.0 Objetivos	
Capítulo III	
3.0 Marco Teórico	27
3.1 Características de la planta	27
3.1.1 Descripción de la planta ( <i>Musa paradisiaca</i> )	27
3.2 Clasificación botánica	29
3.3 Características del fruto	29
3.4 Requerimientos de clima, suelo y siembra	29
3.5 Generalidades de antracnosis	30
3.6 Desarrollo de la antracosis en plátano	31
3.7 Taxonomía de hongos causantes de antracnosis	31

3.8 Morfología Macroscópica y microscópica de hongos causantes de antracnosis	31
3.9 Crecimiento de los hongos causantes de antracnosis	33
3.10 Patogenicidad y condiciones de infección de los hongos causantes de antracnosis	33
3.11 Métodos de aislamientos e identificación de patógenos causantes de antracnosis	36
3.12 Métodos moleculares de identificación	37
3.13 Control biológico	41
3.14 Mecanismo de acción de los microorganismos antagonistas	42
3.15 Métodos de aislamiento de antagonistas	42
Capítulo IV	
4.0 Diseño metodológico	46
4.1 Tipo de estudio	46
4.2 Investigación bibliográfica	46
4.3 Investigación de campo	47
4.3.1 Universo	47
4.3.2 Muestra	47
4.3.3 Tipo de muestreo	48
4.3.4 Manipulación y transporte de las muestras	48

4.4 Parte experimental	49
4.4.1 Aislamiento de hongos patógenos, causantes de antracnosis en plátano	49
4.4.2 Descripción morfológica de hongos presuntamente patógenos causantes de antracnosis	50
4.4.3 Prueba de patogenicidad de hongos aislados de lesiones de antracnosis en plátano	51
4.4.4 Identificación de hongos patógenos causantes de antracnosis	53
4.4.5 Screening y aislamiento de hongos epífitos antagonistas en plátano	56
4.4.5.1 Prueba de incubación dual	57
Capítulo V	
5.0 Resultados y discusión de resultados	61
5.1 Determinación de hongos que podrían estar causando antracnosis en plátanos procedentes de la Cooperativa San Carlos, El Paisnal.	61
5.2 Descripción morfológica de cepas aisladas.	64
5.3 Prueba de patogenicidad.	68
5.4 Identificación molecular de patógenos aislados de las muestras de plátano con presencia de antracnosis.	77
5.5 Aislamiento y selección de hongos antagonistas.	87

5.5.1 Prueba de incubación dual.	91
Capítulo VI	
6.0 Conclusiones	97
Capítulo VII	
7.0 Recomendaciones	100
Bibliografía	
Anexos	

## INDICE DE ANEXOS

### ANEXO N°

1. Ensayos preliminares para el aislamiento de hongos causantes de antracnosis.
2. Ensayos preliminares prueba de patogenicidad.
3. Aislamientos de mohos y levaduras por método de cultivo directo.
4. Aislamiento de mohos y levaduras por método de diluciones seriadas.
5. Preparación de solución estéril de plátano.
6. Aislamiento de mohos y levaduras.
7. Prueba de patogenicidad.
8. Aislamiento de mohos y levaduras epifitos.
9. Prueba de incubación dual para mohos y levaduras.
10. Preparación de reactivos para PCR.
11. Método alternativo de aislamiento de ADN utilizando ARNasa.
12. Espectro de secuenciación de las muestras 4 y 13.
13. Memoria de imágenes de la investigación.

## INDICE DE FIGURAS

FIGURA N°	Pág. N°
1. Planta de plátano	27
2. Racimo de plátano	28
3. Plátano con síntomas de antracnosis	30
4. <i>Fusarium spp.</i> A) Macroconidios. B) Clamidosporas. C) Microconidios en cadena	34
5. Cultivos de <i>Fusarium spp.</i> A) Agar PDA. B) Agar Sabourad	34
6. <i>T. paradoxa.</i> A) Conidios. B) Clamidosporas	34
7. Cultivo de <i>T. paradoxa</i>	34
8. Conidios maduros (color café oscuro) e inmaduros (hialinos) a 14 días de crecimiento. <i>L. theobromae</i>	34
9. Micelio en PDA a 14 días de crecimiento. <i>L. theobromae</i>	34
10. Representación de acérvulos, setas y conidióforos de <i>Colletotrichum spp.</i>	34
11. Diferentes tipos de colonias de <i>Colletotrichum spp</i> en medio PDA	34
12. Fragmento amplificado ITS4-5.8S-ITS5	54
13. Progreso de la lesión en plátano herido durante 4 días	75
14. Velocidad de la lesión producida por los hongos patógenos en plátanos heridos y no heridos.	76
15. Espectro obtenido por NanoDrop de la muestra 4.1	78
16. Espectro obtenido por NanoDrop de la muestra 4.2	78
17. Espectro obtenido por NanoDrop de la muestra 13.	79
18. Gel de electroforesis al 1% de agarosa para las muestras N° 4 y N° 13	79

19. Gel de electroforesis al 1% de agarosa para las muestras amplificadas por PCR. 81
20. Alineamiento de la secuencia ITS amplificada del patógeno 4 y la secuencia de la cepa *Fusarium dimerum* CBS 108944, realizado por Blast. Código de acceso a la secuencia en genbank: EU926285.1 83
21. Alineamiento de la secuencia ITS amplificada del patógeno 13 y la secuencia de la cepa *Fusarium dimerum* CBS 108944, realizado por Blast. Código de acceso a la secuencia en genbank: EU926285.1 84

## INDICE DE TABLAS

TABLA N°	Pág. N°
1. Mediciones diarias y valores de velocidad de amplitud de la lesión	69
2. Velocidad de amplitud de la lesión (cm/día)	70

## INDICE DE CUADROS

CUADRO N°	Pág. N°
1. Clasificación taxonómica de los principales hongos que afectan la cosechas de plátano produciendo antracnosis en el fruto	32
2. Descripción de características principales para la identificación de los hongos causantes de antracnosis en plátano	34
3. Condiciones de crecimiento de hongos causantes de antracnosis	36
4. Métodos de aislamiento e identificación de hongos patógenos	38
5. Métodos de identificación molecular	39
6. Microorganismos antagonistas utilizados en un control biológico exitoso contra la antracnosis postcosecha de frutas y verduras	43
7. Métodos de aislamiento de antagonistas	44
8. Reactivos para PCR	55
9. Condiciones para la reacción de PCR	55
10. Resultados del aislamiento por diluciones seriadas (solución de plátano al 0.1%) y esparcido en placa	62
11. Descripción macroscópica y microscópica	64
12. Características de las lesiones	74
13. Análisis de ADN en NanoDrop	80
14. Secuenciación de ADN	82
15. Clasificación de los aislados fúngicos según NCBI	85

16. Descripción macroscópica y microscópica de hongos antagonistas	87
17. Prueba de incubación dual, inhibición de crecimiento	91
18. Métodos utilizados en la prueba de incubación dual	95

## ABREVIATURAS

<b>Rpm:</b>	Revoluciones por minuto
<b>PDA:</b>	Agar papa dextrosa
<b>Pb:</b>	Pares de bases
<b>ITS:</b>	Espaciadores transcritos internos
<b>°C:</b>	Grados Celsius
<b>CLA:</b>	Agar clavel
<b>ADN:</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN:</b>	Ácido ribonucleico
<b>EDTA:</b>	Ácido etilendiaminotetraacético
<b>NaCl:</b>	Cloruro de Sodio
<b>TE:</b>	Tampón pH 8
<b>Pa:</b>	Pascales
<b>PCR:</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>VA:</b>	Velocidad de amplitud
<b>Prom:</b>	Promedio
<b>Cm:</b>	Centímetros
<b>CENTA:</b>	Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal "Enrique Álvarez Córdova"
<b>NCBI:</b>	Centro Nacional para Información Biotecnológica

## RESUMEN

La antracnosis es una enfermedad causada por una diversidad de hongos la especies varían de acuerdo al 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 sobre la identidad de los hongos que afectan al plátano con esta enfermedad reducen la posibilidad de implementar alternativas de control contra esta enfermedad, como el uso de biopesticidas. Este estudio se basó en la búsqueda del moho o levadura que causa la antracnosis en los cultivos de plátano de la Cooperativa San Carlos, el Paisnal, se realizó un aislamiento a partir de plátanos maduros con signos de antracnosis para obtener mohos y levaduras a los cuales se les realizó una prueba de patogenicidad que demostró la capacidad de estos aislados de causar lesiones significativas características de la antracnosis, a partir de los valores obtenidos en esta prueba se seleccionaron dos mohos con mayor capacidad patogénica y se les realizó una identificación molecular amplificando el fragmento comprendido entre ITS-5.8S-ITS, se logró demostrar la identidad de los mohos causantes de antracnosis en plátanos provenientes de la Cooperativa San Carlos. Por lo que se concluye que el moho causante de antracnosis en plátano corresponde a la especie de *Fusarium dimerum* y que es posible aislar hongos con capacidad antagonista a partir de plátanos verdes sanos. Se recomienda identificar al antagonista que inhibió el 100% del crecimiento del patógeno y estudiar los mecanismos y metabolitos secundarios que utiliza para llevar a cabo la inhibición.

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUCCIÓN**

## 1.0 INTRODUCCION

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 de los hongos que la causan, su patogenicidad y el más importante, su control biológico haciendo uso de microorganismos fúngicos como antagonistas de esta enfermedad. La antracnosis afecta al fruto, causando una enfermedad que generalmente, aparecen durante la cosecha y almacenamiento, sin embargo, la mayoría de frutos presentan la enfermedad en forma latente durante su desarrollo.

A pesar del impacto económico, en El Salvador se han realizado pocos estudios sobre los aspectos fundamentales de la biología que describe con mayor comprensión al patógeno, estos aspectos pueden conducir al desarrollo de estrategias de control biológico para reducir temporalmente las pérdidas.

Esta investigación se llevó a cabo con el propósito de ampliar tal conocimiento sobre los patógenos causantes de la antracnosis en los cultivos de plátano, proporcionando más información sobre el microorganismo que causa la enfermedad en el plátano salvadoreño, la patogenicidad de la cepa y un 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 presente características antagonistas que disminuyan el crecimiento del hongo patógeno. La investigación se desarrolló 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 a noviembre del año 2016.

**CAPÍTULO II**  
**OBJETIVOS**

## 2.0 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GENERAL

Aislar e identificar hongos causantes de antracnosis en *Musa paradisiaca* L. (plátano) y hongos antagonistas.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Obtener cultivos microbiológicos de hongos presentes en lesiones de antracnosis en plátanos proporcionados por la Cooperativa San Carlos en el municipio de El Paisnal.
- 2.2.2 Describir la morfología macroscópica y microscópica de las cepas aisladas.
- 2.2.3 Evaluar la patogenicidad de cada cepa aislada.
- 2.2.4 Seleccionar la cepa con mayor patogenicidad e identificarla aplicando técnicas de microbiología molecular.
- 2.2.5 Implementar un método para el aislamiento y selección preliminar de cepas antagonistas del patógeno causante de antracnosis.

**CAPÍTULO III**  
**MARCO TEÓRICO**

### 3.0 MARCO TEORICO

El plátano es un producto de origen vegetal muy importante dentro de la dieta alimenticia de los salvadoreños. La demanda de plátano en El Salvador es de dos tipos: consumo fresco y consumo de materia prima, para la elaboración de botanas en empresas industriales y artesanales pertenecientes a grupos familiares o pequeños empresarios cuya producción la destinan principalmente a las ferias de los pueblos en el interior del país. De acuerdo a estimaciones con base a estadísticas oficiales del Banco Central de Reserva y la Dirección General de Economía Agropecuaria (DGEA)/MAG, en El Salvador, durante el período 1,995-2,000 el consumo aparente fue de 1,826.62 miles de quintales, anuales en promedio, y el crecimiento anual fue de 21.1%. La superficie cultivada de plátano en el país, en forma de plantaciones, está distribuida en los sectores de: Ahuachapán - Sonsonate, (60.9%), Usulután - La Paz (33.9%), San Vicente (4.8%), y La Libertad (0.7%). La producción nacional se destina al mercado local y externo, sin embargo, las exportaciones nacionales son poco significativas <sup>(9)</sup>.

#### 3.1 CARACTERÍSTICAS DE LA PLANTA



**Figura N°1.** Planta de Plátano

##### 3.1.1 DESCRIPCIÓN DE LA PLANTA (*Musa paradisiaca*)

El plátano es una planta herbácea perteneciente a la familia de las musáceas, que se cultiva desde tiempos remotos, su origen es el sureste Asiático, se trata de una planta que consta de un tallo subterráneo denominado como rizoma, un pseudotallo aéreo, el tallo verdadero y yemas laterales que forman los hijuelos emitidos por el rizoma <sup>(25)</sup> (ver Figura N°1). El tamaño de esta



**Figura N°2.** Racimo de plátano

planta es variable según las especies (dos a cinco metros). De una cepa rizoma salen hojas de tamaño creciente cuyas vainas dispuestas en espiral, conforman el “pseudotallo”, coronado por un penacho de hojas largas y anchas. El meristemo terminal de la cepa se ubica ligeramente arriba del nivel del suelo durante el periodo vegetativo, durante el cual son producidas de 15 a 25 hojas funcionales; se desarrolla luego una inflorescencia mientras que el tallo crece al interior del pseudotallo. El crecimiento interno dura alrededor de tres meses en el transcurso de los cuales salen las últimas hojas diferenciadas y posteriormente producir el racimo. Al emerger el racimo viene

protegido hojas modificadas llamadas brácteas de color rojo-violeta que al desprenderse van descubriendo los grupos de flores tanto masculinas como femeninas, formándose a partir de estas últimas los frutos partenocárpicos que se desarrollan durante 80 a 95 días (ver Figura N°2) (26).

Las musáceas (plátano, guineo de seda y guineo majoncho) poseen gran relevancia en la estructura económica de El Salvador, por ser un alimento básico en la dieta alimenticia, siendo el área cultivada de 4,977 Hectáreas. En el país existe una gran demanda interna de este producto, debido a que ésta aumenta en relación directa al crecimiento poblacional; como consecuencia se importan grandes cantidades de plátano y guineo de seda de Honduras y Guatemala.

### **3.2 CLASIFICACIÓN BOTÁNICA** <sup>(10)</sup>

Tipo:	Fanerógama
Sub-tipo:	Angiosperma
Clase:	Monocotiledóneas
Sub-clase:	Inferováricos
Familia:	Musáceas
Orden:	Musa
Género:	Musa
Sección:	Eumusa
Especie:	Paradisiaca

### **3.3 CARACTERÍSTICAS DEL FRUTO**

El fruto del plátano es una baya carnosa que se encuentra en racimos, posee una cáscara gruesa con aristas en la superficie, la cual lo protege. Cuando madura es de color amarillo y las aristas tienden a desaparecer y queda casi lisa; el fruto tiene un tamaño promedio de 20 a 25 cm y un diámetro aproximado de 4 cm, es de sabor dulce cuando está maduro. El plátano es una fruta a la que no se le permite madurar en el árbol (fruta climatérica), ya que, de hacerlo, estaría sujeta a daños causados por insectos, roedores y otros animales; además, la cantidad de componentes se ven disminuidos por lo que la calidad de la fruta sería inferior que la madurada fuera de la planta <sup>(26)</sup>.

### **3.4 REQUERIMIENTOS DE CLIMA, SUELO Y SIEMBRA**

Entre los factores ambientales que influyen en la explotación comercial del plátano se encuentran: temperatura, agua, luz, viento y suelo. El plátano se adapta a climas tropicales y subtropicales húmedos, desde el nivel del mar hasta

1,200 metros sobre el nivel del mar. La temperatura óptima de crecimiento se encuentra entre los 20°C y 30°C, a temperaturas menores, se retarda el desarrollo fisiológico de la planta. Este cultivo requiere cantidades abundantes de agua para su buen desarrollo por lo que se recomienda sembrarlo en zonas cuya precipitación oscile entre 1,800 a 2,500 mm de lluvia, distribuidos en todo el año. En el caso de la luz, al disminuir su intensidad el ciclo vegetativo de la planta se alarga; con respecto al viento, no se recomienda establecer plantaciones en áreas expuestas a vientos con velocidades superiores a 20 Km/h dado que causa problemas de volcamiento o daño foliar de las plantas y, por consecuencia, pérdidas en la producción. En cuanto a los suelos se requiere una profundidad no menor a 1.2 m, de textura Franco arenosa muy fina, Franco limoso o Franco arcillo limoso y un pH de 5.5 a 7.0 (26).

### 3.5 GENERALIDADES DE ANTRACNOSIS

La antracnosis es una de las principales enfermedades postcosecha del plátano e influye significativamente en la calidad de la fruta comercializable.



**Figura N°3.** Plátano con síntomas de antracnosis

Los síntomas se presentan como lesiones ovaladas, oscuras y hundidas (ver Figura N°3), con presencia de acérvulos (masas de esporas). La infección del fruto ocurre normalmente en campo durante su desarrollo; pero permanece latente hasta que el fruto madura (49), cuando ocurren aumentos en los niveles de etileno como resultado de dicha maduración en el fruto (2). Por consecuencia, los síntomas se manifiestan mayormente durante el almacenamiento y muchas veces en

los supermercados. La antracnosis es más severa si el fruto sufre heridas o lesiones como resultado de un mal manejo.

### **3.6 DESARROLLO DE LA ANTRACNOSIS EN PLÁTANO**

El inóculo del microorganismo patógeno que ha sobrevivido en hojas, frutos y ramas afectadas causa la infección de los frutos por la dispersión de las conidias transportadas en las lluvias <sup>(2)</sup>. Una vez dispersas, las conidias se adhieren a la superficie del hospedero y germinan en un período de 12 a 24 h y luego producen un tubo germinal que penetra la cutícula directamente. Las fuentes de inóculo son las conidias producidas en acérvulos o las ascosporas producidas y liberadas del peritecio. Las diversidades de hongos causantes de antracnosis presentan procesos infecciosos en dos fases: la fase asintomática inicial, donde el patógeno se establece en los tejidos sin matar las células y son consideradas especies biotróficas (hemibiotrofia intracelular) y la fase destructiva visible (necrotrofia subcuticular), donde el patógeno crece bajo la cutícula y disuelve extensamente la matriz de péptidos de las células epidermales <sup>(11)</sup>.

### **3.7 TAXONOMÍA DE HONGOS CAUSANTES DE ANTRACNOSIS**

Diferentes investigaciones han mostrado que los hongos patógenos causantes de antracnosis en plátano provienen del filo Ascomycota, del cual se han aislado; *Lasiodiplodia theobromabea*, *Fusarium spp*, *Colletotrichum spp* y *Thielaviopsis paradoxa*, se caracterizan por ser saprófitos descomponedores y causar pudrición en frutos postcosecha, el en Cuadro N° 1, se presentan los principales hongos patógenos productores de la antracnosis que afectan a cosechas de plátano.

### 3.8 MORFOLOGÍA MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA DE HONGOS CAUSANTES DE ANTRACNOSIS

Si bien, la estructura microscópica es decisiva para la clasificación de los hongos, las características visibles también son muy importantes, debido a que, a simple vista, el aspecto de las colonias muchas veces es característico para cada uno, lo cual permite identificar en seguida el tipo de hongo.

**Cuadro N° 1.** Clasificación taxonómica de los principales hongos que afectan la cosechas de plátano produciendo antracnosis en el fruto. (54, 57, 25,59, 45, 4, 43)

<i>Lasiodiplodia theobromabea</i>	Reino	Fungi
	Filo	Ascomycota
	Clase	Dothideomycetes
	Subclase	Incertae sedis
	Orden	Botryosphaeriales
	Familia	Botryosphaeriaceae
	Género	Lasiodiplodia
<i>Fusarium spp</i>	Reino	Fungi
	Filo	Ascomycota
	Clase	Deuteromycetes
	Orden	Hypocreales
	Familia	Hypocreaceae
	Género	Fusarium
<i>Colletotrichum spp</i>	Reino	Fungi
	Filo	Ascomycota
	Clase	Ascomycetes
	Subclase	Sordariomycetidae
	Orden	<i>incertae sedis</i>
	Familia	Glomerellaceae
	Género	Colletotrichum (estado anamorfo)

**Cuadro N° 1.** Continuación

<i>Thielaviopsis paradoxa</i>	Reino	Fungi
	Filo	Ascomycota
	Clase	Pyrenomycetes
	Subclase	Hypocreomycetidae
	Orden	Microascales
	Familia	Ceratocystidaceae
	Género	Thielaviopsis

Sin embargo, es indispensable para llevar a cabo la clasificación final, determinar las peculiaridades presentes a nivel microscópico del hongo. En el Cuadro N° 2 se describen las características macroscópicas y microscópicas de los principales hongos patógenos causantes de antracnosis según estudios realizados en filipinas (8).

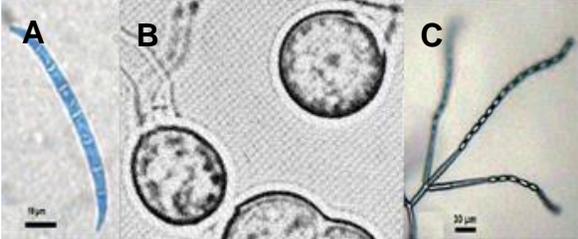
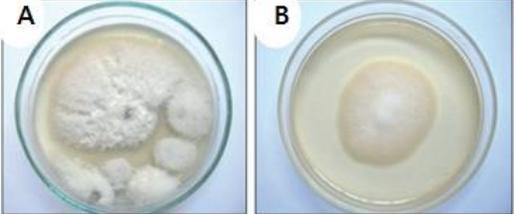
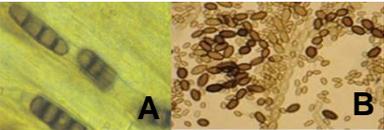
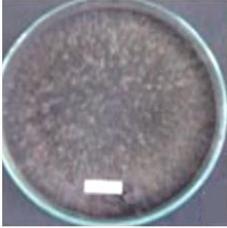
### 3.9 CRECIMIENTO DE LOS HONGOS CAUSANTES DE ANTRACNOSIS

Uno de los sistemas más importantes para la identificación de microorganismos es la observación de su crecimiento en medios de cultivos preparados en el laboratorio. Un microorganismo necesita, para crecer, nutrientes que le aporten energía y elementos químicos para la síntesis de sus constituyentes celulares, el cual es aportado por los medios de cultivo; además, necesita reunir una serie de condiciones para asegurar su crecimiento óptimo; temperatura, grado de humedad, tiempo de incubación, acidez y alcalinidad, entre otras condiciones que aseguren el crecimiento adecuado. En el Cuadro N° 3, se describen algunas de las condiciones necesarias para que el hongo patógeno causante de la antracnosis pueda crecer e infectar al fruto del plátano.

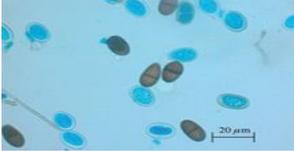
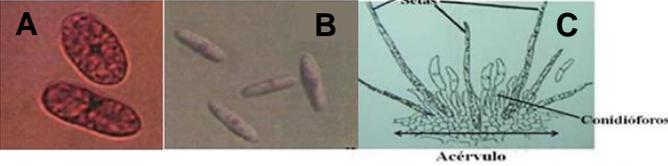
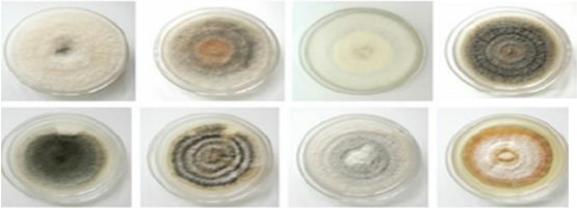
### **3.10 PATOGENICIDAD Y CONDICIONES DE INFECCIÓN DE LOS HONGOS CAUSANTES DE ANTRACNOSIS**

La principal vía de entrada a los hospederos es a través de heridas en los tejidos producidas por herramientas de trabajo, insectos o causas naturales (41). La condición favorable para la propagación de antracnosis es durante las primeras lluvias, cuando los hongos emiten un gran número de esporas que son transportadas por el viento o por las mismas gotas de lluvia sobre los nuevos hospedantes. Allí, gracias a la humedad de la estación, se establecen y germinan penetrando en el interior de las nuevas hojas y tejidos del follaje. En postcosecha, los frutos pueden ser infectados al colocarlos sobre el suelo después de cosechados o a través del contacto físico de un fruto sano con uno enfermo (60, 33).

**Cuadro N° 2.** Descripción de características principales para la identificación de los hongos causantes de antracnosis en plátano. (28, 64, 41, 29)

Patógenos	Descripción Microscópica	Descripción Macroscópica
<i>Fusarium spp</i>	<p>El micelio está formado por hifas septadas y los conidióforos presentan racimos de macroconidios. Se observan también clamidosporas y microconidios.</p>  <p><b>Figura 4.</b> <i>Fusarium spp.</i> A) Macroconidios. B) Clamidosporas. C) Microconidios en cadena</p>	<p>Las colonias son generalmente de crecimiento rápido, pálida o brillante de color (dependiendo de la especie) con o sin micelio aéreo algodonoso. El color del talo varía de blanquecino a tonos amarillo, rosa, rojo o púrpura.</p>  <p><b>Figura 5.</b> Cultivos de <i>Fusarium spp.</i> A) Agar PDA. B) Agar Sabourad</p>
<i>Thielaviopsis paradoxa</i>	<p>Comprende conidióforos largos, septados, fialídicos, estrechándose hacia su ápice, conidios cilíndricos, algo ovales en su madurez, de pared lisa y clamidosporas terminales en cadenas, de pared gruesa, de color marrón.</p>  <p><b>Figura 6.</b> <i>T. paradoxa.</i> A) Conidios. B) Clamidosporas</p>	<p>Colonias de crecimiento radial uniforme, grises con abundante micelio aéreo flocoso.</p>  <p><b>Figura 7.</b> Cultivo de <i>T. paradoxa</i></p>

## Cuadro N° 2. Continuación

<p><i>Lasiodiplodia theobromabea</i></p>	<p>Conidios rectos, cilíndricos, de extremos obtusos, hialinos.</p>  <p><b>Figura 8.</b> Conidios maduros (color café oscuro) e inmaduros (hialinos) a 14 días de crecimiento. <i>L. theobromae</i></p>	<p>Colonias densas de color gris oscuro y gris claro en el borde, por su cara superior con micelios de color oscuro en crecimiento terminal y micelio oscuro algodonoso en crecimiento inicial.</p>  <p><b>Figura 9.</b> Micelio en PDA a 14 días de crecimiento. <i>L. theobromae</i></p>
<p><i>Colletotrichum spp</i></p>	<p>Presenta un micelio enramado inmerso, septado que toma coloración hialina hasta castaño pálido. Acérvulos separados o confluentes en forma de disco o cojín, seroso subepidermal, epidermal y subcuticular típicamente con setas o espinas negras en los bordes o entre los conidióforos simples, conidias hialinas, ovoides u oblongadas.</p>  <p><b>Figura 10.</b> Representación de acérvulos, setas y conidióforos de <i>Colletotrichum spp</i>.</p>	<p>Se pueden obtener varios tipos de crecimiento y características macroscópicas para este género, como un crecimiento rápido y micelio gris con relieve ondulado o un crecimiento lento con micelio blanco grisáceo, abundante y esponjoso; se reportan también crecimiento con esporulación rápida de color naranja.</p>  <p><b>Figura 11.</b> Diferentes tipos de colonias de <i>Colletotrichum spp</i> en medio PDA</p>

### Cuadro N° 3 Condiciones de crecimiento de hongos causantes de Antracnosis

(28, 7, 49, 5, 46, 45)

Microorganismo	Condiciones de crecimiento
<i>Fusarium spp</i>	Los agares Papa Dextrosa (PDA) y Sabouraud permiten observar el diámetro de la colonia, morfología y pigmento (café, rojo, violeta, naranja, gris, blanco) difusible al medio, mientras que el agar Clavel (CLA), permite observar el desarrollo de cadenas de microconidios y morfología en detalle de macroconidios.
<i>Thielaviopsis paradoxa</i>	En medio de cultivo PDA, presencia de un micelio de crecimiento acelerado, radial, plano que inicialmente muestra un color blanco y a medida que pasa el periodo de incubación toma un color gris claro hasta negruzco, posiblemente por maduración de los conidios, que adquieren un color pardo oscuro.
<i>Lasiodiplodia theobromabea</i>	Temperatura de 15 °C mínima, 28 °C como óptima y 40 °C como máxima. La esporulación del hongo es favorecida por fotoperiodos de más de 16 horas de exposición de luz lo que permite la formación de picnidios; por el contrario, una exposición menor a 4 horas de luz diaria en un periodo de 23 días inhibe la esporulación del hongo.
<i>Colletotrichum spp</i>	En agar PDA bajo luz continua a 25°C, según estudios de variación de temperatura en crecimiento micelial, la temperatura óptima de crecimiento es de 21.8°C y se demuestra que las colonias se oscurecen al aumentar la temperatura.

### 3.11 MÉTODOS DE AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE PATÓGENOS CAUSANTES DE ANTRACNOSIS

Existen diferentes métodos de aislamiento e identificación para los hongos patógenos, desde los que implementan metodologías microbiológicas tradicionales, como las descripciones macroscópicas, microscópicas y pruebas bioquímicas hasta el uso de métodos de identificación haciendo uso de la identificación molecular por Reacción en Cadena de la Polimerasa.

Los métodos de aislamientos de patógenos que implementan metodologías microbiológicas tradicionales, se basan en la separación y clasificación de diferentes especies de hongos causantes de una determinada enfermedad. Para el aislamiento de hongos patógenos causantes de antracnosis, se toma la muestra de tejido del fruto con presencia de la enfermedad, haciéndolo pasar por una desinfección con hipoclorito de sodio, para el posterior sembrado de fragmentos de tejido; para la identificación correcta de cada hongo patógeno aislado se debe purificar la muestra traspasando colonias del hongo con características deseadas, hacia un medio de cultivo estéril que permita su crecimiento, para su posterior incubación e identificación microscópica. En el Cuadro N° 4 se mencionan algunos estudios realizados donde se utilizan métodos de aislamiento e identificación morfológica de hongos patógenos.

### **3.12 MÉTODOS MOLECULARES DE IDENTIFICACIÓN**

Una de las tareas más grandes de la microbiología es implementar metodologías que permitan la identificación precisa de microorganismos. La identificación por medio de la taxonomía clásica de especies fúngicas se basa principalmente en el uso de características morfológicas. Sin embargo, estas características no permiten la identificación completa de especies relacionadas.

El desarrollo de técnicas de biología molecular para la diferenciación genética de especies ha resultado en avances sustanciales en la taxonomía debido a su especificidad y sensibilidad.

**Cuadro N° 4.** Métodos de aislamiento e identificación de hongos patógenos (14, 42, 44, 7)

	<b>Contreras, 2006</b>	<b>Molina, 2010</b>	<b>Núñez, 2012</b>	<b>Alvindia et al. 2000</b>
<b>Operaciones de aislamiento</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Lavado y secado.</li> <li>2. Obtención de tejido infectado.</li> <li>3. Desinfección con hipoclorito de sodio y enjuague con agua destilada estéril.</li> <li>4. Secado de fragmentos de tejido.</li> <li>5. Sembrado de los tejidos en agar papa dextrosa (PDA).</li> <li>6. Incubación a temperatura ambiente por 8 días.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Lavado y secado.</li> <li>2. Obtención de tejido infectado.</li> <li>3. Desinfección con hipoclorito de sodio y enjuague con agua destilada estéril.</li> <li>4. Eliminación del exceso de humedad.</li> <li>5. Sembrado en PDA con ácido láctico.</li> <li>6. Incubación a 20°C.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Toma de muestra (acérvulo) directamente de la lesión.</li> <li>2. Sembrado en PDA.</li> <li>3. Incubación a 28±2 °C por 24h.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Obtención de tejido infectado con diámetro de 1-2 cm<sup>2</sup></li> <li>2. Lavado del tejido bajo el agua de grifo por 5 minutos.</li> <li>3. Secado del tejido con papel filtro estéril.</li> <li>4. Sembrado en agar agua (AA)</li> <li>5. Incubación a 25°C</li> </ol>
<b>Operaciones de identificación</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Purificación de colonias con características de interés en PDA.</li> <li>2. Observación al microscopio con azul de lactofenol.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Resembrado y purificación de todos los aislamientos obtenidos en placas con PDA.</li> <li>2. Observación al microscopio con azul de lactofenol.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Observación del crecimiento en PDA</li> <li>2. Inactivación a -4 °C.</li> <li>3. Observación al microscopio con azul de tripano.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Presencia de crecimiento sustancial de los hongos.</li> <li>2. Transferencia de los hongos a tubos inclinados con Agar Papa Dextrosa (PDA).</li> </ol>
<b>Resultados</b>	Presencia de <i>Colletotrichum acutatum</i> y <i>C. gloesporoides</i> .	Presencia de <i>Colletotrichum acutatum</i> y <i>C. gloesporoides</i> .	<i>Colletotrichum capsici</i> , <i>C. gloesporoides</i> y <i>C. sp.</i>	<i>Fusarium</i> , <i>Colletotrichum</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Glomerella</i> , <i>Thielaviopsis</i> , <i>Lasiodiplodia</i> y <i>Phoma</i>

**Cuadro N° 5.** Métodos de identificación molecular (44, 1, 48)

<b>Métodos de identificación molecular</b>	<b>Núñez Oregel 2012</b>	<b>Accensi 1999</b>	<b>González Pombo, 2014</b>
<b>Metodologías de extracción de ADN</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Colectar 100 mg de tejido.</li> <li>2. Molienda del tejido usando nitrógeno líquido.</li> <li>3. Adición de buffer Dellaporta 100 mM Tris-HCl pH 8.0, 50 mM EDTA, 500 mM NaCl, 10 mM beta-mercaptoetanol (10 µL para 10 mililitros) 1.3% SDS.</li> <li>4. Calentamiento a 65°C por 10 minutos.</li> <li>5. Adición de ARNasa y vortex por 5 min.</li> <li>6. Adición de acetato de potasio 5M.</li> <li>7. Centrifugación 12000 rpm separar sobrenadante.</li> <li>8. Separación con cloroformo.</li> <li>9. Adición de etanol absoluto, incubación a -20°C por 10 min.</li> <li>10. Centrifugación y lavado con etanol</li> <li>11. Centrifugación y secado a 65°C.</li> <li>12. Resuspensión con agua ultrapura</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Inoculación de las cepas en tubos Eppendorf 1.5 mL con 500µL de caldo Sabourad (glucosa al 2% w/v; 1% peptona w/v) suplementado con cloranfenicol (1mg l-1).</li> <li>2. Incubación durante una noche en un agitador orbital a 300 rpm y 30°C.</li> <li>3. Recuperación de micelio después de la centrifugación.</li> <li>4. Lavado con NaCl 0.9% w/v.</li> <li>5. Congelación con nitrógeno líquido y trituración hasta polvo fino.</li> <li>6. Incubación del polvo durante 1 hora a 65°C en 500µL de buffer de extracción.</li> <li>7. Extracción del lisado con fenol:cloroformo (1:1, v/v), 3M NaOAc y 1 M NaCl .</li> <li>8. Recuperación del ADN por precipitación con isopropanol.</li> <li>9. Sedimentación y lavado con etanol 70% ( v/v)</li> <li>10. Secado al vacío y resuspensión en buffer TE (Tris-HCl 10mM, EDTA 1mM, pH 8).</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Trituración de la cepa patógena utilizando nitrógeno líquido.</li> <li>2. Extracción de ADN haciendo uso de buffer de lisis, incubación a 65°C por 1h.</li> <li>3. Adición de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1).</li> <li>4. Centrifugación a 10.000 rpm por 10 minutos.</li> <li>5. Adición de NaCl 1M y NaOAc 3M.</li> <li>6. Precipitación del ADN utilizando isopropanol frío, etanol 70%.</li> <li>7. Secado del precipitado en estufa a 45°C.</li> <li>8. Resuspensión en agua miliQ estéril y conservación a 4°C.</li> </ol>

Cuadro N° 5. Continuación

<b>Primers utilizados</b>	ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3')	ITS5 (5'GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG3') ITS4 (5' TCCTCCGCTTATTGATATGC 3')	ITS1 (5'TCCGTAGGTGAACCTGCGG3') ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3')
<b>Condiciones para amplificaciones por PCR</b>	Desnaturalización inicial 95°C 2 min Seguido de 30 ciclos de desnaturalización 95°C 1 min Alineamiento 55°C 30 s Extensión 72°C 1 min Extensión final 72°C 5 min Final 4°C segundos, 72°C 1 minuto y un ciclo final a 72°C durante 10 minutos	Pre-desnaturalización a 94° C, durante 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95° C/30 s, hibridación a 50° C/1 min y extensión a 72° C/1 min, además de una extensión final de 7 min a 72° C.	Desnaturalización de 5 minutos a 94°C, seguido por 35 ciclos de 95°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto, 72°C por 2 minutos y una extensión final de 72°C por 10 minutos.
<b>Región amplificada</b>	ITS-5.8S-ITS 	ITS rDNA 5.8S y rDNA 	Amplificación de la región ITS1-5.8S ADNr-ITS2 
<b>Equipo utilizado</b>	Termociclador Corbett Research, Mod. cG1-96	Perkin Elmer 2400 termociclador	Termociclador MultiGene Mini Labnet International, Inc

Los hongos implicados en enfermedades de antracnosis en plátano han sido escasamente identificados. Con el fin de lograr dicha identificación, y ampliar la información de la enfermedad para poder tratarla correctamente, la microbiología adopta metodologías de identificación molecular, las cuales abarcan desde el aislamiento del microorganismo que se desea identificar, la extracción de ADN, la amplificación de espaciadores transcritos internos (internal transcribed spacer, ITS por sus siglas en inglés) (ITS1-5.8S-ITS2) del ADN ribosomal (ADNr) por la reacción en cadena de la polimerasa (polymerase chain reaction, PCR por sus siglas en inglés), combinada con la secuenciación del amplicón y el análisis de las similitudes entre las secuencias obtenidas y aquellas que ya se encuentran en el banco de genes. En el Cuadro N° 5 se describen diferentes métodos utilizados en la identificación de los microorganismos patógenos productores de la enfermedad de antracnosis.

### **3.13 CONTROL BIOLÓGICO**

Control biológico se define como la reducción de la cantidad de inoculo o actividad productora de enfermedad de un patógeno por medio de uno o más organismos diferentes al hombre <sup>(15)</sup>. Entre los diferentes métodos biológicos, el uso de los microorganismos antagonistas como levaduras, hongos y bacterias (los cuales interfieren con la supervivencia o desarrollo de los patógenos), es muy prometedor y cada vez está aumentando su uso.

Actualmente, hay dos enfoques básicos sobre el uso de los antagonistas microbianos para el control de las enfermedades de postcosecha de frutas y verduras:

- 1) Uso de microorganismos aislados de la fruta que puedan servir como antagonistas contra agentes patógenos.

- 2) Uso de microorganismos no procedentes de la fruta que sean introducidos artificialmente en contra de los agentes patógenos de postcosecha.

En el Cuadro N° 6 se presentan los microorganismos antagonistas que se han estudiado y que han mostrado efectividad para el control de la enfermedad de antracnosis de frutas y verduras <sup>(44)</sup>.

### **3.14 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS ANTAGONISTAS**

La competencia de nutrientes y el espacio entre el patógeno y el antagonista son considerados como los principales mecanismos de control de los patógenos causantes de enfermedades postcosecha. Uno de los mecanismos de acción de los microorganismos antagonistas para suprimir la actividad de los agentes patógenos de postcosecha de frutas y hortalizas es la producción de antibióticos <sup>(37)</sup>; otro estudio demuestra una parasitación interfúngica entre el antagonista y el patógeno, tanto en medios artificiales, como en el sustrato natural <sup>(8)</sup>.

### **3.15 MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE ANTAGONISTAS**

Los microorganismos antagonistas juegan un papel muy importante como agentes de control biológico ante las enfermedades de postcosecha en las frutas. Estos microorganismos se pueden aislar de diversas fuentes: de la superficie del fruto, hojas, suelo, etc.

**Cuadro N° 6.** Microorganismos antagonistas utilizados en un control biológico exitoso contra la antracnosis postcosecha de frutas y verduras (24, 16, 35, 3, 18)

<b>Microorganismos Antagonistas</b>	<b>Enfermedad/ Patógeno</b>	<b>Frutas y verduras</b>
<i>Bacillus lincheniformis</i>	Antracnosis ( <i>Colletotrichum gloesporoides</i> ) Pudrición de la parte final del tallo ( <i>Dothiorella gregaria Sacc.</i> )	Mango
<i>Burkholderia ceparia</i>	Antracnosis ( <i>Colletotrichum musae</i> ) Pudrición de la parte final de la flor ( <i>Colletotrichum musae</i> )	Plátano
<i>Brevundomonas diminuta</i>	Antracnosis ( <i>Colletotrichum gloesporoides</i> )	Mango
<i>Candida membranifaciens</i>	Antracnosis ( <i>Colletotrichum gloesporoides</i> )	Mango
<i>Pestalotiopsis Neglecta</i>	Antracnosis ( <i>Colletotrichum gloesporoides</i> )	Albaricoque
<i>Trichoderma Harzianum</i>	Antracnosis ( <i>Colletotrichum musae</i> )	Plátano

Para la búsqueda de hongos que desarrollen un papel antagonista frente a la enfermedad de antracnosis en plátano, se emplean métodos de aislamiento a partir de la flora epífita de los frutos, estos métodos se basan en el arrastre de la flora microbiana superficial del fruto utilizando agua estéril o un tampón fosfato y la posterior preparación de diluciones seriadas que permitirán reducir la carga bacteriana a una menor concentración, para llevar a cabo la inoculación e incubación de las placas que contienen el posible candidato a antagonista de la enfermedad (ver Cuadro N° 7).

**Cuadro N° 7** Métodos de aislamiento de antagonistas (8, 52, 20)

	<b>Alvindia et al., 2008</b>	<b>Salas Bastos, A. 2011</b>	<b>Encina, 2009</b>
<b>Operaciones de aislamiento</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Limpieza de la superficie de la fruta con torundas de algodón estériles humedecidas en agua.</li> <li>2. Preparación de solución madre (Torundas de algodón en 100 mL de agua destilada).</li> <li>3. Inoculación de la solución madre en agar PDA.</li> <li>4. Incubación de las placas.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Lavado de las muestras con buffer fosfato en cabina de flujo laminar.</li> <li>2. Diluciones seriadas.</li> <li>3. Inoculación de la solución de lavado en tubos Eppendorf con agua destilada esterilizada.</li> <li>4. Plaqueado de las diluciones en PDA.</li> <li>5. Incubación de las placas.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Lavado de las muestras en agua esteril.</li> <li>2. Centrifugación de una porción de la solución del lavado.</li> <li>3. Inoculación de la solución centrifugada del lavado en agar Papa zanahoria mediante la técnica de esparcido en placa.</li> <li>4. Incubación de las placas</li> </ol>
<b>Operaciones de identificación</b>	No se describen operaciones de identificación.	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Los aislamientos obtenidos son subcultivados.</li> <li>2. Montajes de fijación en gota con agua destilada y azul de metileno.</li> <li>3. Observación directa al microscopio a distintos tiempos de incubación.</li> <li>4. Comparación con parámetros de reconocimiento establecidos.</li> <li>5. Pruebas de antagonismo.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Selección de colonias fúngicas.</li> <li>2. Tinción con lactofenol y azul de algodón.</li> <li>3. Identificación según PCA y según monografías.</li> </ol>
<b>Resultados</b>	<i>Clonostachy byssicola</i> , <i>C.pallescens</i> , <i>Penicillium oxalicum</i>	<i>Cladosporium sp</i>	<i>Cladosporium cladosporioides</i> , <i>C. sphaerospermu</i> , <i>Geotrichum candidum</i> , <i>Penicillium olsonii</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>

**CAPÍTULO IV**  
**DISEÑO METODOLÓGICO**

## 4.0 DISEÑO METODOLÓGICO

### 4.1 TIPO DE ESTUDIO

El estudio que se realizó es de tipo experimental, transversal y exploratorio

- **Experimental:** debido a que se aislaron hongos patógenos a partir del fruto del plátano, y hongos con carácter antagónico, los cuales se analizaron mediante metodologías microbiológicas y moleculares.
- **Transversal:** los aislamientos de los microorganismos de interés en la investigación se realizaron en un periodo de agosto a octubre, época donde predomina el clima lluvioso. Con base a los resultados obtenidos de los aislamientos se seleccionaron los hongos más patógenos y los hongos y levaduras antagonistas.
- **Exploratorio:** debido a la escasa investigación de esta problemática en El Salvador, se desarrolló el estudio con el fin de identificar aspectos fundamentales del patógeno responsable de antracnosis en plátano que faciliten el control de esta enfermedad.

### 4.2 INVESTIGACIÓN BIBLIOGRÁFICA

La búsqueda bibliográfica constituyó la base esencial para desarrollar la investigación, creando una base de datos con información de investigaciones sobre el tema en estudio. Esta investigación se llevó a cabo en las siguientes bibliotecas:

- “Doctor Benjamín Orozco” de la facultad de Química y Farmacia de la Universidad de El Salvador.

- Ciencias Agronómicas de la Universidad de El Salvador.
- “Enrique Álvarez Córdova” Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal CENTA.
- Internet.

### **4.3 INVESTIGACIÓN DE CAMPO**

#### **4.3.1 Universo**

El universo de la investigación lo constituyeron los frutos de plátano cosechados en la Cooperativa San Carlos, cantón San Rafael, municipio El Paisnal, departamento de San Salvador.

#### **4.3.2 Muestra**

La Cooperativa San Carlos realiza una serie de tratamientos con pesticidas para evitar enfermedades en el fruto del plátano, entre estas la antracnosis, debido a esto los frutos maduros con signos de antracnosis dentro de la plantación son muy escasos, cabe mencionar que la Cooperativa realiza una identificación de la etapa de maduración con cintas de diferentes colores ya que el crecimiento del fruto dentro de toda la plantación es irregular, la cosecha del fruto se realiza en la etapa de sazónamiento del plátano. Basados en este tratamiento se seleccionaron 3 tipos de muestras:

- 6 frutos maduros con presencia de la enfermedad, para el aislamiento de hongos patógenos,

- 28 frutos maduros sanos para realizar la prueba de patogenicidad.
- 20 frutos jóvenes (verdes) sanos para el aislamiento de hongos antagonistas.

#### **4.3.3 Tipo de muestreo**

Al ser un estudio cuya selección se basó en diferentes características específicas y en la disponibilidad del fruto requerido para cada prueba se realizó un muestreo especial:

- 1) Muestreo no probabilístico y por conveniencia para el aislamiento de patógenos. Requisito de selección: plátanos maduros que presentaran manchas características de las lesiones causadas por antracnosis.
- 2) Muestreo aleatorio simple para prueba de patogenicidad. Criterio de selección: plátanos maduros sin señales de daño por antracnosis.
- 3) Muestreo por conveniencia para aislamiento de antagonistas. Criterio de selección: plátanos verdes sanos.

#### **4.3.4 Manipulación y transporte de las muestras**

Las muestras fueron tomadas directamente de la planta de plátano por los trabajadores de la Cooperativa, quienes colocaron 6 frutos maduros enfermos, 28 frutos maduros sanos y 20 frutos verdes sanos en bolsas plásticas para ser transportadas al laboratorio, donde fueron tratadas inmediatamente de acuerdo a la metodología descrita a continuación.

#### **4.4 PARTE EXPERIMENTAL**

La metodología de aislamiento de hongos patógenos se seleccionó a partir de los resultados obtenidos de los ensayos preliminares (Ver anexo N° 1), donde se evaluaron dos metodologías de aislamiento de las cuales se seleccionó el método de diluciones seriadas y la técnica de esparcido en placa ya que las diluciones permiten un crecimiento más adecuado para el aislamiento de mohos y levaduras. Una vez aislados los hongos (presuntamente patógenos) de los frutos maduros enfermos, se procedió a la determinación del grado de patogenicidad en frutos maduros sanos, de donde se seleccionaron 2 mohos de mayor patogenicidad en plátanos sanos heridos y que presentaron lesiones en plátanos sanos sin herir, para obtener su identificación morfológica y molecular. Para cada hongo aislado de los frutos verdes sanos (presuntamente antagonistas), se realizaron las pruebas de incubación dual con el moho más patógeno según los resultados obtenidos en la prueba de patogenicidad. Como se detalla a continuación:

##### **4.4.1 Aislamiento de hongos patógenos, causantes de antracnosis en plátano.**

**Diluciones seriadas** (ver anexo N° 4). <sup>(14)</sup>

##### **Procedimiento**

1. Lavar el plátano maduro con signos de antracnosis utilizando agua y jabón.
2. Secar con papel toalla estéril.
3. Con ayuda de un bisturí estéril cortar fragmentos de tejido infectado de 5x5 mm (manipular con pinzas estériles).
4. Preparar una solución de hipoclorito de sodio al 0.525 %.

5. Sumergir los fragmentos de tejido por 5 minutos en una caja de Petri con la solución de hipoclorito de sodio 0.525%.
6. Enjuagar 3 veces los fragmentos de tejido sumergiéndolos en agua destilada estéril.
7. Secar los fragmentos de tejido haciendo uso de papel toalla estéril, con el fin de eliminar los excesos de humedad que contribuyen con la contaminación del aislamiento (realizar en cámara de flujo laminar).
8. Introducir el equivalente a 1 gramo de fragmentos de tejido, en 9 mL de una solución estéril de plátano al 0.1% (ver anexo N°4). Incubar esta solución por 24 horas a temperatura ambiente (dilución  $10^{-1}$ ).
9. Realizar diluciones seriadas 1:10 del cultivo líquido realizado en el paso anterior, llegando hasta la dilución  $10^{-3}$ .
10. Sembrar por esparcido en placa cada dilución, pipeteando 0.1 mL de cada dilución en cajas de Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA) realizar por duplicado para cada dilución. Incubar a temperatura ambiente por 7 días.
11. Tomar con un asa metálica en punta esteril cada colonia con características macroscópicas distintas y aislar en el centro de las placas con PDA. (ver anexo N° 6).
12. Incubar a temperatura ambiente por 7 días.
13. Realizar controles ambientales del área de trabajo.

#### **4.4.2 Descripción morfológica de hongos presuntamente patógenos causantes de antracnosis.**

Esta caracterización morfológica se realizó para las colonias aisladas en el procedimiento de aislamiento de patógenos.

### **Podrecimiento**

1. Describir las características macroscópicas de los hongos aislados de las lesiones de antracnosis.
2. Caracterización microscópica: observar las estructuras de los hongos aislados utilizando un microscopio óptico, efectuando observaciones con el objetivo 100x (con aceite de inmersión) aplicando la siguiente técnica:
  - Seleccionar las colonias para realizar la caracterización microscópica.
  - Cortar segmentos de cinta adhesiva de aproximadamente 5 cm.
  - Pegar un segmento de cinta en un asa estéril.
  - Con el lado adhesivo de la cinta tocar la parte superior del hongo seleccionado.
  - Colocar una gota de lactofenol azul algodón en el portaobjetos.
  - Colocar la cinta sobre la gota de azul algodón de lactofenol.
  - Colocar un cubre objetos sobre la preparación.
  - Observar en microscopio con el objetivo 100x.

#### **4.4.3 Prueba de patogenicidad de hongos aislados de lesiones de antracnosis en plátano <sup>(6)</sup> (ver anexo N° 7)**

Se implementó este método utilizando plátanos maduros libres de antracnosis (Ver anexo N° 2) procedentes de la Cooperativa San Carlos, El Paisnal.

### **Procedimiento**

1. Limpiar la superficie de la cáscara de los plátanos utilizando torundas de algodón humedecidas con etanol al 70% para eliminar los contaminantes, enjuagar 3 veces en agua estéril para eliminar el alcohol restante en la superficie del fruto, y secar con papel toalla estéril.

2. Haciendo uso de diez alfileres (#1) firmemente atados con una goma previamente esterilizado en el mechero y enfriado, inducir dos heridas leves de aproximadamente 0.5 cm de diámetro con una distancia de 6 cm en uno de los plátanos y al otro plátano hacer una marca con una distancia de 6 cm haciendo uso de un marcador permanente (ambos plátanos deben estar libres de signos de antracnosis).
3. Tomar discos miceliales (0.5 cm de diámetro) desde el borde de las colonias de patógenos crecidas en PDA con 7 días de edad e inocularlas en los dos plátanos (herido y sano), en las marcas inducidas en el paso 2.
4. El control se trata con discos de PDA estériles en lugar del inóculo fúngico.
5. Mantener las muestras en bolsa plásticas estériles a temperatura ambiente.
6. Observar diariamente durante 4 días el desarrollo de los síntomas, levantando con una aguja estéril los discos miceliales PDA para realizar mediciones precisas de las lesiones.
7. Calcular la velocidad de ampliación de la lesión utilizando la siguiente formula:

$$VA = \left[ \frac{2 \times Gr_1}{1} \right] + \left[ \frac{2 \times (Gr_1 + Gr_2)}{2} \right] + \left[ \frac{2 \times (Gr_1 + Gr_2 + Gr_3)}{3} \right] + \left[ \frac{2 \times (Gr_1 + Gr_2 + Gr_3 + Gr_4)}{4} \right]$$

Donde:

VA: velocidad de ampliación.

Gr<sub>x</sub>: radio de la lesión después de la inoculación (para x los días 1 al 4)

2x: referencia a dos puntos de inoculación por fruta.

Se seleccionaron dos mohos con mayor ampliación de la lesión y se realizó la identificación morfológica y molecular.

#### 4.4.4 Identificación molecular de hongo patógeno causante de antracnosis

**Aislamiento de ADN.** (Ver anexo N° 10) <sup>(17)</sup>

##### **Procedimiento**

1. Cortar tres discos miceliales del patógeno procedentes de un cultivo en PDA de 7 días, colocarlos en un erlenmeyer con 100 mL de caldo Sabouraud e incubar por 7 días a temperatura ambiente.
2. Filtrar el micélio contenido en caldo Sabouraud con papel filtro Watman N°1 estéril.
3. Secar el micélio con ayuda de papel filtro Watman estéril.
4. Triturar el micelio con mortero y pistilo en presencia de nitrógeno líquido.
5. Pesar aproximadamente 0.05 g del polvo fino y transferirlos a tubos de microcentrífuga de 1.5 mL.
6. A cada tubo adicionar 750  $\mu$ L de solución Buffer de Extracción 1, adicionar 50  $\mu$ L de dodecilsulfato sódico al 20%, cerrar el tubo y mezclar con agitación vigorosa. Incubar en baño de agua a 65°C durante 10 minutos
7. Añadir 250  $\mu$ L de Acetato de Potasio 5M, mezclar bien con agitación vigorosa, y proceder a la incubación a 0°C (en hielo) durante 20 minutos.
8. Centrifugar la muestra a 13000 rpm 10 minutos, retirar cuidadosamente el sobrenadante utilizando una micropipeta, cuidando no llevar residuos sólidos y recibir en un tubo de microcentrífuga que contiene 700  $\mu$ L de isopropanol puro, invertir el tubo 20 veces para mezclar bien e incubar a -20°C durante un mínimo de 30 minutos.
9. Centrifugar la muestra a 12000 rpm durante 15 min, retirar cuidadosamente el sobrenadante y lavar el precipitado con etanol al 70%.
10. Retirar el etanol utilizando micropipeta e invertir el tubo sobre toallas de papel para secar durante 10 minutos.
11. Disolver el ADN con 700  $\mu$ L de TE, dejar reposar toda la noche a 4°C.

12. Centrifugar la muestra a 12000 rpm en una microcentrifuga durante 10 minutos para eliminar los residuos insolubles.
13. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrifuga y añadir 75  $\mu\text{L}$  de Acetato de Sodio 3M y 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol, mezclar bien invirtiendo el tubo 20 veces y dejar sedimentar el ADN durante 30 segundos utilizando una microcentrifuga a 12000 rpm, lavar con 500 mL de etanol al 70%, y secar completamente. Volver a disolver en 100  $\mu\text{L}$  de TE.
14. Verificar cantidad e integridad del ADN con Nanodrop y electroforesis.

#### Amplificación por PCR de regiones ITS. <sup>(44)</sup>

Para la identificación se utilizó la amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) del fragmento comprendido entre ITS-5.8S-ITS (ver Figura N° 12)



**Figura N° 12.** Fragmento amplificado ITS4-5.8S-ITS5

Con los primers ITS4 (5'CGTATAGTTATTCGCCTCCT3') e ITS5 (5'GGAACAATGCTGAAAATGAAGG3'). Para llevar a cabo la reacción de PCR se requirió una mezcla de reactivos (master mix) que se describe en el Cuadro N° 8.

**Cuadro N° 8.** Reactivos para PCR

Componentes de la Master Mix	Concentración deseada (30 µl)	Volúmenes
Agua ultrapura esterilizada	Cantidad necesaria para 30 µL	19.6 µL
Buffer estándar de PCR 10X (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	1x	3 µL
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	2 mM	1 µL
dNTPs 2 mM	0.2mM	1.2 µL
Iniciadores ITS5 e ITS4 20 pMol/µL cada uno	1 pmol	1.5 µL
Taq DNA polimerada 5 U/ µL (Apex Cat #: 42-8000B1)	1 U	0.2 µL
Muestra problema de ADN	100ng	2 µL

Se efectuó la reacción en un termociclador (Veriti termociclador applied biosystems) bajo las condiciones descritas en el Cuadro N° 9.

**Cuadro N° 9.** Condiciones para la reacción de PCR

CONDICIÓN	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
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

**Liofilización de las muestras**

Una vez llevada a cabo la amplificación, y con el objeto de eliminar el agua de las amplificaciones para asegurar una mayor estabilidad en el transporte, se realizó la liofilización de las muestras en el laboratorio del Centro Nacional de Investigaciones Científicas de El Salvador (CICES), siguiendo el procedimiento descrito a continuación:

### **Procedimiento**

1. Abrir los tubos de microcentrifuga que contienen las muestras de ADN amplificadas y taparlos con papel parafilm.
2. Con ayuda de un alfiler estéril, perforar el papel parafilm que recubre las muestras.
3. Congelar las muestras a -70 °C.
4. Colocar las muestras en el liofilizador, manteniendo la temperatura de estas.
5. Liofilizar a 23.6 Pa y -51.6 °C durante dos horas.
6. Retirar las muestras y empacar

Las muestras se enviaron a la empresa MacroGen en Corea del sur (<https://dna.macrogen.com/eng/index.jsp>), a la cual se le solicitaron los servicios de purificación de la mezcla de reacción y secuenciación estándar (Método Sanger). Previo al envío se reconstituyó una parte de la muestra liofilizada para comprobar, mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, que la liofilización no daña la integridad del producto de PCR.

Los datos de la secuenciación enviada por la empresa MacroGen se ingresó al Banco de genes (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) para poder definir la identidad de los patógenos.

#### **4.4.4 Screening y aislamiento de hongos epifitos antagonistas en el plátano. (ver anexo N° 8). (8)**

### **Procedimiento**

1. Humedecer torundas de algodón con agua esterilizada y frotarlas sobre la superficie del plátano sano con ayuda de pinzas estériles, realizar este procedimiento para 10 plátanos, y juntar las torundas de algodón en un

Erlenmeyer que contenga 100 mL de agua estéril y agitar. Realizar por duplicado.

2. Con una pipeta estéril tomar 1 mL de la solución anterior y trasladarlo a un tubo que contenga 9 mL de una solución diluida de plátano estéril al 0.1% (dilución  $10^{-1}$ ).
3. Hacer diluciones seriadas hasta obtener la dilución  $10^{-3}$ .
4. Tomar 0.1 mL de cada solución utilizando una pipeta estéril e inocular por esparcido las placas de Petri que contienen Agar Papa Dextrosa.
6. Hacer 2 réplicas por cada dilución.
7. Incubar por 3-5 días a temperatura ambiente, hacer por duplicado el procedimiento.
8. Describir morfológicamente cada hongo presente en las placas, utilizando la técnica de levantamiento con cinta adhesiva y tinción con azul de lactofenol.
9. Aislar cada hongo con características diferentes utilizando un asa metálica y sembrarlos en placas de PDA.

#### **4.4.5.1 Prueba de incubación dual.** <sup>(8)</sup>

Para cada cepa aislada presuntamente antagonista se realizó la prueba de incubación dual, contra el hongo que presentó mayor patogenicidad.

Se realizaron dos metodologías para esta prueba, la primera utilizando mohos y la segunda utilizando levaduras presuntamente antagonistas.

#### **Metodología de incubación dual para mohos presuntamente antagonistas.**

(Ver anexo N° 9)

#### **Procedimiento**

1. Sembrar los hongos candidatos a antagonistas en agar PDA e incubar a temperatura ambiente por 7 días.

2. Sembrar el hongo patógeno en agar PDA e incubar a temperatura ambiente por 7 días.
3. Cortar un tapón micelial de 4 mm de diámetro a partir de las placas que contienen el patógeno de 7 días de incubación y sembrarlo al centro de una placa que contenga PDA.
4. Cortar 3 taponos miceliales con 4 mm de diámetro del antagonista a partir de las placas con 7 días de incubación y sembrarlos en la placa con PDA a 1 cm equidistante de la periferia de la placa y equidistantes del patógeno.
5. Cortar un tapón micelial del patógeno y sembrarlo en el centro de una placa con PDA, este servirá como control.
6. Incubar las placas a temperatura ambiente por 7 días.
7. Calcular la inhibición de crecimiento con la fórmula:  $K_r - r_1 / K_r \times 100 = IC$

Dónde:

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

$r_1$ =margen de distancia del crecimiento de hongos desde el centro hasta la dirección del antagonista.

### **Metodología de incubación dual para levaduras presuntamente antagonistas.** (Ver anexo N° 9)

#### **Procedimiento**

1. Sembrar las levaduras presuntamente a antagonistas en agar PDA por estriado triple e incubar a temperatura ambiente por 5 días.
2. Sembrar el hongo patógeno en agar PDA e incubar a temperatura ambiente por 7 días.
3. Tomar una colonia aislada de la levadura presuntamente antagonista y sembrar uniformemente en un tercio de la placa que contiene agar PDA, incubar la placa por 48 horas a temperatura ambiente.

4. Cortar un tapón micelial de 4 mm de diámetro a partir de las placas que contienen el patógeno de 7 días de incubación en agar PDA.
5. Sembrar el tapón micelial que contiene al patógeno en el centro de la placa de PDA donde se encuentra sembrado la levadura.
6. Realizar un control de crecimiento inoculando en el centro de una placa con agar PDA un tapón micelial del patógeno de 4 mm de diámetro (control).
7. Incubar las placas a temperatura ambiente por 7 días.
8. Calcular la inhibición de crecimiento con la fórmula:  $IC = \frac{K_r - r_1}{K_r} \times 100$

Dónde:

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

$r_1$ = margen de distancia del crecimiento de hongos desde el centro hasta la dirección del antagonista.

**CAPÍTULO V**  
**RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

## **5.0 RESULTADOS Y DISCUSION DE RESULTADOS**

### **5.1 Cultivos microbiológicos de hongos presentes en lesiones de antracnosis en plátano proporcionados por la Cooperativa San Carlos en el municipio de El Paisnal.**

Se implementó el método de diluciones seriadas y la técnica de esparcido en placa, utilizando solución de plátano al 0.1% (ver Anexo N° 1). Este método permitió el crecimiento de microorganismos de interés y al mismo tiempo facilitó su aislamiento. Para la recolección de la muestra se buscaron plantas con frutos de plátano en su etapa de maduración y con signos de antracnosis, cabe mencionar que la Cooperativa San Carlos, implementa controles de plagas en la siembra, y reduce al mínimo la cantidad de plátanos infectados. En el Cuadro N°10 se describe el crecimiento obtenido para cada placa a partir de las cuales se aislaron colonias de mohos y levaduras para realizar caracterización morfológica macroscópica y microscópica, y comprobar su patogenicidad en plátanos maduros sanos.

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 como se describen a continuación.

**Cuadro N° 10.** Resultados del aislamiento por diluciones seriadas (solución de plátano al 0.1%) y esparcido en placa

Número de muestra	Dilución 10 <sup>-1</sup>		Dilución 10 <sup>-2</sup>		Dilución 10 <sup>-3</sup>	
	Placa A	Placa B	Placa A	Placa B	Placa A	Placa B
Plátano 1	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento
Plátano 2	No hay crecimiento	Colonia pequeña con aspecto algodonoso con micelio aéreo de color blanco	No hay crecimiento	No hay crecimiento	No hay crecimiento	Colonia puntiforme, cóncava, de color naranja brillante
Plátano 3	Colonias de aspecto esponjoso, con micelio aéreo de color blanco y en el centro presentan color naranja	Colonias de aspecto esponjoso, con micelio aéreo de color blanco y en el centro presentan color naranja	No hay crecimiento	No hay crecimiento	Colonia puntiforme cóncava y brillante de color naranja claro	Colonia puntiforme cóncava y opaca de color blanco
						Colonia puntiforme cóncava de color naranja opaco
Plátano 4	Colonia de aspecto algodonoso con micelio aéreo de color blanco	No hay crecimiento	Colonia de aspecto algodonoso y micelio aéreo de color blanco	Colonia de aspecto algodonoso y micelio	No hay crecimiento	Colonia algodonosa en forma de estrella de color blanco

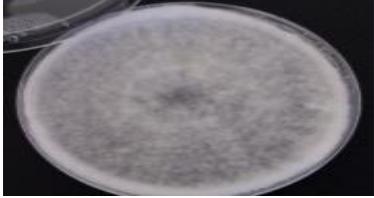
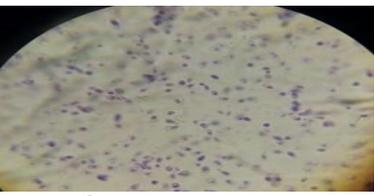
Cuadro N° 10. Continuación

Número de muestra	Dilución 10 <sup>-1</sup>		Dilución 10 <sup>-2</sup>		Dilución 10 <sup>-3</sup>	
	Placa A	Placa B	Placa A	Placa B	Placa A	Placa B
Plátano 4	_____	_____	_____	_____	_____	Colonia puntiforme de color blanco opaca
Plátano 5	<b>No hay crecimiento</b>	Colonia de aspecto algodonoso, con micelio aéreo de color naranja con el centro blanco	<b>No hay crecimiento</b>	<b>No hay crecimiento</b>	<b>No hay crecimiento</b>	<b>No hay crecimiento</b>
Plátano 6	<b>No hay crecimiento</b>	<b>No hay crecimiento</b>	Colonia puntiforme de aspecto rugoso, de color naranja opaco	<b>No hay crecimiento</b>	<b>No hay crecimiento</b>	<b>No hay crecimiento</b>

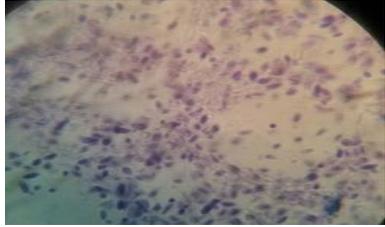
## 5.2 Descripción morfológica de cepas aisladas

El Cuadro N°11 describe la caracterización morfológica macroscópica y microscópica utilizando el método de levantamiento con cinta adhesiva y tinción con lactofenol azul de algodón.

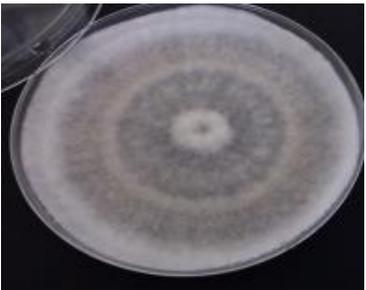
**Cuadro N° 11.** Descripción macroscópica y microscópica de presuntos patógenos

Número de cepa/ código	Descripción macroscópica	Descripción microscópica
<p style="text-align: center;"><b>1</b> (2 10<sup>-1</sup> B)</p>	 <p>Micelio aéreo algodonoso y de color blanco, muestra una coloración más densa en la periferia, mientras que al centro muestra un delicado micelio menos denso.</p>	 <p>Hifas hialinas, conidióforos septados, clamidosporas en cadena.</p>
<p style="text-align: center;"><b>2</b> (2 10<sup>-3</sup> B)</p>	 <p>Colonias con aspecto liso, céreo y naranja.</p>	 <p>Conidios ovalados.</p>
<p style="text-align: center;"><b>3</b> (3 10<sup>-1</sup> A)</p>	 <p>Micelio aéreo algodonoso irregular color naranja en la periferia y con centro blanco.</p>	 <p>Hifas cenocíticas, conidióforos, esporas.</p>

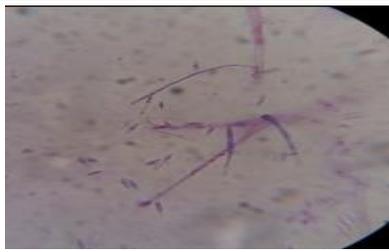
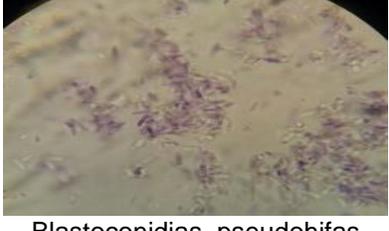
Cuadro N° 11. Continuación

Número de cepa/ código	Descripción macroscópica	Descripción microscópica
<p style="text-align: center;"><b>4</b> (3 10<sup>-1</sup> A)</p>	 <p style="text-align: center;">Moho esponjoso irregular de color blanco en la periferia con centro naranja.</p>	 <p style="text-align: center;">Se observa un conidióforo, fiálide, conidios en racimo y esporas.</p>
<p style="text-align: center;"><b>5</b> (3 10<sup>-1</sup> B)</p>	 <p style="text-align: center;">Moho con pliegues y bordes irregulares, de color blanco en el centro y de color naranja claro aterciopelado en la periferia.</p>	 <p style="text-align: center;">Hifas septadas, ramificadas, conidióforo, conidios en cadena.</p>
<p style="text-align: center;"><b>6</b> (3 10<sup>-3</sup> A)</p>	 <p style="text-align: center;">Levadura lisa, opaca y puntiforme de color salmón.</p>	 <p style="text-align: center;">Conidios y pseudohifas</p>
<p style="text-align: center;"><b>7</b> (3 10<sup>-3</sup> B)</p>	 <p style="text-align: center;">Levadura puntiforme de color crema, opaca y cóncava</p>	 <p style="text-align: center;">Conidios alargados.</p>

Cuadro N° 11. Continuación

Número de cepa/ código	Descripción macroscópica	Descripción microscópica
<p style="text-align: center;"><b>8</b> (4 10<sup>-1</sup> A)</p>	 <p style="text-align: center;">Moho color blanco con micelio aéreo algodonoso.</p>	 <p>Hifas septadas, hialinas; ausencia de conidiosporas; Arthroconidias rectangulares, no alteradas, liberadas por la fisión de las paredes dobles; ausencia de blastoconidias.</p>
<p style="text-align: center;"><b>9</b> (4 10<sup>-2</sup> B)</p>	 <p style="text-align: center;">Colonia de color blanco con intensidades diferentes de coloración desde el centro hacia la periferia, de aspecto sedoso</p>	 <p style="text-align: center;">Hifas cenocíticas, conidióforo, esporas.</p>
<p style="text-align: center;"><b>10</b> (4 10<sup>-3</sup> B I)</p>	 <p style="text-align: center;">Color blanco con distintas pigmentaciones a lo largo del radio de la colonia con micelio aéreo velloso, y con un centro algodonoso.</p>	 <p style="text-align: center;">Hifas septadas, esporas</p>

Cuadro N° 11. Continuación

Número de cepa/ código	Descripción macroscópica	Descripción microscópica
<p style="text-align: center;"><b>11</b> (4 10<sup>-3</sup> B II)</p>	 <p style="text-align: center;">Moho redondo pequeño, de aspecto compacto de color blanco, cóncavo</p>	 <p style="text-align: center;">Esporas, hifas cenocíticas, ascas. Hifas septadas.</p>
<p style="text-align: center;"><b>12</b> (4 10<sup>-3</sup> B III)</p>	 <p style="text-align: center;">Levadura irregular de color naranja opaca.</p>	 <p style="text-align: center;">Conidias, pseudohifas.</p>
<p style="text-align: center;"><b>13</b> (5 10<sup>-1</sup> B)</p>	 <p style="text-align: center;">Color de rosado a anaranjado produce un delicado micelio aéreo corto</p>	 <p style="text-align: center;">Hifas septadas, esporas fiálides ahusadas que dan origen a cadenas de conidias.</p>
<p style="text-align: center;"><b>14</b> (6 10<sup>-2</sup> A)</p>	 <p style="text-align: center;">Levadura puntiforme color naranja opaca, cóncava</p>	 <p style="text-align: center;">Blastoconidias, pseudohifas</p>

De acuerdo con las descripciones morfológicas macroscópicas y microscópicas realizadas a las colonias aisladas revelan que, dentro de los patógenos presentes en los plátanos afectados por la antracnosis en la Cooperativa San Carlos, se pueden encontrar principalmente especies con características correspondientes a hongos del género *Fusarium*, por ejemplo las muestras 1, 4, 5, 8 y 13 que presentan al menos una de las siguientes características: hifas septadas y los conidióforos en racimos de macroconidias, clamidosporas y microconidios; y del género *Colletotrichum*, por ejemplo las muestras 5 y 7 que presentan al menos una de las siguientes características: hifas septada, conidias hialinas ovoides y oblongadas (6, 14, 27, 44). Por lo que se sugiere que los hongos aislados que se presumen son patógenos en plátano, pertenecen a los géneros *Fusarium* y *Colletotrichum*.

Cabe resaltar que según estudios realizados en Filipinas los géneros *Fusarium* y *Colletotrichum*, se encuentran entre los hongos más patógenos para el fruto del plátano (6).

### **5.3 Prueba de patogenicidad**

A cada levadura y moho aislado se le evaluó su patogenicidad en plátanos maduros libres de antracnosis (sanos) y plátanos maduros con heridas inducidas. Se determinó cuáles mohos y levaduras aisladas promovían el crecimiento de síntomas de antracnosis, es decir, que se pueden considerar patógenos. En la Tabla N° 1 y N° 2 se presentan las mediciones tomadas diariamente para esta prueba y la velocidad de amplitud de la lesión para cada cepa aislada considerando patógenas aquellas que presentaron una velocidad de amplitud de la lesión en plátanos sanos mayor a 0 cm y en plátanos heridos mayor a 0.5 cm.

Tabla N°1. Mediciones diarias y valores de velocidad de amplitud de lesión.

Cepa	Día	Sano (cm)		Prom.	VA(4)	Herido (cm)		Prom.	VA (4)
1	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.5
	2	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	
	3	0.0	0.0	0.0		0.2	0.2	0.2	
	4	0.0	0.0	0.0		0.9	0.5	0.7	
2	1	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	1.7
	2	0.0	0.0	0.0		0.3	0.2	0.25	
	3	0.0	0.0	0.0		0.7	0.6	0.65	
	4	0.7	1.1	0.9		0.8	0.7	0.75	
3	1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	1.8
	2	0.0	0.0	0.0		0.3	0.2	0.25	
	3	0.0	0.0	0.0		0.6	0.6	0.6	
	4	0.6	0.6	0.6		1.2	1.0	1.1	
4	1	0.0	0.0	0.0	0.4	0.2	0.1	0.15	2.8
	2	0.0	0.0	0.0		0.4	0.2	0.3	
	3	0.0	0.0	0.0		1.0	0.6	0.8	
	4	0.7	0.9	0.8		1.2	1.0	1.1	
5	1	0.0	0.0	0.0	0.2	0.2	0.0	0.1	2.2
	2	0.0	0.0	0.0		0.5	0.2	0.35	
	3	0.0	0.1	0.05		0.6	0.5	0.55	
	4	0.3	0.2	0.25		0.7	0.7	0.7	
6	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1
	2	0.0	0.0	0.0		0.2	0.1	0.15	
	3	0.0	0.0	0.0		0.5	0.3	0.4	
	4	0.0	0.0	0.0		0.5	0.6	0.55	
7	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.8
	2	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	
	3	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	
	4	0.0	0.0	0.0		1.4	1.7	1.55	
8	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.2	0.15	2.4
	2	0.0	0.0	0.0		0.4	0.3	0.35	
	3	0.0	0.0	0.0		0.6	0.5	0.55	
	4	0.0	0.0	0.0		0.8	0.6	0.7	
9	1	0.0	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0	0.0
	2	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	
	3	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	
	4	2.2	2.0	2.1		0.0	0.0	0.0	
10	1	0.0	0.0	0.0	0.9	0.0	0.0	0.0	0.5
	2	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	
	3	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	
	4	2.0	1.7	1.85		0.9	1.0	0.95	
11	1	0.0	0.0	0.0	0.6	0.1	0.2	0.15	2.3
	2	0.0	0.0	0.0		0.3	0.3	0.3	
	3	0.0	0.0	0.0		0.4	0.4	0.4	
	4	1.1	1.1	1.1		1.2	1.1	1.15	

Tabla N° 1. Continuación

Cepa	Día	Sano (cm)		Prom.	VA(4)	Herido (cm)		Prom.	VA (4)
12	1	0.0	0.0	0.0	0.25	0.0	0.0	0.0	0.4
	2	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	
	3	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	
	4	0.5	0.5	0.5		0.7	1.0	0.85	
13	1	0.0	0.0	0.0	0.3	0.1	0.2	0.15	2.8
	2	0.0	0.0	0.0		0.4	0.4	0.4	
	3	0.0	0.0	0.0		0.6	0.7	0.65	
	4	0.7	0.5	0.6		1.0	1.1	1.05	
14	1	0.0	0.0	0.0	0.8	0.1	0.0	0.05	1.9
	2	0.0	0.0	0.0		0.3	0.2	0.25	
	3	0.0	0.0	0.0		0.6	0.5	0.55	
	4	2.0	1.1	1.55		0.7	0.7	0.7	
Control	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	2	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	
	3	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	
	4	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	

Tabla N°2. Velocidad de amplitud de la lesión (cm/día)

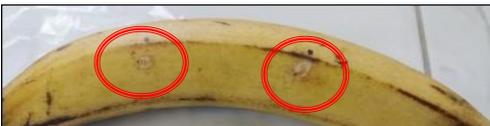
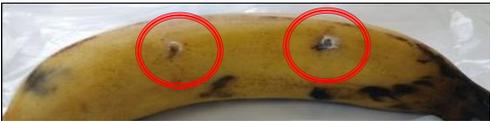
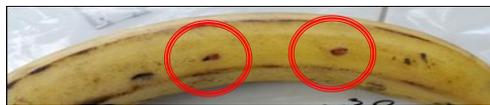
Número de cepa/ código	Patogenicidad	Velocidad de amplitud de la lesión (cm/día)
1 (2 10 <sup>-1</sup> B)		Sano 0.0
		Herido 0.5
2 (2 10 <sup>-3</sup> B)		Sano 0.4
		Herido 1.7

Tabla Nº 2. Continuación

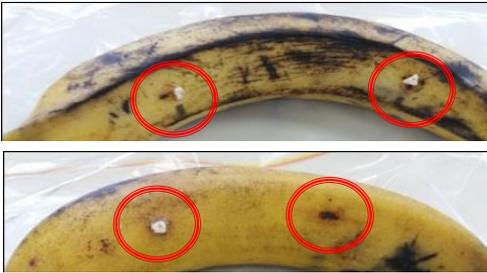
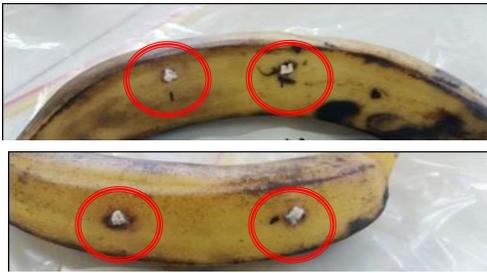
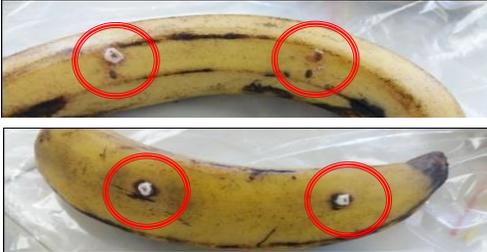
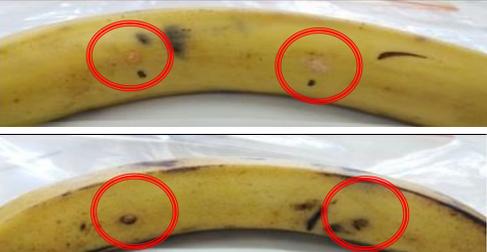
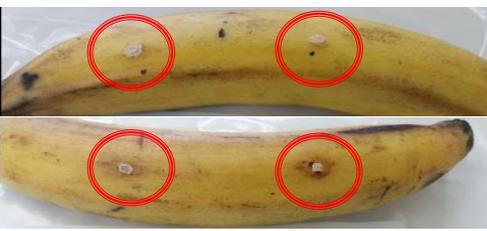
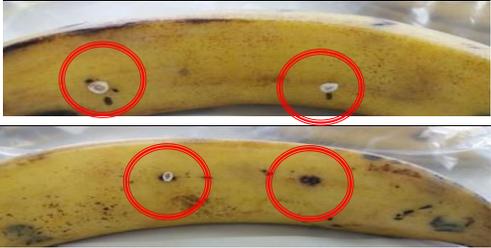
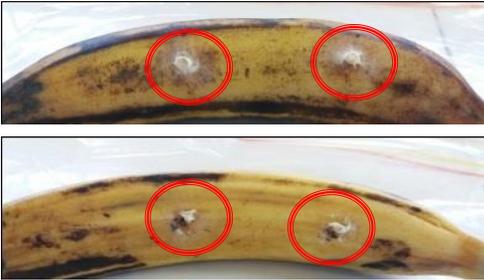
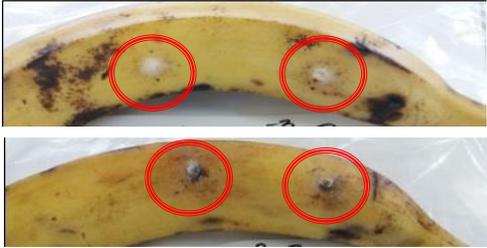
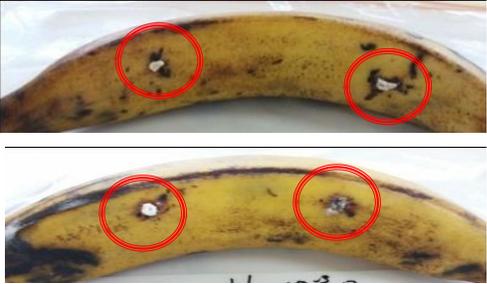
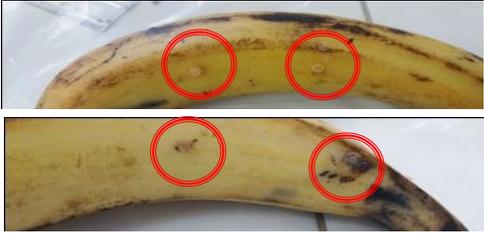
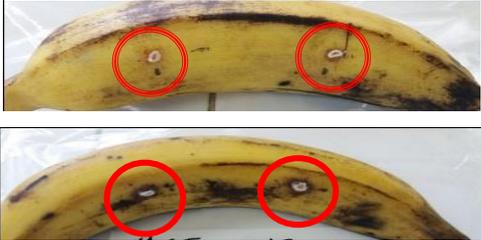
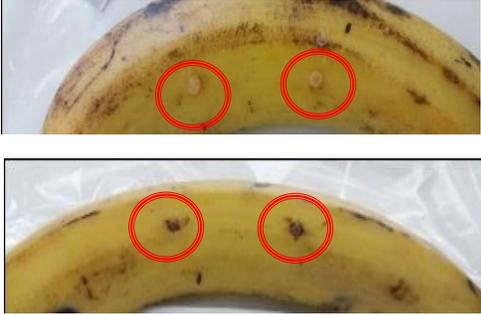
<p><b>3</b> (3 10<sup>-1</sup>A)</p>		<p>Sano 0.3</p> <p>Herido 1.8</p>
<p><b>4</b> (3 10<sup>-1</sup>A)</p>		<p>Sano 0.4</p> <p>Herido 2.8</p>
<p><b>5</b> (3 10<sup>-1</sup> B)</p>		<p>Sano 0.2</p> <p>Herido 2.2</p>
<p><b>6</b> (3 10<sup>-3</sup> A)</p>		<p>Sano 0</p> <p>Herido 1.1</p>
<p><b>7</b> (3 10<sup>-3</sup> B)</p>		<p>Sano 0</p> <p>Herido 0.8</p>

Tabla Nº 2. Continuación

<p><b>8</b> (4 10<sup>-1</sup> A)</p>		<p>Sano 0 Herido 2.4</p>
<p><b>9</b> (4 10<sup>-2</sup> B)</p>		<p>Sano 1.1 Herido 0</p>
<p><b>10</b> (4 10<sup>-3</sup> B I)</p>		<p>Sano 0.9 Herido 0.5</p>
<p><b>11</b> (4 10<sup>-3</sup> B II)</p>		<p>Sano 0.6 Herido 2.3</p>
<p><b>12</b> (4 10<sup>-3</sup> B III)</p>		<p>Sano 0.25 Herido 0.4</p>

**Tabla Nº 2.** Continuación

<p style="text-align: center;"><b>13</b> (5 10<sup>-1</sup> B)</p>		<p>Sano 0.3</p> <p>Herido 2.8</p>
<p style="text-align: center;"><b>14</b> (6 10<sup>-2</sup> A)</p>		<p>Sano 0.8</p> <p>Herido 1.9</p>

En cada prueba se tomaron en cuenta criterios cuantitativos y cualitativos para poder determinar la patogenicidad de los hongos, la velocidad de ampliación de la lesión es un método cuantitativo que proporciona información acerca del crecimiento diario del patógeno sobre la superficie de la cáscara de plátano, en cambio el método cualitativo es la simple observación del desarrollo de las lesiones y la coloración de las manchas producidas por los patógenos en las lesiones. Las lesiones causadas por hongos patógenos consisten en manchas circulares u ovals de color negro o café oscuro en los sitios donde se inocularon los hongos en la cáscara de los plátanos. Las características de las lesiones eran similares, sin embargo la velocidad de ampliación de la lesión y el diámetro final en el día 4 fueron diferente para cada hongo analizado. En el Cuadro Nº 12. Se presentan las características observadas de las lesiones que se formaron a partir de la inoculación de los hongos patógenos y el diámetro de las lesiones (tomado de la lesión al final de los 4 días), el cual demuestra el tamaño de la lesión producida por el hongo o levadura pasados los 4 días de incubación y da un

parámetro del daño que causa el patógeno sobre la superficie del plátano. Este diámetro consiste en la medición de la lesión el último día de inoculación sin tomar en cuenta las mediciones de los días anteriores.

**Cuadro N° 12.** Características de las lesiones

No. cepa	Descripción lesión	Medición (cm) plátanos heridos	Medición (cm) plátanos sanos
1	Mancha oscura circular	0.7	0.0
2	Mancha oscura circular	0.75	0.9
3	Mancha oscura circular	1.1	0.6
4	Mancha oscura circular	1.1	0.8
5	Mancha oscura circular	0.7	0.25
6	Mancha oscura circular	0.55	0.0
7	Mancha oscura al centro, alrededor una mancha café	1.55	0.0
8	Círculos negros pequeños y profundos	0.7	0.0
9	Manchas negras puntiformes poco profundas (en plátanos no heridos)	0.0	2.1
10	Puntos dispersos color café	0.95	1.85
11	Mancha oscura circular	1.15	1.1
12	Mancha oscura circular	0.15	0.5
13	Mancha oscura circular	1.05	0.6
14	Mancha negra amorfa	0.7	1.55

Graficando el tamaño de la lesión vrs tiempo (Ver figura N° 13) en la que se presenta el progreso de la lesión en plátanos heridos en los 4 días de incubación se observa que los hongos patógenos presentaron un crecimiento con un comportamiento exponencial en el tiempo. De los plátanos heridos, 12 presentaron crecimiento de la lesión mientras que en los plátanos sanos el crecimiento solo lo presentaron 10. Lo anterior puede suceder debido a que el moho o levadura encuentra en el plátano herido un medio más susceptible, provocando así un aumento de la lesión conforme aumenta de tiempo de incubación.

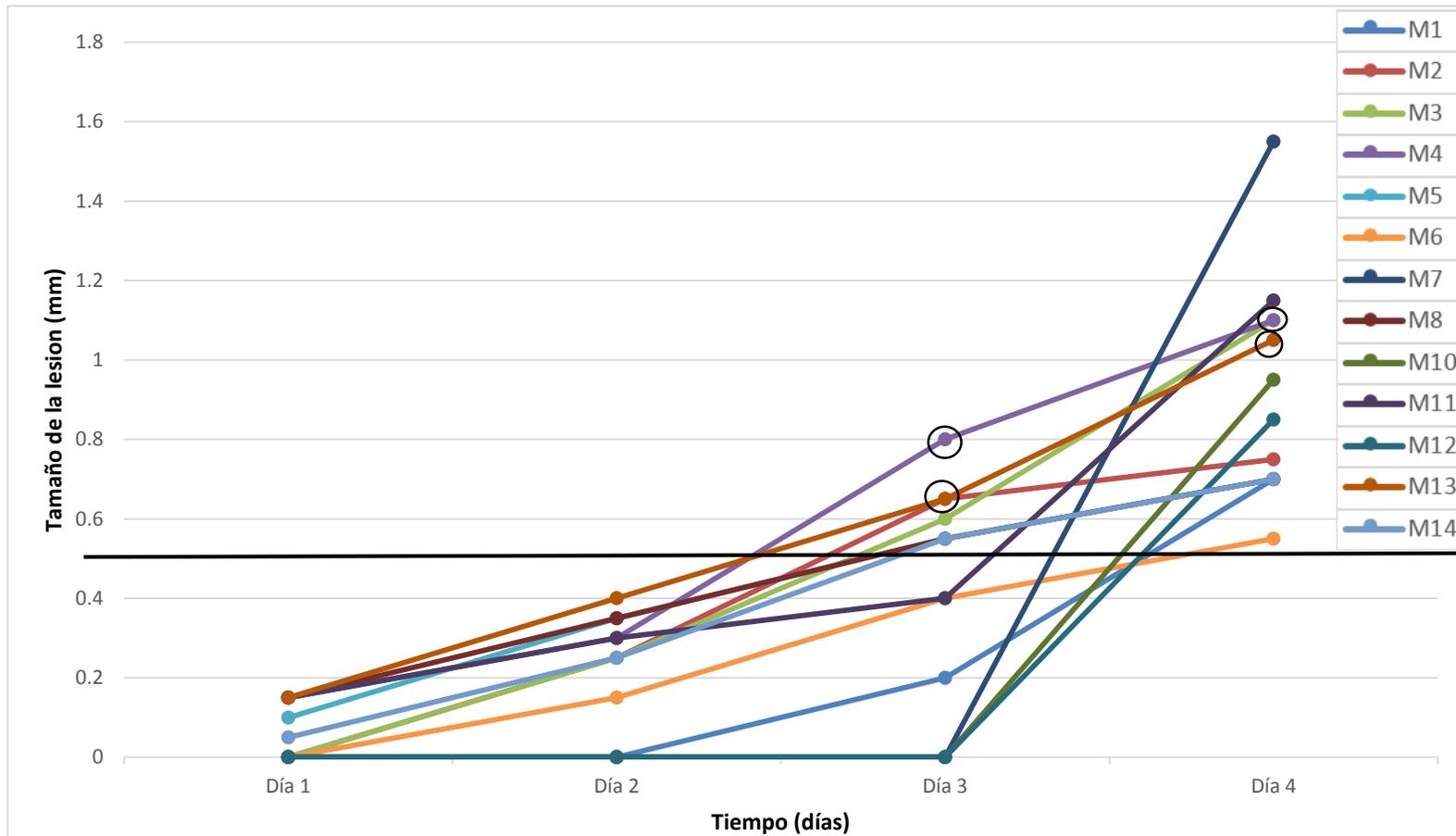
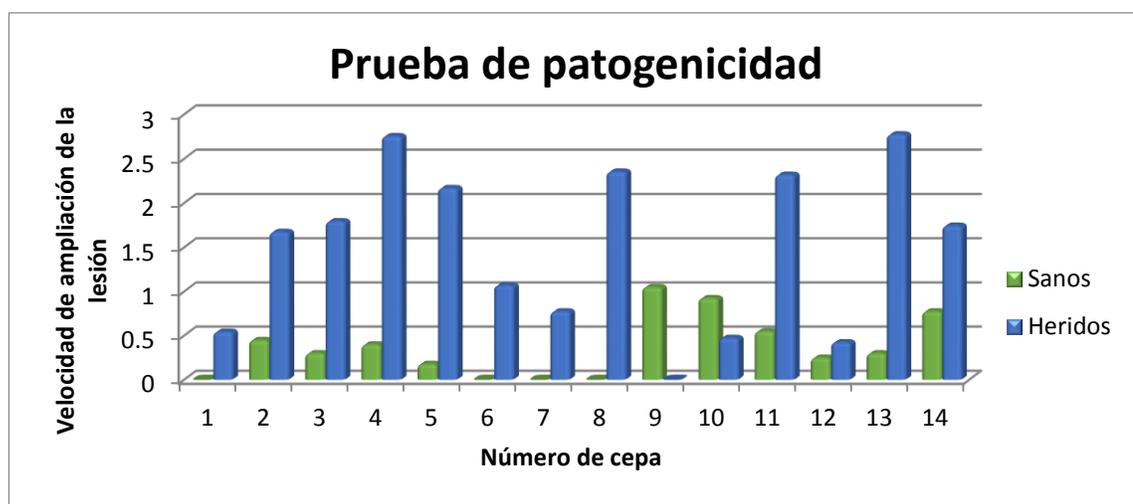


Figura N° 13. Progreso de la lesión en plátano herido durante 4 días.

Sin embargo no todos los mohos y levaduras sometidas a esta prueba demostraron la capacidad de crecer usando las heridas en los plátanos como sustrato (Ver tabla N° 2) esto sucede debido a que dentro de la composición de las cascara del plátano se encuentran sustancias antimicrobianas, metanol, etanol, pectinas y enzimas (39), a los que pueden ser susceptibles algunos de los microorganismos sometidos a esta prueba.

En plátanos sanos la cantidad de mohos y levaduras capaces de producir una lesión característica sobre la superficie de los plátanos fue menor, debido a que el plátano no poseía lesión que facilitara el establecimiento de la cepa.

Se consideran hongos no patógenos los que no inducen lesiones oscuras y no aumentan el diámetro de las heridas inducidas en la cáscara del fruto de plátano después de los 4 días de incubación, la figura N° 14 muestra la velocidad de ampliación de la lesión, demostrando que no todos los mohos y levaduras estudiados fueron capaces de provocar una lesión en los 4 días de incubación.



**Figura N° 14.** Velocidad de la lesión producida por los hongos patógenos en plátanos heridos y no heridos.

Los hongos que produjeron un tamaño de lesión menor o igual a 0.5 cm de diámetro en los plátanos heridos se consideran no patógenos debido a que este era el diámetro de las heridas inducidas, las muestras que presentaron patogenicidad son 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 11, 13 y 14. Para la selección de los hongos en plátanos no heridos, se consideraron todos aquellos que produjeron una mancha de color negro o café oscuro, muestras 2, 3, 4, 5, 9, 10, 11, 12, 13 y 14.

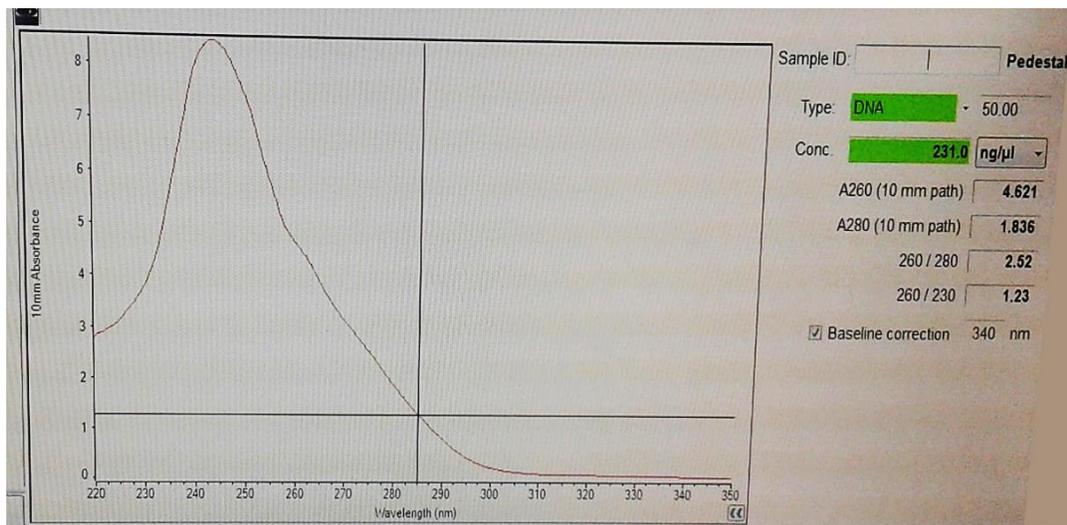
Las muestras N° 4 y 13 presentan mayores velocidades de amplitud de la lesión de 2.8 cm para ambas en plátanos heridos y aunque en plátanos sanos las velocidades no fueron tan altas (0.4 y 0.8 cm) si fue posible detectar lesiones demostrando que estos hongos son capaces de producir lesiones de antracnosis sin importar las condiciones de susceptibilidad del fruto.

Aunque se observaron hongos que produjeron lesiones de mayor tamaño que los hongos N° 4 y N° 13 en plátanos sanos, no produjeron lesiones en plátanos heridos, por lo que las velocidades de ampliación de la lesión en plátanos tanto sanos como heridos fueron los criterios que guiaron la selección de los aislados con mayor patogenicidad. Las muestras N° 4 y N° 13 cumplen con los dos criterios, provocando rápidamente lesiones que según las mediciones sugieren que con mayor tiempo de incubación podrían aumentar.

#### **5.4 Identificación molecular de patógenos aislados de las muestras de plátano con presencia de antracnosis**

Se realizó la extracción de ADN de los patógenos seleccionados en la prueba de patogenicidad (muestras N° 4 y N° 13) a partir de los micelios sembrados en agar sabouraud con 7 días de incubación, debido a que el patógeno 4 mostró una cantidad considerablemente mayor de micelio (el doble en comparación al

patógeno 13) fue necesario realizar 2 fracciones de extracción para la muestra 4. Se cuantificó la concentración y se analizó la pureza del ADN extraído usando un NanoDrop (NanoDrop 2000UV-Vis Spectrophotometer) (Ver figuras N° 15, 16 y 17) y Gel de Electroforesis (Ver figura N° 18). A pesar de que el gel de electroforesis demuestra la presencia de contaminantes en la muestra que podrían interferir en reacciones posteriores, las lecturas proporcionadas por el NanoDrop develaron la presencia de alta cantidad de ADN en las muestras extraídas, esto dio la pauta para amplificar por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) logrando así la obtención de los segmentos de ADN necesarios para la identificación de los patógenos aislados. En el cuadro N°11 se describen los resultados obtenidos del análisis de ADN por medio de NanoDrop.



**Figura N° 15.** Espectro obtenido por NanoDrop de la muestra 4.

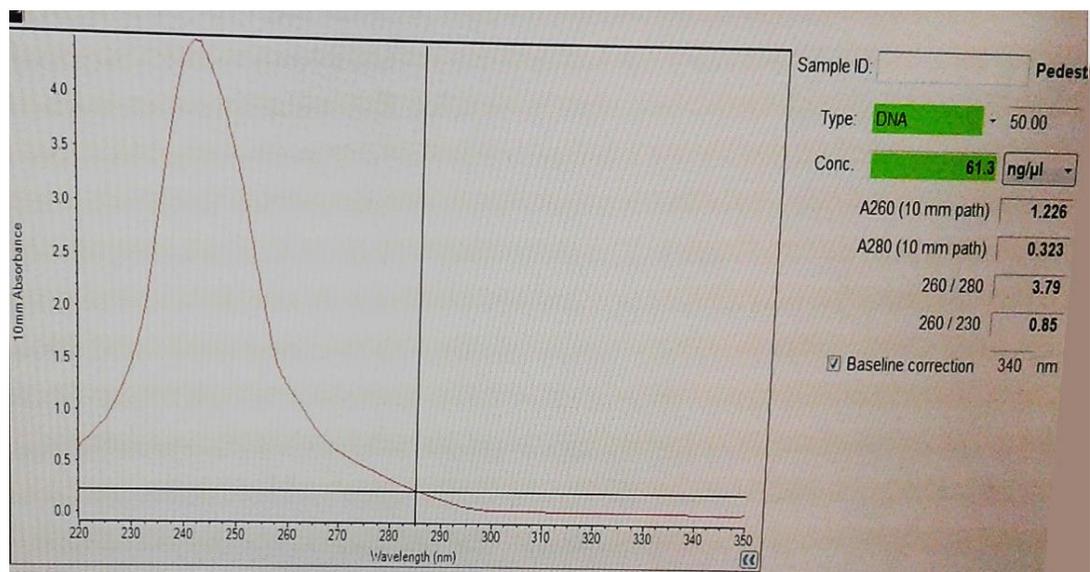


Figura N° 16. Espectro obtenido por NanoDrop de la muestra 4.

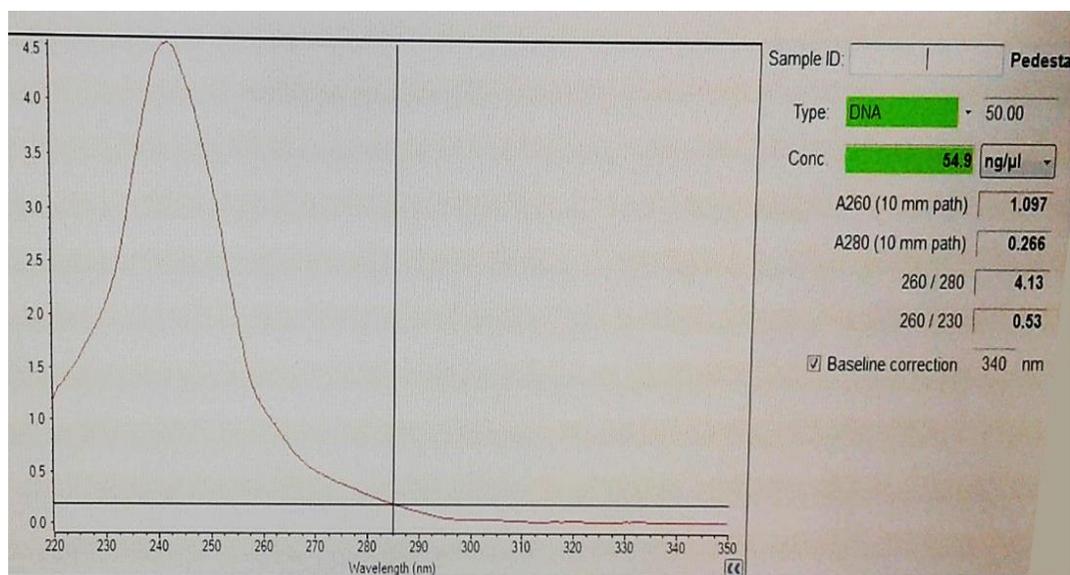
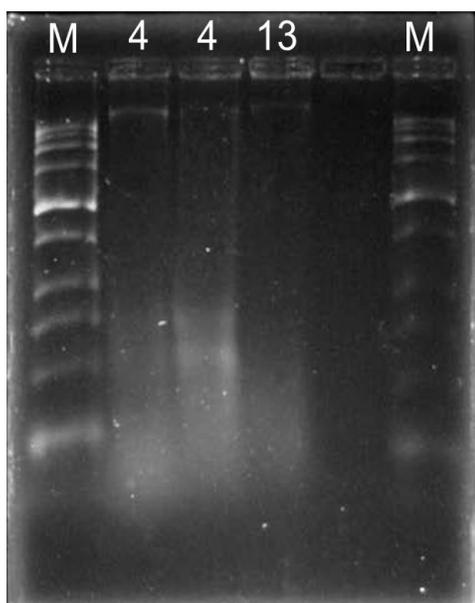


Figura N° 17. Espectro obtenido por NanoDrop de la muestra 13.



- M Marcador de peso molecular
- 4 ADN extraído del patógeno 4
- 13 ADN extraído del patógeno 13

**Figura N° 18.** Gel de electroforesis al 1% de agarosa para las muestras N° 4 y N° 13.

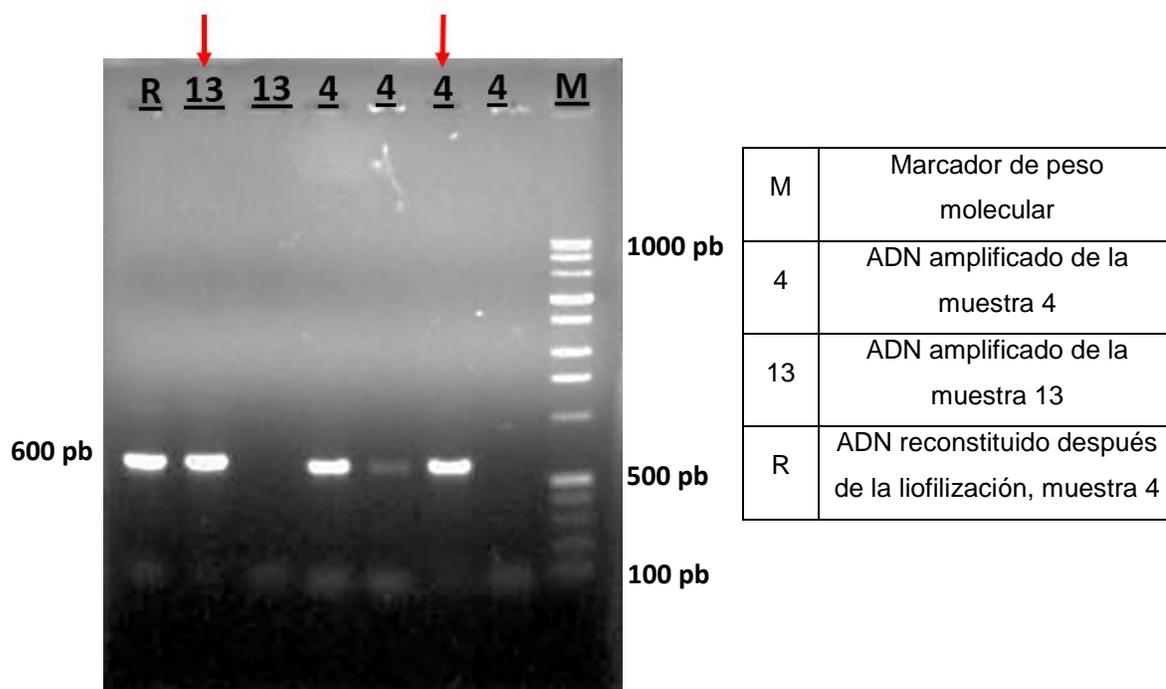
**Cuadro N°11.** Análisis de ADN en NanoDrop

Dato esperando (radio)	Muestra	Dato obtenido	Comentarios
(A 260/280) <b>1.8-2</b>	4.1	(A 260/280) <b>2.52</b> (A260/230) <b>1.23</b>	La relación A 260/280 > 2.1 indica una posible contaminación que podría deberse a la presencia de ARN en la muestra La relación A260/230 > 1.5 indica la presencia de contaminantes en la muestra como con sales, carbohidratos, fenoles.
	4.2	(A 260/280) <b>3.79</b> (A260/230) <b>0.85</b>	
(A260/230) <b>1.5-2.2</b>	13	(A 260/280) <b>4.13</b> (A260/230) <b>0.53</b>	

Los datos proporcionados por el análisis con NanoDrop indican la cantidad de ADN presente en las muestras extraídas de los dos patógenos (4 y 13) y datos

sobre su calidad, en general los valores altos de A 260/280 indican una posible contaminación con ARN y los valores bajos de A 260/230 indican presencia de contaminantes como con sales, carbohidratos, fenoles. Estos resultados sugieren que aunque el proceso de extracción de ADN puede mejorar (Ver anexo N° 11), en este caso ofreció un producto útil para procesamiento posterior.

El ADN obtenido fue amplificado utilizando un Termociclador (Veriti termociclador applied biosystems). Para verificar el resultado de la PCR se colocaron 2 microlitros de cada una de las reacciones en un gel de electroforesis con agarosa 1% (Ver figura N° 19).



**Figura N° 19.** Gel de electroforesis al 1% de agarosa para las muestras amplificadas por PCR.

En la figura N° 19 se muestra los productos de amplificación de PCR de la región ITS de los patógenos 4 y 13, se considera una amplificación exitosa ya que el tamaño estándar de ADN para esta secuencia en eucariotas oscila entre 500 y 800 pb, coincidiendo con la banda encontrada cuya longitud aproximada es de 600 pb. Las amplificaciones fueron liofilizadas y enviadas a MacroGen para que realizaran la limpieza y secuenciación de los productos de reacción, después de lo cual ellos enviaron los datos obtenidos mostrados en el cuadro N° 12.

**Cuadro N° 12.** Secuenciación de ADN (ver anexo N° 12)

Muestra	Secuencia de ADN
4	TTGCAAATGATCATAGCTGATCCGAGGTCACATTCAGAAAGTTGGGTTG TTTTACGGCGTGGCCTACGCTCCGTCCAGTGCGAGATGTTACTACTACG CAGAGGAGCCGGGGGCGAGACCGCCACTGTATTTGGGGCACGGCCGCCGC TGGAGGGACGGCCGATGCCCAACACCAAGCCCGGAGGGGCTTGAGGGATG TAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAGTACTGGCGGGCGCAATGT GCGTTCAAAGATTCGATGATTCCTGAATTCTGCAATTCACATTAATTAT CGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT GAAAGTTTTAATTGATTGTGTTTTCACTCAGAAGATACTGAAAATAACAG GTTTTGTTGGTCTCTGGCGGGCCGCTCCCGTGTTACGGGGAGGCGGGG GTCCGCCGAGGCAACGTTGTAGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGTTGTA AACTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGTTAAAA TTTTTAAATCAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAGC
13	GTGTTTCGAGATTCTTCTCCTGATCGAGGTCACATTCAGAAAGTTGGGTTG TTTTACGGCGTGGCCTACGCTCCGTCCAGTGCGAGATGTTACTACTACG CAGAGGAGCCGGGGGCGAGACCGCCACTGTATTTGGGGCACGGCCGCCGC TGGAGGGACGGCCGATGCCCAACACCAAGCCCGGAGGGGCTTGAGGGATG TAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAGTACTGGCGGGCGCAATGT GCGTTCAAAGATTCGATGATTCCTGAATTCTGCAATTCACATTAATTAT CGCATTTTCGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGATCCGTTGTT GAAAGTTTTAATTGATTGTGTTTTCACTCAGAAGATACTGAAAATAACAG GTTTTGTTGGTCTCTGGCGGGCCGCTCCCGTGTTACGGGGAGGCGGGG GTCCGCCGAGGCAACGTTGTAGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGTTGTA AACTCAGTAATGATCCCGCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGATAAAA ATTTTACAAACAA

Se realizó la búsqueda de las secuencias obtenidas en el banco de genes del Centro Nacional para Información Biotecnológica (National Center for Biotechnology Information NCBI por sus siglas en inglés), es una página que posee una biblioteca de genomas, al ingresar las secuencias obtenidas de las muestras 4 y 13 este se encarga de compararlas con su banco de datos, para obtener un porcentaje de identidad el cual proporciona un grado de similitud con las secuencias de los patógenos, lo cual confirma la identidad de las muestras.

Al hacer la comparación de la secuencia de ADN de la muestra 4 con el banco de genes, éste presentó un listado de compatibilidad, se observó el mayor porcentaje de identidad con respecto a la muestra con la especie *Fusarium dimerum* CBS 108944 <sup>(13)</sup> por lo cual se considera que el aislado pertenece a un hongo del género *Fusarium*. En la figura No. 20 se observa el porcentaje de identidad (99%) de la secuencia de ADN.

De igual forma, se realizó el mismo procedimiento para la muestra 13. En la Figura No. 21 se observa el porcentaje de similitud en la identidad (98%) de la secuencia de ADN correspondiente al *Fusarium dimerum* CBS 108944 <sup>(51)</sup>.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
968 bits(524)	0.0	535/540(99%)	1/540(0%)	Plus/Minus
Query 18	CTGATCCGAGGTCA-CATT	CAGAAAGTTGGGTTGTTTTACGGCGTGGCCTACGCTCCGTC	76	
Sbjct 546	CTGATCCGAGGTCAACATT	CAGAAAGTTGGGTTGTTTTACGGCGTGGCCTACGCTCCGTC	487	
Query 77	CCAGTGCAGATGTTACTACT	ACGCAGAGGAGCCGGGGCGAGACCGCCACTGTATTTGG	136	
Sbjct 486	CCAGTGCAGATGTTACTACT	ACGCAGAGGAGCCGGGGCGAGACCGCCACTGTATTTGG	427	
Query 137	GGCACGGCCGCCGCTGGAGGG	ACGGCCGATGCCAACACCAAGCCCGAGGGGCTTGAGG	196	
Sbjct 426	GGCACGGCCGCCGCTGGAGGG	ACGGCCGATGCCAACACCAAGCCCGAGGGGCTTGAGG	367	
Query 197	GATGTAATGACGCTCGAACAGGC	ATGCCCGCCAGAGTACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTC	256	
Sbjct 366	GATGTAATGACGCTCGAACAGGC	ATGCCCGCCAGAGTACTGGCGGGCGCAATGTGCGTTC	307	
Query 257	AAAGATTCGATGATTCACTGAATT	CTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTT	316	
Sbjct 306	AAAGATTCGATGATTCACTGAATT	CTGCAATTCACATTACTTATCGCATTTGCTGCGTT	247	
Query 317	CTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGAT	CCGTTGTTGAAAGTTTTAATTGATTGTGTTTTCA	376	
Sbjct 246	CTTCATCGATGCCAGAACCAAGAGAT	CCGTTGTTGAAAGTTTTAATTGATTGTGTTTTCA	187	
Query 377	CTCAGAAGATACTGAAAATAACAGGG	TTTGTGGGTCTCTGGCGGGCCGCTCCCGTGTT	436	
Sbjct 186	CTCAGAAGATACTGAAAATAACAGGG	TTTGTGGGTCTCTGGCGGGCCGCTCCCGTGTT	127	
Query 437	ACGGGGAGGCGGGGTCGCCCGAGGCAAC	GTTGTAGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGT	496	
Sbjct 126	ACGGGGAGGCGGGGTCGCCCGAGGCAAC	GTTGTAGGTATGTTACAGGGGTTTGGGAGT	67	
Query 497	TGTAAACTCGGTAATGATCCCTCCGCT	GTTTACCAACGGAGACCTTGTTAAATTTTTA	556	
Sbjct 66	TGTAAACTCGGTAATGATCCCTCCGCT	GTTTACCAACGGAGACCTTGTTACGACTTTA	7	

**Figura N° 20.** Alineamiento de la secuencia ITS amplificada del patógeno 4 y la secuencia de la cepa *Fusarium dimerum* CBS 108944, realizado por Blast. Código de acceso a la secuencia en genbank: EU926285.1 <sup>(51)</sup>

Organismo: *Fusarium dimerum*

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;  
Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Nectriaceae;  
Fusarium; complejo de especies de *Fusarium dimerum*.

Autores: Ropars,J., Cruaud,C., Lacoste,S. and Dupont,J.

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
952 bits(515)	0.0	539/550(98%)	3/550(0%)	Plus/Minu:
Query 10	ATTCCTTCTGAT -CGAGGTC -ACATT	CAGAAAAGTTGGGTTGTTTTACGGCGTGGCCTA	67	
Sbjct 554	ATTC -CTACCTGATCCGAGGTCAACATT	CAGAAAAGTTGGGTTGTTTTACGGCGTGGCCTA	496	
Query 68	CGCTCCGTC	CCAGTGCAGATGTTACTACTACGCAGAGGAGCCGGGGGCGAGACCGCCAC	127	
Sbjct 495	CGCTCCGTC	CCAGTGCAGATGTTACTACTACGCAGAGGAGCCGGGGGCGAGACCGCCAC	436	
Query 128	TGTATTTGGGGC	ACGGCCGCGCTGGAGGGACGGCCGATGCCCAACACCAAGCCCGGAGG	187	
Sbjct 435	TGTATTTGGGGC	ACGGCCGCGCTGGAGGGACGGCCGATGCCCAACACCAAGCCCGAAGG	376	
Query 188	GGCTTGAGGGATGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAGTACTGGCGGGCGCAA	247		
Sbjct 375	GGCTTGAGGGATGTAATGACGCTCGAACAGGCATGCCCGCCAGAGTACTGGCGGGCGCAA	316		
Query 248	TGTGCGTTCAAAGATTCGATGATCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATT	307		
Sbjct 315	TGTGCGTTCAAAGATTCGATGATCACTGAATTCTGCAATTCACATTACTTATCGCATT	256		
Query 308	CGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAATTGATT	367		
Sbjct 255	CGCTGCGTTCTTCATCGATGCCAGAACAAGAGATCCGTTGTTGAAAGTTTTAATTGATT	196		
Query 368	GTGTTTTCACTCAGAAGATACTGAAAATAACAGGGTTTGTGGGTCTCTGGCGGGCCGC	427		
Sbjct 195	GTGTTTTCACTCAGAAGATACTGAAAATAACAGGGTTTGTGGGTCTCTGGCGGGCCGC	136		
Query 428	TCCCGTGTTACGGGGAGGCGGGGTCGCCGAGGCAACGTTGTAGGTATGTTACAGGGG	487		
Sbjct 135	TCCCGTGTTACGGGGAGGCGGGGTCGCCGAGGCAACGTTGTAGGTATGTTACAGGGG	76		
Query 488	TTTGGGAGTTGTAAACTCAGTAATGATCCCGCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGATA	547		
Sbjct 75	TTTGGGAGTTGTAAACTCGGTAATGATCCCTCCGCTGGTTCACCAACGGAGACCTTGATA	16		
Query 548	AAAATTTTAC	557		
Sbjct 15	CGACTTTTAC	6		

**Figura N° 21.** Alineamiento de la secuencia ITS amplificada del patógeno 13 y la secuencia de la cepa *Fusarium dimerum* CBS 108944, realizado por Blast. Código de acceso a la secuencia en genbank: EU926285.1 <sup>(51)</sup>

Organismo: *Fusarium dimerum*

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Pezizomycotina;  
Sordariomycetes; Hypocreomycetidae; Hypocreales; Nectriaceae;  
Fusarium; complejo de especies de *Fusarium dimerum*.

Autores: Ropars, J., Cruaud, C., Lacoste, S. and Dupont, J.

Comúnmente para la identificación de un hongo se recurre a las características morfológicas por medio de la descripción macroscópica y microscópica, sin embargo para la antracnosis en plátanos, este método no fue posible debido a la amplia variación de microorganismos que pueden causar esta enfermedad dependiendo en el país o región donde se encuentren, por tal motivo se emplearon técnicas moleculares de identificación. Se identificó una especie de *Fusarium* (ver cuadro N° 13) presente en las lesiones de antracnosis en plátanos maduros, coincidiendo con estudios realizados en Filipinas donde hace referencia a los géneros *Fusarium*, *Colletotrichum*, *Penicillium*, *Verticillium*, *Cylindrocarpon*, *CLadosporium*, *Clomerella*, *Thielaviopsis* y *Lasiodiplodia*, siendo el *Fusarium* el más patógeno. (7).

**Cuadro N° 13.** Clasificación de los aislados fúngicos según NCBI

Número cepa	Organismo fúngico identificado	Número de acceso de NCBI	Tamaño del fragmento amplificado (pb)	Homología	Cobertura
4	<i>Fusarium dimerum</i>	JQ434586.1	583	99%	92%
13	<i>Fusarium dimerum</i>	JQ434586.1	563	98%	97%

La morfoespecie *Fusarium dimerum*, consiste en al menos 12 especies filogenéticamente distintas. El nombre *F. dimerum* se utiliza para un taxón cuyos miembros han sido predominantemente aislados como agentes causales de micosis humanas, asociados con infecciones oportunistas a pacientes inmunocomprometidos, o causar queratitis luego de un trauma, originalmente aislado del cidro o citrón (*Citrus medica*). (51)

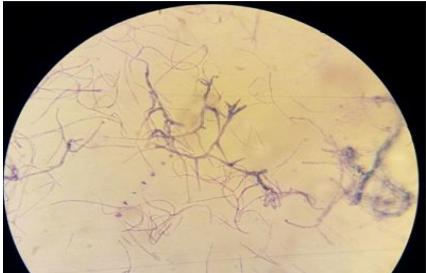
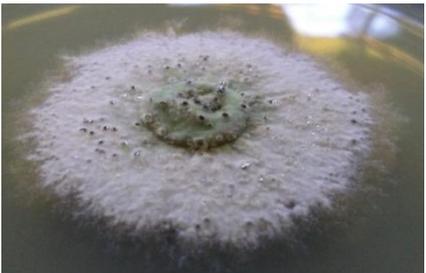
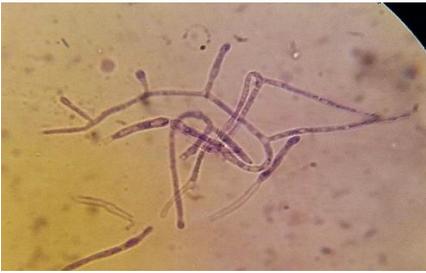
Recientemente se ha establecido que algunas especies del genero *Fusarium dimerum* pueden causar síntomas de enfermedades en plantas, como en el estudio realizado por la Universidad de Atartürk, Turquía, en el que se describen lesiones recurrentes en los cultivos de papa (*Solanum tuberosum*), los síntomas eran manchas negras o café oscuras. (51)

Según los estudios realizados en Filipinas se demuestra que la antracnosis es causada por varias especies de hongos y entre ellos se encuentra un complejo de *Fusarium spp*, los resultados de este trabajo mostraron que el *Fusarium dimerum* es una de las especies presentes en plátanos que mostraban signo de antracnosis en la Cooperativa San Carlos, El Paisnal. Se observa que patógenos que pueden mostrar morfologías macroscópicas diferentes al inicio del aislamiento pueden mostrar la misma identidad en análisis moleculares, solamente estudios más profundos que apliquen la amplificación de otras regiones del ADN mostrarán si en realidad las diferencias señalan la existencia de múltiples patógenos o un mismo patógeno mostrando diferentes morfologías debidas a diferencias nutricionales y/o ambientales.

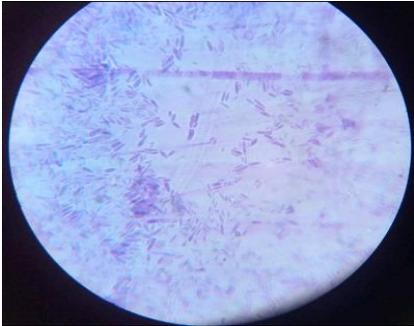
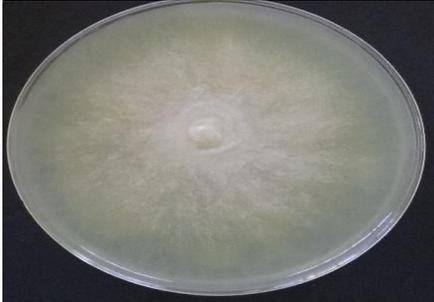
### **5.5 Aislamiento y selección de hongos antagonistas**

El aislamiento de hongos y levaduras antagonistas se realizó a partir de la flora epífita de plátanos verdes sanos. Los hongos observados se aislaron para describir su morfología macroscópica y microscópica (ver Cuadro N° 14).

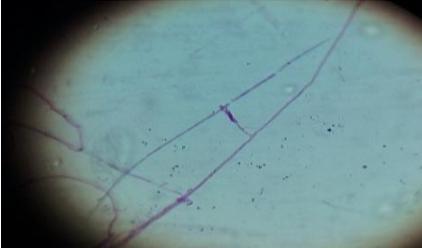
**Cuadro N° 14.** Descripción macroscópica y microscópica de hongos antagonistas

Número de cepa/código	Descripción macroscópica	Descripción microscópica
1 (1 10 <sup>-1</sup> A)	 <p>Forma circular, tamaño mediano, color morado pálido, con micelio corto y afelpado, elevación umbonada.</p>	 <p>Delicadas hifas ramificadas, aspecto microscópico característico de hongos dimórficos, las hifas pueden estar arracimadas en una forma como cuerdas.</p>
2 (1 10 <sup>-1</sup> B)	 <p>Borde filamentoso, forma circular, tamaño grande, color verde al centro y periferia blanca con puntos negros esparcidos irregularmente, superficie rugosa y umbonada.</p>	 <p>Microconidias piriformes, elongadas hifas septadas con conidias únicas unidas a cortos conidióforos, macroconidia cilíndrica con paredes delgadas.</p>
3 (1 10 <sup>-1</sup> B)	 <p>Borde filamentoso, forma circular, tamaño pequeño, color morado pálido, superficie plana, micelio corto y delicado.</p>	 <p>Hifas septadas, hialinas, fiálides largas, algunas ramificadas, conidias ovoides, multicelulares, clamidosporas presentes.</p>

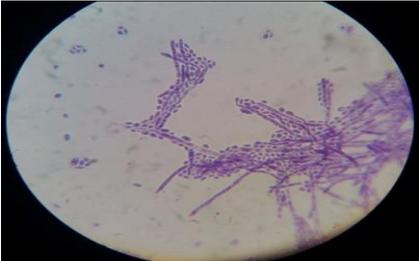
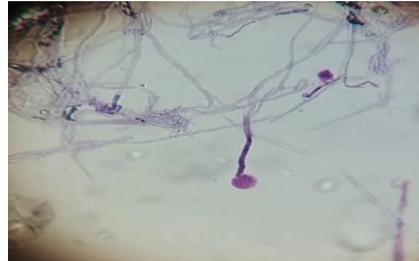
Cuadro N° 14. Continuación

Número de cepa/código	Descripción macroscópica	Descripción microscópica
4 (1 10 <sup>-1</sup> B)	 <p>Levadura con forma irregular, tamaño muy pequeño, color crema, aspecto céreo.</p>	 <p>Se observan hifas deformes con septos.</p>
5 (2 10 <sup>-3</sup> B)	 <p>Levadura con aspecto liso, céreo, color crema, crecimiento abundante.</p>	 <p>Blastoconidias ovaladas, unicelulares, cilíndrica y curva.</p>
6 (3 10 <sup>-2</sup> B)	 <p>Crece en toda la placa, color blanco hueso, micelio vellosos de poca elevación.</p>	 <p>Hifas en espiral y un conglomerado de conidias.</p>

Cuadro Nº 14. Continuación

Número de cepa/código	Descripción macroscópica	Descripción microscópica
7 (3 10 <sup>-3</sup> A)	 <p data-bbox="521 779 979 911">Crece en toda la placa, el color blanco se torna transparente a lo largo del radio, coloración naranja tenue, micelio aéreo veloso.</p>	 <p data-bbox="1011 779 1450 877">Fiálide solitaria, larga y estrecha con un racimo compacto de conidias, hifa septada, hialina.</p>
8 (4 10 <sup>-1</sup> B)	 <p data-bbox="521 1283 979 1352">Crecimiento abundante, color blanco, micelio aéreo corto.</p>	 <p data-bbox="1011 1283 1450 1352">Hifas gruesas, septadas, ramificadas.</p>
9 (4 10 <sup>-3</sup> )	 <p data-bbox="521 1619 979 1717">Borde filamentoso, forma circular, color blanco, micelio aéreo corto y veloso</p>	 <p data-bbox="1011 1619 1450 1717">Hifa septada, único conidióforo corto, conidia alargada, densa, presencia de conidiosporas.</p>

**Cuadro N° 14.** Continuación

Número de cepa/código	Descripción macroscópica	Descripción microscópica
10 (6 10 <sup>-1</sup> )	 <p>Levadura de forma y superficie altamente irregulares, color crema, tamaño pequeño.</p>	 <p>Se observan hifas septadas, hialinas, células de levaduras ovales y pequeñas.</p>
11 (6 10 <sup>-3</sup> B)	 <p>Borde liso, forma circular, tamaño pequeño, color crema, micelio corto, seccionado, superficie pulvinada.</p>	 <p>Hifa septada, conidióforo ramificado y en sus puntas conidias largas en forma de espina.</p>
12 (6 10 <sup>-3</sup> B)	 <p>Forma circular, borde filamentoso, color blanco, tamaño pequeño, superficie convexa, micelio aéreo corto en la periferia.</p>	 <p>Se observan hifas hialinas, no septadas, esporangio maduro.</p>

La superficie de los plátanos verdes sanos presenta una diversidad de microorganismos en su flora epífita, dentro de los cuales algunos pueden presentar actividad antagonica contra los patógenos causantes de antracnosis evitando el crecimiento de estos; sin embargo los cambios en la composición del plátano en la etapa de maduración pueden propiciar la pérdida de muchos de estos microorganismos. En la búsqueda de candidatos a antagonistas se pudieron aislar 13 microorganismos, entre ellos, mohos y levaduras.

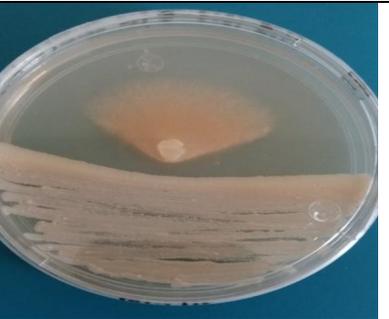
### 5.5.1 Prueba de incubación dual

Para esta prueba se tomó el hongo 4, el cual que presentó la mayor patogenicidad, y se incubó junto a cada uno de los hongos aislados de los plátanos verdes sanos (presuntamente antagonistas). Esta prueba demostró si los mohos y levaduras poseen características antagonistas impidiendo el crecimiento del patógeno. En el cuadro N° 15 se muestran los resultados obtenidos de la prueba para cada hongo candidato a antagonista contra el patógeno #4.

**Cuadro N° 15.** Prueba de incubación dual, inhibición de crecimiento.

Número de cepa/ código	Inhibición de crecimiento	
1 (1 10 <sup>-1</sup> A)	-Diámetro de patógeno control: 17.5 mm -Diámetro del patógeno desde el punto de inoculación en dirección al antagonista: 10 mm  $IC = \frac{17.5mm - 10mm}{17.5mm} \times 100$ IC= 42.9%	

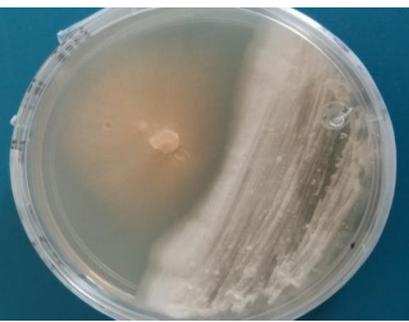
Cuadro Nº 15. Continuación

Número de cepa/ código	Inhibición de crecimiento	
2 (1 10 <sup>-1</sup> B)	-Diámetro de patógeno control: 17.5 mm -Diámetro del patógeno desde el punto de inoculación en dirección al antagonista: 8.5 mm $IC = \frac{17.5mm - 8.5mm}{17.5mm} \times 100$ IC= 51.4%	
3 (1 10 <sup>-1</sup> B)	-Diámetro de patógeno control: 17.5 mm -Diámetro del patógeno desde el punto de inoculación en dirección al antagonista: 9 mm $IC = \frac{17.5mm - 9mm}{17.5mm} \times 100$ IC= 48.6%	
4 (1 10 <sup>-1</sup> B)	-Diámetro de patógeno control: 17.5 mm -Diámetro del patógeno desde el punto de inoculación en dirección al antagonista: 8.5 mm $IC = \frac{17.5mm - 8.5mm}{17.5mm} \times 100$ IC= 51.4%	
5 (2 10 <sup>-3</sup> B)	-Diámetro de patógeno control: 17.5 mm -Diámetro del patógeno desde el punto de inoculación en dirección al antagonista: 0.0 mm $IC = \frac{17.5mm - 0.0mm}{17.5mm} \times 100$ IC= 100.0%	

Cuadro Nº 15. Continuación

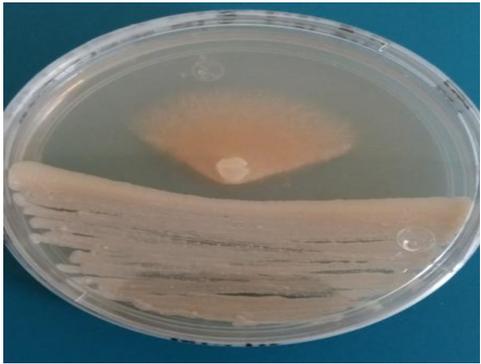
Número de cepa/ código	Inhibición de crecimiento	
6 (3 10 <sup>-2</sup> B)	-Diámetro de patógeno control: 17.5 mm -Diámetro del patógeno desde el punto de inoculación en dirección al antagonista: 5 mm $IC = \frac{17.5mm - 5mm}{17.5mm} \times 100$ IC= 71.4%	
7 (3 10 <sup>-3</sup> A)	-Diámetro de patógeno control: 17.5 mm -Diámetro del patógeno desde el punto de inoculación en dirección al antagonista: 9.5 mm $IC = \frac{17.5mm - 9.5mm}{17.5mm} \times 100$ IC= 45.7%	
8 (4 10 <sup>-1</sup> B)	-Diámetro de patógeno control: 17.5 mm -Diámetro del patógeno desde el punto de inoculación en dirección al antagonista: 9.5 mm $IC = \frac{17.5mm - 9.5mm}{17.5mm} \times 100$ IC= 45.7%	

**Cuadro N° 15. Continuación**

Número de cepa/ código	Inhibición de crecimiento	
Cepa 9 (4 10 <sup>-3</sup> )	-Diámetro de patógeno control: 17.5 mm -Diámetro del patógeno desde el punto de inoculación en dirección al antagonista: 7.5 mm $IC = \frac{17.5mm - 7.5mm}{17.5mm} \times 100$ IC= 57.1%	
Cepa 10 (6 10 <sup>-1</sup> )	-Diámetro de patógeno control: 17.5 mm -Diámetro del patógeno desde el punto de inoculación en dirección al antagonista: 10 mm $IC = \frac{17.5mm - 10mm}{17.5mm} \times 100$ IC= 42.9%	
Cepa 11 (6 10 <sup>-3</sup> B)	-Diámetro de patógeno control: 17.5 mm -Diámetro del patógeno desde el punto de inoculación en dirección al antagonista: 3.5 mm $IC = \frac{17.5mm - 3.5mm}{17.5mm} \times 100$ IC= 80%	
Cepa 12 (6 10 <sup>-3</sup> B)	-Diámetro de patógeno control: 17.5 mm -Diámetro del patógeno desde el punto de inoculación en dirección al antagonista: 0mm $IC = \frac{17.5mm - 0mm}{17.5mm} \times 100$ IC= 100%	

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. Los mohos y levaduras que inhibieron el crecimiento en más del 25% se consideran como candidatos a antagonistas y posibles candidatos a agentes de control biológico. En estos experimentos fue notable la necesidad de seleccionar el mejor método para la identificación de microorganismos antagonistas ya que el método implementado para hongos no fue capaz de demostrar capacidades antagonistas, se sugiere implementar un método que facilite la identificación del carácter antagonista en los hongos y levaduras (ver Cuadro N° 16).

**Cuadro N° 16.** Métodos utilizados en la prueba de incubación dual

Método para levaduras	Método para hongos
	
<p>Este método permite el crecimiento tanto del antagonista como del patógeno, permitiendo observar una verdadera inhibición del patógeno que puede ser ocasionada por metabolitos secundarios producidos por la levadura en estudio.</p>	<p>Este método presenta la desventaja de competencia por el medio, debido a que el patógeno se encuentra al centro de la placa y el hongo antagonista a su alrededor, como consecuencia, el crecimiento del patógeno será menor porque dispone de un espacio más reducido para su crecimiento, al contrario del hongo antagonista en prueba que posee de un mayor espacio para su desarrollo en la placa.</p>

**CAPÍTULO VI**  
**CONCLUSIONES**

## 6.0 CONCLUSIONES

1. El método que mostró mejores características para el aislamiento de hongos patógenos en plátano fue diluciones seriadas y la técnica de esparcido en placa, ya que permitieron obtener colonias aisladas en la superficie del agar, facilitando el aislamiento.
2. La descripción macroscópica y microscópica aporta una identidad del moho o levadura; sin embargo, no se puede utilizar para confirmar el género y la especie certera del microorganismo en estudio.
3. De acuerdo a 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.
4. Por medio de la identificación molecular se comprobó que los patógenos 4 y 13 aislados que presentaron mayor patogenicidad corresponden a la cepa de *Fusarium dimerum*, presentando un patrón de coincidencia en la secuencia de ADN mayor del 97% para este hongo.
5. Es posible aislar microorganismos epífitos del plátano verde sano, por medio del arrastre de estos con algodón humedecido en agua estéril y utilizando el método de diluciones seriadas y la técnica de esparcido en placa.
6. La prueba de incubación dual para mohos impide el crecimiento del patógeno debido a la competencia de espacio, por lo que el método no es adecuado

para este tipo de estudio. Mientras que el método de incubación dual empleado en levaduras, permite evidenciar la actividad antagónica de un microorganismo, esta técnica también se puede emplear para mohos.

7. De los 13 aislados de la flora epífita del plátano verde sano, se logró obtener una muestra con un 100% de inhibición hacia el patógeno (muestra 6 levadura).

**CAPÍTULO VII**  
**RECOMENDACIONES**

## 7.0 RECOMENDACIONES

1. 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.
2. En futuras investigaciones explorar otros métodos de tinción como el método de montaje húmedo y el microcultivo como alternativas para el mejoramiento de la observación de cada estructura microscópica de los hongos para obtener las descripciones microscópicas tanto de los patógenos como de los antagonistas.
3. Para la prueba de patogenicidad utilizar cajas de plástico en lugar de bolsas para facilitar el manejo de las muestras al momento de hacer las mediciones, tomando todas las medidas necesarias para eliminar el riesgo de contaminación cada vez que se deba manipular la muestra.
4. Ensayar métodos de extracción de ADN utilizando kits de extracción que incorporen la purificación con ARNasas y permitan una obtención de material genético libre de contaminantes que puedan interferir en los procesos de extensión y secuenciación.
5. Para cada moho antagonista, realizar la prueba de incubación dual con la técnica propuesta para levaduras.
6. Realizar la identificación molecular de la levadura antagonista que presentó una inhibición del 100% del patógeno, así como también formular un proceso

para la obtención de los metabolitos secundarios que esta sintetiza para su utilización como control biológico que elimine totalmente la enfermedad de antracnosis en plátano.

7. Sustituir el bromuro de etidio como colorante revelador en los ensayos de electroforesis, por colorantes no tóxicos como el gel red.

## BIBLIOGRAFIA

1. Accensi, F., Cano, J., Figuera, L., Abarca, M. L., & Cabanes, F. J. (1999). New PCR method to differentiate species in the *Aspergillus niger* aggregate. *FEMS Microbiology Letters*, 180(2), 191-196.
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. Adikaram, N. K. B., & Karunaratne, A. (1998). Suppression of Avocado Anthracnose and Stem-end Rot Pathogens by Endogenous Antifungal Substances and a Surface Inhabiting *Pestalotiopsis* sp. In ACIAR Proceedings (pp. 72-77). Australian Center for International Agricultural Research.
4. Agrios, G. N. (2005) Plant pathology (Vol. 5) Burlington: Elsevier Academic Press.
5. Alves, A., Crous, P. W., Correia, A., & Phillips, A. J. L. (2008). Morphological and molecular data reveal cryptic speciation in *Lasiodiplodia theobromae*. *Fungal Diversity*, 28(1), 1-13.
6. 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.
7. 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.

8. 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.
9. Ángel, A. y Velázquez, I. (2010). Sistematización de la experiencia del Programa Nacional de Frutas de El Salvador MAG-FRUTAL ES: situación actual, desafíos y próximas acciones.
10. Ayala Torres, C. E., Rivas Cortez, G. M., & Zambrana Rodríguez, C. B. (2003). Estudio proximal comparativo de la cáscara y pulpa de plátano (*Musa paradisiaca*) para su aprovechamiento completo en la alimentación humana y animal (Doctoral dissertation, Universidad de El Salvador).
11. Bailey, J. A., & Jeger, M. J. (1992). *Colletotrichum: biology, pathology and control*. Colletotrichum: biology, pathology and control.
12. Bastiaanse H., De Lapeyre de Bellaire L., Lassois L., Misson C., Jijaki M. H., (2010). Control Integrado de la Pudrición de la Corona del Plátano con Cepas de *Candida oleophila*, cloruro de calcio y embalaje en atmósfera modificada. *Biological Control*, 53 (1); p. 100-107.
13. Chuang, T.Y. y Yang, H. R. (1993). Control Biológico de Antracnosis en Plátano. *Boletín Plant Pathology*. Volumen 2; p. 71-77.
14. 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.

15. Cook, R. J., & Baker, K. F. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phytopathological Society.
16. De Costa, D. M., & Erabadupitiya, H. R. U. T. (2005). An integrated method to control postharvest diseases of banana using a member of the *Burkholderia cepacia* complex. *Postharvest Biology and Technology*, 36(1), 31-39.
17. Dellaporta, S. L., Wood, J., & Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant molecular biology reporter*, 1(4), 19-21.
18. Devi, A. N., & Arumugam, T. (2005). Studies on the shelf life and quality of Rasthali banana as affected by postharvest treatments. *Orissa J. Hortic*, 33(2), 3-6.
19. Eken, C., Hasenekoğlu, İ., Çoruh, İ., Demirer, E., & Demirci, E. (2008). First report of *Fusarium dimerum* on *Solanum tuberosum* in Turkey. *Plant Pathology*, 57(2), 378-378.
20. Encina, F., & Piontelli, E. (2009). Hongos filamentosos en la epidermis del fruto del tomate: énfasis en el género *Cladosporium* link. *Boletín Micológico*, 24.
21. F. Méndez Jaimes, B. Tlapal Bolaños, A. Almaraz Sanchez, M.P Saraiva Cámara, W. Guerreiro Lima, J. Silva Veloso, C. Almeida da Costa, M.S. Brito Netto, S.J. Michereff. (2015). Caracterización molecular de especies de *Colletotrichum* asociadas a antracnosis en aguacate de la región centro de Michoacán.

22. Finlay, A. R., & Brown, A. E. (1993). The relative importance of *Colletotrichum musae* as a crown-rot pathogen on Windward Island bananas. *Plant Pathology*, 42(1), 67-74.
23. Glosario de micología. Recuperado de: <http://www.efn.uncor.edu/departamentos/divbioeco/divveg1/micologia/practico%20micologia/glosario%20micologia.pdf>. Consultado: 11/08/2016.
24. Govender, V., Korsten, L., & Sivakumar, D. (2005). Semi-commercial evaluation of *Bacillus licheniformis* to control mango postharvest diseases in South Africa. *Postharvest Biology and Technology*, 38(1), 57-65.
25. Groenewald, S., Van Den Berg, N., Marasas, W. F., & Viljoen, A. (2006). The application of high-throughput AFLP's in assessing genetic diversity in *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense*. *Mycological Research*, 110(3), 297-305.
26. Guerrero, M. (2010). Guía técnica del cultivo del plátano. Programa MAG-CENTA-Frutales. CENTA (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal Enrique Álvarez Córdova), El Salvador.
27. Guzmán, R. E., Casteel, S. W., Rottinghaus, G. E., & Turk, J. R. (1997). Chronic consumption of fumonisins derived from *Fusarium moniliforme* culture material: clinical and pathologic effects in swine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 9(2), 216-218.
28. Guzmán, M., & Villalta, R. (2008). Eficacia de mezclas de azoxistrobina con tiabendazole para el combate de enfermedades poscosecha del banano (Musa AAA) Efficacy of azoxistrobin and thiabendazole mixtures in the control of post-harvest diseases in bananas (Musa AAA). *Corbana (Costa Rica)*.(Dic,34(61), 1-10.

29. Guzmán, R. E., Casteel, S. W., Rottinghaus, G. E., & Turk, J. R. (1997). Chronic consumption of fumonisins derived from *Fusarium moniliforme* culture material: clinical and pathologic effects in swine. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 9(2), 216-218.
30. Hernández, A., Provincial, C. M., Muiño, B., Rosón, C., Cazola, C., & de Ávila Cuba, C. (2011). Hongos y oomycetes fitopatógenos en viveros de piña *Ananas comosus* (L.) Merrill en Ciego de Ávila, Cuba (No. 3194).
31. Herrera, Teófilo; Ulloa, Miguel; colab. Ruiz Oronoz, Miguel (1998). *Micología básica y aplicada*. Universidad Nacional Autónoma de México, Fondo de Cultura Económica, segunda edición, México.
32. Hirata, T., & Kimishima, E. (1997). *Fusarium* fruit rot of banana caused by *F. moniliforme* intercepted in plant quarantine. *Ann Phytopathol Soc Jpn*, 63, 494-495.
33. Ivonne Angélica Quiroja Ramos. Antracnosis, una enfermedad limitante para la producción de papaya. Croplife. Recuperado de: [www.croplifela.org/es/proteccion-de-cultivos/plaga-del-mes/antracnosis-papaya.html](http://www.croplifela.org/es/proteccion-de-cultivos/plaga-del-mes/antracnosis-papaya.html). Consultado el 11/08/2016.
34. Johanson, A., & Blazquez, B. (1992). Hongos asociados a la pudrición de la corona de bananos empacados en campo, en las Islas de Barlovento y evaluación de su susceptibilidad a los fungicidas tiabendazole, procloraz e imazalil. *Crop Protection*, 79(83), 11.
35. Kefialew, Y., & Ayalew, A. (2008). Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). *Postharvest Biology and Technology*, 50(1), 8-11.

36. Koneman, Elmer W.; Allen, Stephen D.; Janda, William M.; Schreckenberger, Paul C.; Winn, Washington C. (2007). Diagnóstico microbiológico. Editorial Médica Panamericana, quinta edición, Argentina.
37. Koneman, Elmer W.; Roberts, Glenn D. (1987). Micología práctica de laboratorio. Editorial Médico Panamericana, tercera edición. Argentina.
38. Krauss, U., Matthews, P., Bidwell, R., Hocart, M., Anthony, F., (2001). Discriminación de cepas por hongos antagonistas de *Colletotrichum musae*: implicaciones para el biocontrol del pudrimiento de la corona del plátano. Revista Mycological Research. Volumen 105, p. 67-76.
39. López, G. B., & Montaña, F. J. G. (2014). Propiedades funcionales del plátano (*Musa sp*). Med UV, 22-26.
40. Marulanda, M. I., Isaza, L., & Ramirez, A. M. (2007). Identificación de la especie de *Colletotrichum* responsable de la antracnosis en la mora de castilla en la región cafetera. Scientia et Technica, 1(37).
41. Mestizo, Y. A., Bandera, G., Aya, H., Sarria, G., Varón, F., Navia, M., & Martínez, G. (2012). Caracterización de síntomas e identificación de microorganismos en palmas de aceite afectadas por la Pudrición basal del estípite. Revista Palmas, 33(4), 13-27.
42. Molina Roa, J. (2009). Aislamiento y caracterización de hongos patógenos presentes en lulo, tomate de árbol y mora de castilla potencialmente patógenos para los cultivos de gulupa (*Pasiflora edulis* var. *edulis* sims).
43. Morgan-Jones, G. (1967). *Ceratocystis paradoxa*. [Descriptions of Fungi and Bacteria]. IMI Descriptions of Fungi and Bacteria, (15).

44. Núñez Oregel, V. (2012). Bacterias antagonistas con potencial para el control biológico postcosecha de la antracnosis en papaya (tesis). Instituto Politecnico Nacional, Michoacán.
45. Oliveira, R., Bouhmidí, K., Casas, A. T., & del Moral, J. (2005). Caracterización morfológica y cultural de aislados de " Colletotrichum" spp. causantes de la Antracnosis del olivo. Boletín de sanidad vegetal. Plagas, 31(4), 531-548.
46. Perera, E., & Lago, E. (1986). Influencia del fotoperíodo sobre el crecimiento micelial y la formación de picnidios en el hongo *Diplodia natalensis* (No. 1260).
47. Ploetz, R. C., Thomas, J. E., & Slabaugh, W. R. (2003). Diseases of banana and plantain. *Diseases of tropical fruit crops*, 73-134.
48. Pombo, A. G., Alborés, S., & Garmendia, G. (2014). identificación molecular y métodos de conservación de levaduras y hongos filamentosos de muestras provenientes de antártida.
49. Raut, S. P., & Ranade, S. (2004). Diseases of banana and their management. In *Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II* (pp. 37-52). Springer Netherlands.
50. Riera Villalba, N. J. (2015). Caracterización molecular y de patogenicidad de *Colletotrichum spp* en bananas var Cavendish y pruebas de antagonismo con *Trichoderma spp*, recolectadas en fincas bananeras de la región Costa del Ecuador. Trabajo de Investigación.

51. Ropars, J., Cruaud, C., Lacoste, S. and Dupont, J. NCBI National Center for Biotechnology Information. National Institutes of Health. Recuperado de: [https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Consultado el 27/02/2017.
52. Salas Bastos, A. (2011). Aislamiento e identificación de endófitos y epífitos en hojas de café colectadas en dos zonas de Costa Rica y su posible empleo como biocontroladores de *Mycenaci tricolor*.
53. Salazar, E., Hernández, R., Tapia, A., & Gómez-Alpízar, L. (2012). Identificación molecular del hongo *Colletotrichum spp* aislado de banano de altura en la zona de Turrialba y determinación de su sensibilidad a fungicidas poscosecha. *Agronomía costarricense: Revista de ciencias agrícolas*, 36 (1), 53-68.
54. Schoch, C. L., Shoemaker, R. A., Seifert, K. A., Hambleton, S., Spatafora, J. W., & Crous, P. W. (2006). A multigene phylogeny of the Dothideomycetes using four nuclear loci. *Mycologia*, 98(6), 1041-1052.
55. Schoch, C. L., et al (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal AND barcode marker of fungi.
56. Schroers, H. J., O'Donnell, K., Lamprecht, S. C., Kammeyer, P. L., Johnson, S., Sutton, D. A., ... & Summerbell, R. C. (2009). Taxonomy and phylogeny of the *Fusarium dimerum* species group. *Mycologia*, 101(1), 55, 56, 67.
57. Slippers, B., Boissin, E., Phillips, A. J. L., Groenewald, J. Z., Lombard, L., Wingfield, M. J & Crous, P. W. (2013). Phylogenetic lineages in the Botryosphaerales: a systematic and evolutionary framework. *Studies in Mycology*, 76, 31-49.

58. St-German, Guy; Summerbelt, Richard (1996). Identifying filamentous fungi, a clinical laboratory handbook. Star Publishing Company. Korea.
59. Valencia Guerrero, M. F. (2009). Caracterización enzimática de cepas de fusarium aisladas de lesiones de animales, humanos y plantas.
60. Ventura, J. A., Costa, H., & da Silva Tatagiba, J. (2004). Papaya diseases and integrated control. In Diseases of Fruits and Vegetables: Volume II (pp. 201-268). Springer Netherlands.
61. Verde Betoya, W. (2005). Identificación, caracterización y aislamiento *in vitro* de hongos fitopatogenos del Camu-camu.
62. Villalta, R., Sample, M., Shields, D., & Guzmán, M. (2006). Evaluación de fungicidas y mezclas de fungicidas para el combate de enfermedades poscosecha del banano (Musa AAA) Evaluations of fungicide and fungicide mixtures for the control of post-harvest banana (Musa AAA) diseases. *Corbana (Costa Rica)*.(Dic, 32(59), 17-33.
63. Vismer, H. F., Marasas, W. F. O., Rheeder, J. P., & Joubert, J. J. (2002). Fusarium dimerum as a cause of human eye infections. *Medical mycology*, 40(4), 399-406.
64. Watanabe, C. (1937). A contribution to the knowledge of the Braconid fauna of the Empire of Japan (Hymenoptera). *Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido Imperial University*, 42(1), 1-188.

## GLOSARIO <sup>(20)</sup>

<b>Acérvulos</b>	Estrato plano o con forma de platillo formado por conidióforos por lo general cortos, que crecen juntos y que surgen de una masa más o menos estromática de hifas.
<b>Ahusado</b>	Que tiene forma de huso, un instrumento usado en el hilado a mano el cual consiste en una pieza de madera o hierro, de forma cilíndrica y alargada y más estrecha en los extremos.
<b>Amplicones</b>	Un trozo de ADN o ARN formado como los productos de amplificación de eventos naturales o artificiales, como en una reacción en cadena de la polimerasa.
<b>Artroconidia</b>	Conidia de forma rectangular formada a partir de una hifa especializada que se desarticula formando células separadas individuales o en cadena. Resulta de la fragmentación o lisis de una hifa vegetativa.
<b>Asca(o)</b>	Célula con forma de saco o bolsa que generalmente produce las esporas en su interior; característico de los hongos del grupo Ascomycota.
<b>Ascocarpo</b>	Cuerpo fructífero en forma de copa en el que se recogen los ascos de un hongo perteneciente a la Clase Ascomycetes.
<b>Blastoconidias</b>	Estructura de reproducción asexual que se origina por gemación.
<b>Biotrófico</b>	Patógeno que se nutre de células vivas del hospedante.
<b>Biseriadas</b>	Dispuestos en dos series o filas.
<b>Bitunicada</b>	La pared de los ascos esta formada por dos capas diferentes, una externa o exotúnica y una interna o endotúnica.

<b>Céreo</b>	Que tiene alguna de las características visuales de la cera, como el color o el brillo.
<b>Clamidosporas</b>	Tipo de espora de paredes gruesas.
<b>Conidióforos</b>	Hifa especializada que origina o lleva conidios.
<b>Confluentes</b>	Tendencia o propiedad de confluir o unirse unas estructuras o lesiones con otras, formando unas terceras mayores.
<b>Conidios</b>	Espora de multiplicación asexual no móvil, que suele formarse en el ápice o en el lado de una célula. Espora asexual.
<b>Edafológico</b>	Pertenece a la edafología, rama de la ciencia que estudia la composición y naturaleza del suelo en su relación con las plantas y el entorno.
<b>Electroforesis</b>	Técnica para la separación de molecular según la movilidad de éstas en un campo eléctrico a través de una matriz porosa, la cual finalmente las separa por tamaños moleculares y carga eléctrica.
<b>Estolón</b>	Hifa aérea que desarrolla rizoides cuando tiene contacto con la superficie del medio de cultivo.
<b>Estromático</b>	Varios, compuesto de diferentes tipos.
<b>Fiálide</b>	Estructura ubicada en el extremo de un conidióforo, sobre la cual se producen esporas.
<b>Hemibiotrofia</b>	El patógeno mantiene a las células vivas en las etapas iniciales de la infección pero las mata una vez avanzada.
<b>Hialino</b>	Transparente, incoloro.
<b>Hifa</b>	Filamento tubular parecidos a telas de araña, que representa la unidad estructural de la mayoría de los hongos.

<b>Hifas cenocíticas</b>	Tipo de hifa que no contiene tabiques y, por lo tanto, se observan como largas células continuas con numerosos núcleos.
<b>Liofilización</b>	Método de desecación en el que se elimina el agua por congelación del producto húmedo y posterior sublimación del hielo.
<b>Necrotrofia</b>	Los patógenos matan a las células de su huésped y descomponen el tejido para utilizarlo en su crecimiento.
<b>Paráfisis</b>	Estructuras estériles, unidas basalmente, unidas en un himenio.
<b>Picnidio</b>	Cuerpo fructífero asexual hueco, revestido de conidióforos por dentro. Órgano de reproducción asexual, provisto de una pared propia, globosa o en forma de pera.
<b>Piriforme</b>	Que tiene forma de pera.
<b>Pleomorfico</b>	Que tienen una variación en el tamaño y la forma de las células o sus nucleos.
<b>Pileo</b>	Parte superior de ciertos tipos de asocarpos.
<b>Secuenciación</b>	Conjunto de métodos y técnicas bioquímicas cuya finalidad es la determinación del orden de los nucleótidos (A, C, G y T) en una molécula de ADN. Se emplea para la lectura de la secuencia de bases nitrogenadas.
<b>Septado</b>	Que presenta septos o tabiques transversales, que dividen la estructura en unidades celulares. Provisto de septos o tabiques separadores.
<b>Setas</b>	Las setas son el aparato reproductor de los hongos superiores, las setas son producidas por el micelio.
<b>Talo</b>	Formado por filamentos e hifas.
<b>Ubicuo</b>	Presente en muchos lugares al mismo tiempo.
<b>Umbonado</b>	Prominencia en forma de mama.

## **ANEXOS**

**ANEXO N° 1**  
**ENSAYOS PRELIMINARES PARA EL AISLAMIENTO DE HONGOS**  
**CAUSANTES DE ANTRACNOSIS**

Para la selección del método de aislamiento con mejor promoción de crecimiento de los microorganismos y mayor facilidad de aislamiento de éstos, se realizaron una serie de ensayos preliminares que demostraron la viabilidad de los dos métodos propuestos. Para realizar este procedimiento se tomaron plátanos que presentaban signos de antracnosis, del mercado de Santiago Nonualco, Departamento de La Paz, ya que al momento de realizar este ensayo no se contaba con una confirmación de la colaboración con la Cooperativa San Carlos, El Paisnal.

### **Ensayo preliminar de aislamiento de hongos patógenos, causantes de antracnosis en plátano**

Para este ensayo preliminar se utilizaron dos métodos: cultivo directo de tejidos de plátanos con signos de antracnosis y diluciones seriadas.

#### **Método 1. Cultivo directo de tejidos** <sup>(3)</sup> (Ver anexo N° 3)

1. Lavar el plátano maduro con signos de antracnosis utilizando agua y jabón.
2. Secar con papel toalla estéril.
3. Con ayuda de un bisturí estéril cortar 10 fragmentos de tejido infectado y sano de 5x5 mm (manipular con pinzas estériles).
4. Preparar una solución de hipoclorito de sodio al 0.525 %.
5. Sumergir los fragmentos de tejido por 5 minutos en una caja de Petri con la solución de hipoclorito de sodio 0.525 %.
6. Enjuagar 3 veces los fragmentos de tejido sumergiéndolos en agua destilada estéril.

7. Secar los fragmentos de tejido haciendo uso de una toalla de papel estéril, con el fin de eliminar los excesos de humedad que contribuyen con la contaminación del aislamiento (realizar en cámara de flujo laminar).
8. Con ayuda de una pinza estéril inocular 10 trozos de tejido equidistantes en una placa que contenga Agar Papa Dextrosa (PDA) (realizar por duplicado para cada muestra).
9. Incubar las placas por 7 días a temperatura ambiente.
10. Con el fin de aislar cada hongo con características macroscópicas distintas, tomar cada colonia con un asa metálica en punta previamente esterilizada y sembrar en el centro de una placa con PDA.
11. Incubar a temperatura ambiente por 7 días.
12. Realizar controles ambientales del área de trabajo.

**Cuadro N° 17.** Resultados de aislamiento por cultivo directo de tejidos

Placas con trozos de plátano	Características macroscópicas
Mx plátano 1	Colonia 1: fondo rosado, micelio blanco y algodonoso, borde irregular. Colonia 2: fondo gris, micelio blanco y algodonoso, borde irregular. Colonia 3: fondo anaranjado, micelio blanco y algodonoso, borde irregular. Colonia 4: fondo negro, micelio blanco y algodonoso, borde irregular
Mx plátano 2	Colonia 1: fondo rosado, micelio blanco y algodonoso, borde irregular. Colonia 2: fondo gris, micelio blanco y algodonoso, borde irregular. Colonia 3: fondo negro, micelio blanco y algodonoso, borde irregular. Colonia 4: fondo morado/lila, micelio blanco y algodonoso, borde irregular.

## **Metodo2. Diluciones seriadas** <sup>(3)</sup> (ver anexo N° 4)

1. Lavar el plátano maduro con signos de antracnosis utilizando agua y jabón.
2. Secar con papel toalla estéril.
3. Con ayuda de un bisturí estéril cortar fragmentos de tejido infectado de 5x5 mm (manipular con pinzas estériles).
4. Sumergir los fragmentos de tejido por 5 minutos en una caja de Petri con una solución de hipoclorito de sodio 0.525%
5. Enjuagar 3 veces los fragmentos de tejido en agua destilada estéril.
6. Secar los fragmentos de tejido haciendo uso de una toalla de papel estéril, con el fin de eliminar los excesos de humedad que contribuyen con la contaminación del aislamiento. Realizar en cámara de flujo laminar.
7. Introducir el equivalente a 1 gramo de fragmentos de tejido, en 9 mL de una solución estéril de plátano al 0.1% (ver anexo N°3), incubar esta solución por 24 horas a temperatura ambiente (dilución  $10^{-1}$ ).
8. Realizar diluciones seriadas 1:10 del cultivo líquido realizado en el paso anterior, llegando hasta la dilución  $10^{-3}$ .
9. Sembrar por vertido cada dilución, pipeteando 1 mL de cada dilución en cajas de Petri que contienen Agar Papa Dextrosa (realizar por duplicado para cada dilución). Incubar a temperatura ambiente por 7 días.
10. Sembrar por esparcido en placa cada dilución, pipeteando 0.1 mL de cada dilución en cajas de Petri con Agar Papa Dextrosa (realizar por duplicado para cada dilución). Incubar a temperatura ambiente por 7 días.
11. Incubar a temperatura ambiente por 7 días.
12. Realizar el mismo procedimiento para soluciones de plátano al 5% y 1%
13. Realizar controles ambientales del área de trabajo.

**Cuadro N° 18.** Aislamiento por diluciones seriadas y vertido en placa

	Solución al 0.1%	Solución al 1%	Solución al 5%
10 <sup>-1</sup> (I)	Colonias redondas de borde liso, cóncavas y brillantes, de color crema.	Colonias puntiformes, color crema rosáceo, brillantes.	Colonias con borde irregular, algodonosas, pequeñas, de color blanco con forma de estrella.
	Colonias pequeñas en forma de estrellas algodonosas de color blanco.	Colonias circulares medianas, color crema amarillento, cóncavas, brillantes, borde liso.	
		Colonias blancas algodonosas, transparentes, borde irregular.	
10 <sup>-1</sup> (II)	Colonias redondas de borde liso, cóncavas y brillantes, de color crema.	Colonias puntiformes, color crema rosáceo, brillantes.	Colonias con borde irregular, algodonosas, pequeñas, de color blanco con forma de estrella.
	Colonias pequeñas en forma de estrellas algodonosas de color blanco.	Colonias circulares medianas, color crema amarillento, cóncavas, brillantes, borde liso.	
		Colonias blancas algodonosas, transparentes, borde irregular.	
10 <sup>-2</sup> (I)	Colonias pequeñas en forma de estrellas algodonosas de color blanco.	Colonias medianas, circulares, amarillentas, cóncavas, brillantes de borde liso.	Colonias algodonosas, grandes, color blanco con el centro negro.
			Colonias pequeñas en forma de estrellas algodonosas de color blanco.
10 <sup>-2</sup> (II)	Colonias redondas de borde liso, cóncavas y brillantes, de color crema.	Colonias medianas, circulares, amarillentas, cóncavas, brillantes de borde liso.	Colonias pequeñas en forma de estrellas algodonosas de color blanco.
	Colonias pequeñas en forma de estrellas algodonosas de color blanco.		
10 <sup>-3</sup> (I)	-----	-----	-----
10 <sup>-3</sup> (II)	Colonia pequeña en forma de estrella algodonosas de color blanco.	Colonias redondas de borde liso, cóncavas y brillantes, de color crema.	Colonias pequeñas en forma de estrellas algodonosas de color blanco.
		Colonias pequeñas en forma de estrellas algodonosas de color blanco.	

**Cuadro Nº 19.** Resultados de aislamiento por esparcido en placa

	SOLUCIÓN AL 0.1%	SOLUCIÓN AL 1%	SOLUCIÓN AL 5%
10 <sup>-1</sup> (I)	Colonias de hongos algodonosas, de color rosado y anaranjado con el centro más coloreado, con crecimiento horizontal.	Colonias pequeñas de color verde oscuro, con el centro de color café, algodonosas.	Colonias rojas, rosadas y blancas, algodonosas.
		Colonias naranjas, grandes, con el centro de color rosado, el centro crece hacia arriba.	
	Colonias redondas de borde liso con crecimiento cóncavo, de color crema.	Colonias algodonosas y grandes, de color rojo.	Colonias naranja, con el centro lustroso, aspecto chicloso, bordes irregulares (enramados).
	Colonias irregulares de color naranja con crecimiento plano, de aspecto opaco.	Colonias blancas, pequeñas, de aspecto algodonoso.	
10 <sup>-1</sup> (II)	Colonias pequeñas de hongos de color naranja, rosado y lila, blanco.	Colonias pequeñas de color verde oscuro, con el centro de color café, algodonosas.	Colonias rojas, rosadas y blancas, algodonosas.
	Colonias color crema de borde irregular.	Colonias naranjas, grandes, con el centro de color rosado, el centro crece hacia arriba.	Colonias naranja, con el centro lustroso, aspecto chicloso, bordes irregulares (enramados).
	Hongos con centro verde oscuro y aspecto algodonoso.	Colonias algodonosas y grandes, de color rojo.	
10 <sup>-2</sup> (I)	Colonias color naranja, y rosado algodonosas con el centro más oscuro.	Colonias blancas, pequeñas, de aspecto algodonoso.	Colonias naranjas, puntiformes, algodonosas.
		Colonias naranjas, de aspecto algodonoso, grandes.	Colonias rosadas, borde irregular, algodonosas.
	Borde liso, color crema opacas, con crecimiento cóncavo, presentan borde alto.	Colonias moradas, lila, algodonosas, aspecto irregular.	Colonia café con centro verde oscuro. Colonias blancas, algodonosas.
	Colonias irregulares de borde irregular, color crema, opacas, con la superficie llena de agujeros.	Colonias planas de borde liso, irregular, colores salmón, brillantes.	Colonias verde oscuro con el centro de estrella, algodonosas.

**Cuadro N° 19. Continuación**

10 <sup>-2</sup> (II)	Colonias algodonosas naranjas, rosadas y lilas con el centro oscuro	Colonias moradas, lila, algodonosas, aspecto irregular.	Colonias naranjas de aspecto irregular, puntiformes, aspecto algodonoso.
		Colonias naranjas con centro rosado, aspecto algodonoso.	Colonias rosadas, borde irregular, puntiformes y con aspecto algodonoso.
		Colonias blancas algodonosas.	Colonia café con centro verde oscuro.
		Colonias planas de borde liso, irregular, color salmón, brillante.	Colonias blancas, algodonosas.
			Colonia negra, puntiforme, algodonosa.
10 <sup>-3</sup> (I)	Irregular, color crema de aspecto opaco con la superficie llena de agujeros.	Colonias de borde irregular, redondas, de color crema, con crecimiento cóncavo. Colonias verdes oscuro con centro rojo, algodonosas.	Colonia blanca grande algodonosa.
	Hongo lila de aspecto algodonoso, presenta una coloración naranja al centro.		
10 <sup>-3</sup> (II)	Colonia con el centro verde oscuro, alrededor presenta una masa blanquecina transparente.	Colonia naranja grande con centro rosado de aspecto algodonoso.	Colonia verde oscuro con centro rojizo.
		Colonia verde oscuro con centro rojizo.	Colonia café con centro rojizo.
		Colonia café con centro rojizo.	
		Colonia lila con centro rosado.	
		Colonia borde liso, redonda de color crema, aspecto chicloso.	

Al desarrollar las dos metodologías antes descritas y analizar las ventajas y desventajas de cada una se pudo concluir que la técnica de vertido en placa evita un mayor contacto del agar y la muestra con el ambiente, sin embargo, esta es más adecuada para un número de muestras más pequeño y cuando solo se requiere de un conteo de los microorganismos presentes en la muestra por

presentar crecimiento de colonias subsuperficiales, por lo tanto, la técnica utilizada fue por esparcido ya que promueve un crecimiento superficial facilitando el aislamiento de los hongos y levaduras presentes en las muestras, a pesar que esta presenta la desventaja de tener un mayor contacto el agar con el ambiente, esto se controló mediante controles ambientales y haciendo uso de la cabina de flujo laminar. En el Cuadro N° 20 se describen las ventajas y desventajas de los métodos utilizados para el aislamiento de patógenos.

**Cuadro N° 20.** Ventajas y desventajas de los métodos de aislamiento de patógenos.

Método		Ventajas	Desventajas
Directo		-Menor cantidad de procesos para la siembra de la muestra.	- Presenta una mezcla de microorganismos, que crecen apilados dificultando en el aislamiento
Diluciones seriadas	Vertido en placa	-Solución homogénea. -Daña a los microorganismos sensibles al calor por el agar fundido. - Presenta colonias que crecen subsuperficiales en el agar, dificultando el aislamiento.	-Permite el crecimiento aislado de cada microorganismo. - Idóneo para conteo de microorganismos totales en una muestra. -Requiere mayor tiempo para el procesamiento de muestras grandes.
	Esparcido	- Solución homogénea. -Buen aislamiento de los microorganismos. - Evita el contacto de las células con el agar fundido. -Provee un crecimiento superficial de las colonias, facilitando el aislamiento. -Requiere menor tiempo	-Mayor exposición del agar al ambiente.

**ANEXO Nº 2**  
**ENSAYOS PRELIMINARES PRUEBA DE PATOGENICIDAD**

## **Prueba de patogenicidad de hongos aislados de lesiones de antracnosis en plátano <sup>(2)</sup>**

Para esta prueba se utilizaron 2 plátanos maduros con aspecto sano provenientes del Mercado de Santiago Nonualco, Departamento de La Paz.

1. Limpiar la superficie de la cáscara de los plátanos utilizando torundas de algodón humedecidas con etanol al 70% para eliminar los contaminantes, enjuagar 3 veces en agua estéril para eliminar el alcohol restante en la superficie del fruto, y secar con toallas de papel estériles.
2. Haciendo uso de diez alfileres (#1) firmemente atados con una goma previamente esterilizadas en el mechero y enfriados, inducir dos heridas leves de aproximadamente 0.5 cm de diámetro con una distancia de 6 cm en uno de los plátanos y al otro plátano hacer una marca con una distancia de 6 cm haciendo uso de un marcador permanente (ambos plátanos deben estar libres de signos de antracnosis).
3. Tomar discos miceliales (0.5 cm de diámetro) desde el borde de las colonias de patógenos crecidas en PDA con 7 días de edad e inocularlas en los dos plátanos (herido y sano), en las marcas inducidas en el paso 2.
4. El control se trata con discos de PDA en lugar del inóculo fúngico.
5. Mantener las muestras en bolsa plásticas estériles a temperatura ambiente.
6. Observar diariamente durante 4 días el desarrollo de los síntomas, levantando con una aguja estéril los discos miceliales PDA para realizar mediciones precisas de las lesiones.
7. Calcular la velocidad de ampliación de la lesión utilizando la siguiente formula:

$$VA = \left[ \frac{2 \times Gr_1}{1} \right] + \left[ \frac{2 \times (Gr_1 + Gr_2)}{2} \right] + \left[ \frac{2 \times (Gr_1 + Gr_2 + Gr_3)}{3} \right] + \left[ \frac{2 \times (Gr_1 + Gr_2 + Gr_3 + Gr_4)}{4} \right]$$

Donde:

VA: velocidad de ampliación.

Gr: radio de la lesión después da la inoculación (para cada día)

2x: referencia a dos puntos de inoculación por fruta.

En la Tabla N° 3, se muestran los resultados obtenidos del ensayo preliminar de patogenicidad en los 4 días de incubación con sus respectivas medidas diarias (radio de la lesión en el plátano inoculado) y el valor de la velocidad de ampliación de la lesión de cada hongo.

**Tabla N° 3.** Velocidad de ampliación de la lesión en prueba preliminar de patogenicidad.

No. cepa	DÍA	SANO (CM)		PROM.	VA(4)	HERIDO (CM)		PROM.	VA(4)
1	1	0.0	0.0	0.0	1.05	0.3	0.4	0.35	5.005
	2	0.0	0.0	0.0		0.6	0.6	0.6	
	3	0.6	0.6	0.6		0.9	0.9	0.9	
	4	0.7	0.7	0.7		2.2	2.6	2.4	
2	1	0.0	0.0	0.0	2.25	0.0	0.0	0.0	2.835
	2	0.0	0.5	0.25		0.5	0.6	0.65	
	3	0.7	0.6	0.65		0.7	0.9	0.8	
	4	1.8	2.0	1.9		1.0	1.0	1.0	
3	1	0.0	0.0	0.0	1.025	0.9	0.7	0.8	6.905
	2	0.0	0.0	0.0		1.0	0.7	0.85	
	3	0.5	0.5	0.5		1.0	0.9	0.95	
	4	0.8	1.1	0.95		1.4	1.1	1.25	
4	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.55
	2	0.0	0.0	0.0		0.5	0.5	0.5	
	3	0.0	0.0	0.0		0.8	0.9	0.85	
	4	0.0	0.0	0.0		1.0	0.9	0.95	
5	1	0.0	0.0	0.0	0.925	0.0	0.3	0.15	3.525
	2	0.0	0.0	0.0		0.5	0.7	0.6	
	3	0.4	0.5	0.45		0.8	1.0	0.9	
	4	0.8	0.8	0.8		1.0	1.2	1.1	
6	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.6
	2	0.0	0.0	0.0		0.5	0.6	0.55	
	3	0.0	0.0	0.0		0.7	0.7	0.7	
	4	0.0	0.0	0.0		1.0	1.3	1.15	
7	1	0.0	0.0	0.0	0.425	0.5	0.5	0.5	6.00
	2	0.0	0.0	0.0		0.9	0.7	0.8	
	3	0.0	0.0	0.0		1.1	0.9	1.0	

**Tabla N° 3.** Continuación

No. cepa	DÍA	SANO (CM)		PROM.	VA(4)	HERIDO (CM)		PROM.	VA(4)
	4	0.8	0.9	0.85		2.1	2.0	2.05	
8	1	0.0	0.0	0.0	3.005	0.0	0.0	0.0	3.255
	2	0.5	0.6	0.55		0.6	0.6	0.6	
	3	0.9	1.1	1.0		1.0	1.2	1.1	
	4	1.2	1.4	1.3		1.3	1.4	1.35	
9	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.9
	2	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	
	3	0.0	0.0	0.0		0.5	0.5	0.5	
	4	0.0	0.0	0.0		0.6	0.5	0.55	
10	1	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	2.325
	2	0.0	0.0	0.0		0.4	0.4	0.4	
	3	0.0	0.0	0.0		0.7	0.9	0.8	
	4	0.9	0.7	0.8		0.9	1.2	1.05	
11	1	0.5	0.4	0.45	4.925	0.6	0.5	0.55	6.00
	2	0.7	0.5	0.6		0.7	0.7	0.7	
	3	1.0	0.8	0.9		1.3	1.1	1.2	
	4	1.5	1.3	1.4		1.7	1.4	1.55	
12	1	0.0	0.0	0.0	0.35	0.5	0.4	0.45	4.8
	2	0.0	0.0	0.0		0.6	0.7	0.65	
	3	0.0	0.0	0.0		0.6	0.8	0.7	
	4	0.6	0.8	0.7		1.3	1.5	1.4	
control	1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	2	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	
	3	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	
	4	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0	0.0	

Con los resultados de la tabla N° 3 se pudo comprobar que el método para la determinación de patogenicidad en los hongos y levaduras aislados promueve el crecimiento de lesiones a partir de los hongos que tienen carácter patógeno y permite la medición diaria de las lesiones sin ninguna dificultad.

**ANEXO N° 3**

**AISLAMIENTO DE MOHOS Y LEVADURAS POR MÉTODO DE  
CULTIVO DIRECTO**



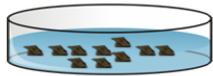
1. Lavar los plátanos con abundante agua y jabón.



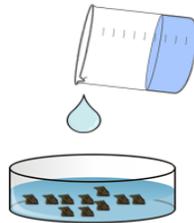
2. Secar el exceso de agua con papel toalla estéril.



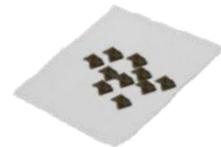
3. Con un bisturí estéril cortar 10 fragmentos de tejido infectado y sano de 5x5 mm.



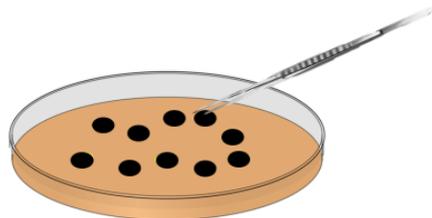
4. Sumergir los trozos en una solución de Hipoclorito de Sodio al 0.525%



5. Hacer tres enjuagues con agua estéril.



6. Secar los trozos de tejido, en papel toalla estéril.



7. Colocar 10 fragmentos de tejido equidistantemente e incubar a temperatura ambiente por 7 días.

**Figura N° 14.** Método de aislamiento por cultivo directo de tejido.

**ANEXO N° 4**

**AISLAMIENTO DE MOHOS Y LEVADURAS POR MÉTODO DE  
DILUCIONES SERIDAS**



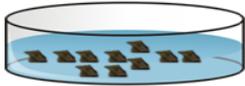
1. Lavar los plátanos con abundante agua y jabón.



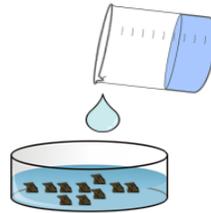
2. Secar el exceso de agua con papel toalla estéril.



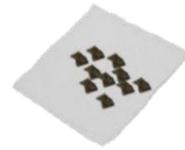
3. Con un bisturí estéril cortar 10 fragmentos de tejido infectado y sano de 5x5 mm.



4. Sumergir los trozos en una solución de Hipoclorito de Sodio al 0.525%.

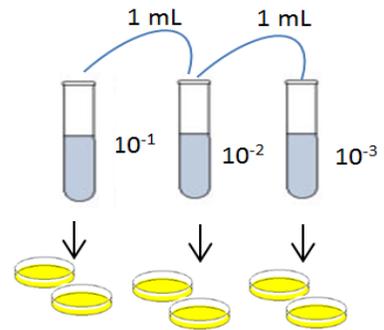


5. Hacer tres enjuagues con agua estéril.



6. Secar los trozos de tejido, en papel toalla estéril.

7. Introducir 1g de tejido en 9 mL de solución estéril de plátano al 0.1%, dilución  $10^{-1}$  e incubar por 24 horas a  $27^{\circ}\text{C}$ .



8. Pipetear 0.1 mL en cada placa y esparcir la muestra.



9. Incubar por 7 días a  $27^{\circ}\text{C}$ .

**Figura Nº 15.** Método de aislamiento por diluciones seriadas

**ANEXO N° 5**

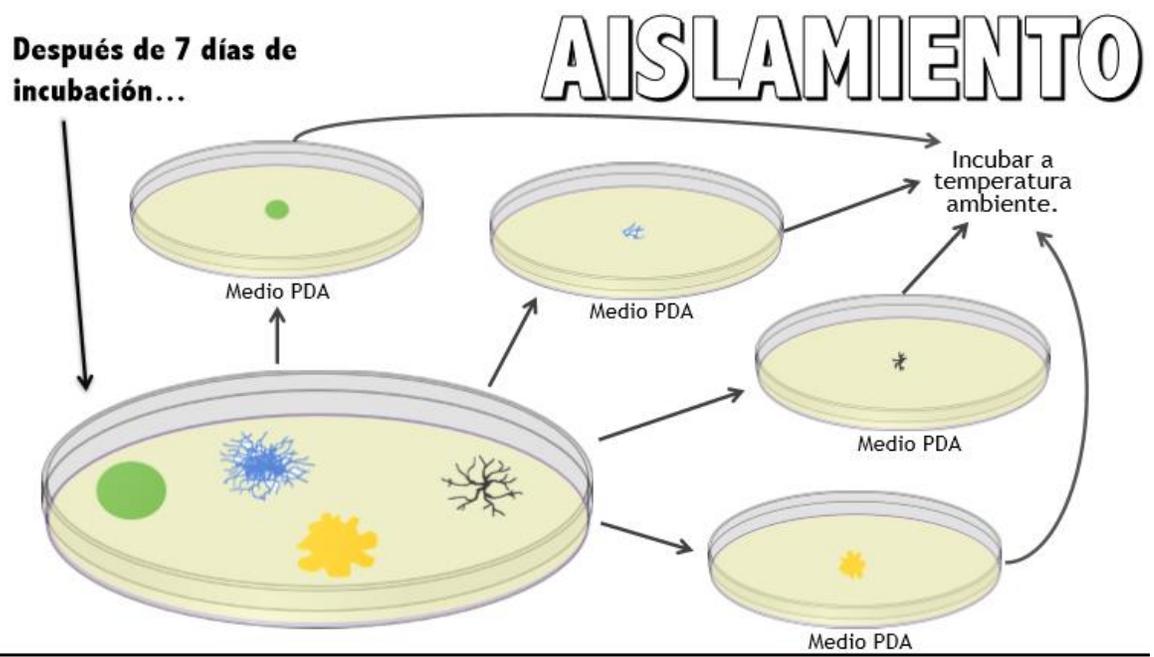
**PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN ESTÉRIL DE PLÁTANO**

## **Procedimiento**

1. Lavar con agua y jabón un plátano maduro que no presente signos de antracnosis.
2. Cortar, con ayuda de un bisturí, trozos de cáscara y pulpa de plátano, pesar 5 gramos.
3. Licuar los trozos de plátano con 100 ml de agua destilada (solución al 5%).
4. Realizar diluciones hasta llegar a una concentración de 0.1%
5. Transferir la solución de plátano a tubos con rosca y esterilizar.

**ANEXO N° 6**

**AISLAMIENTO DE MOHOS Y LEVADURAS**

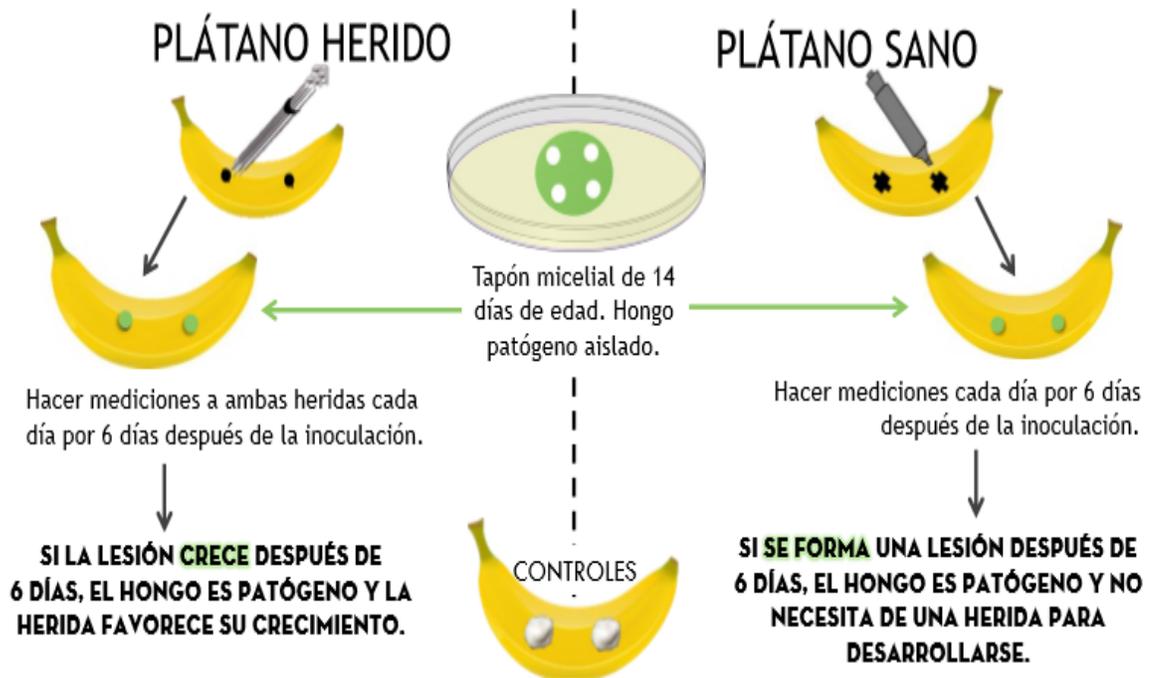


**Figura Nº 16.** Aislamiento de colonias fúngicas observadas

**ANEXO N° 7**

**PRUEBA DE PATOGENICIDAD**

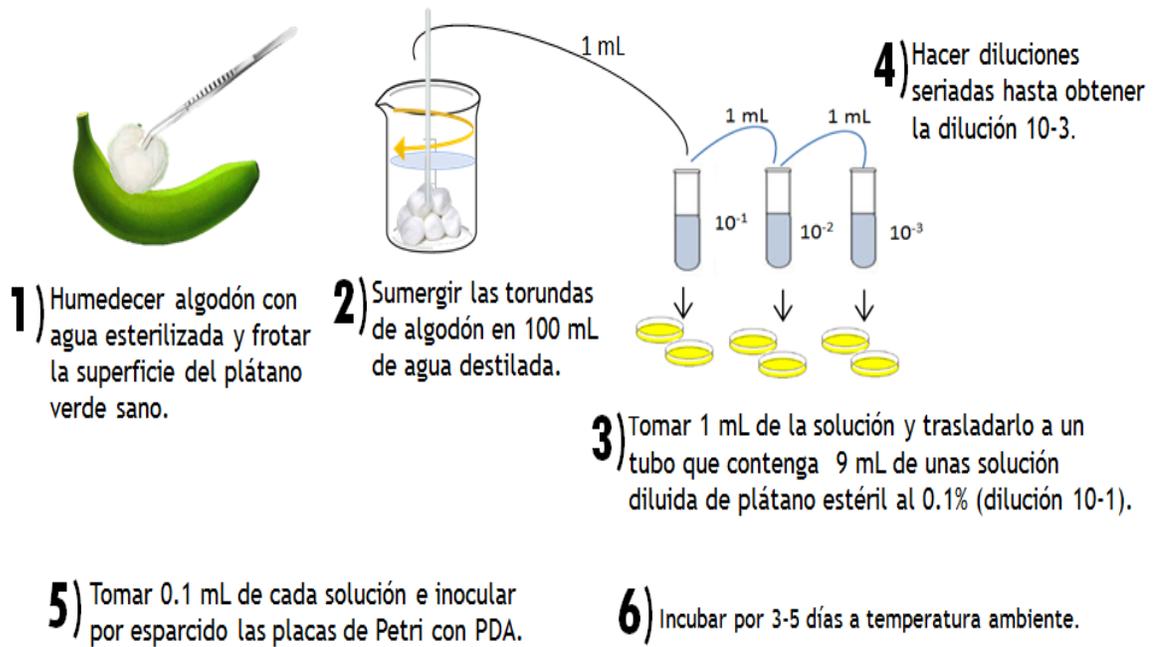
1. Limpiar el fruto con torundas de algodón humedecidas con etanol 70%
2. Enjuagar 3 veces en agua estéril.
3. Secar con papel toalla estéril.



**Figura Nº 17.** Prueba de patogenicidad

**ANEXO N° 8**

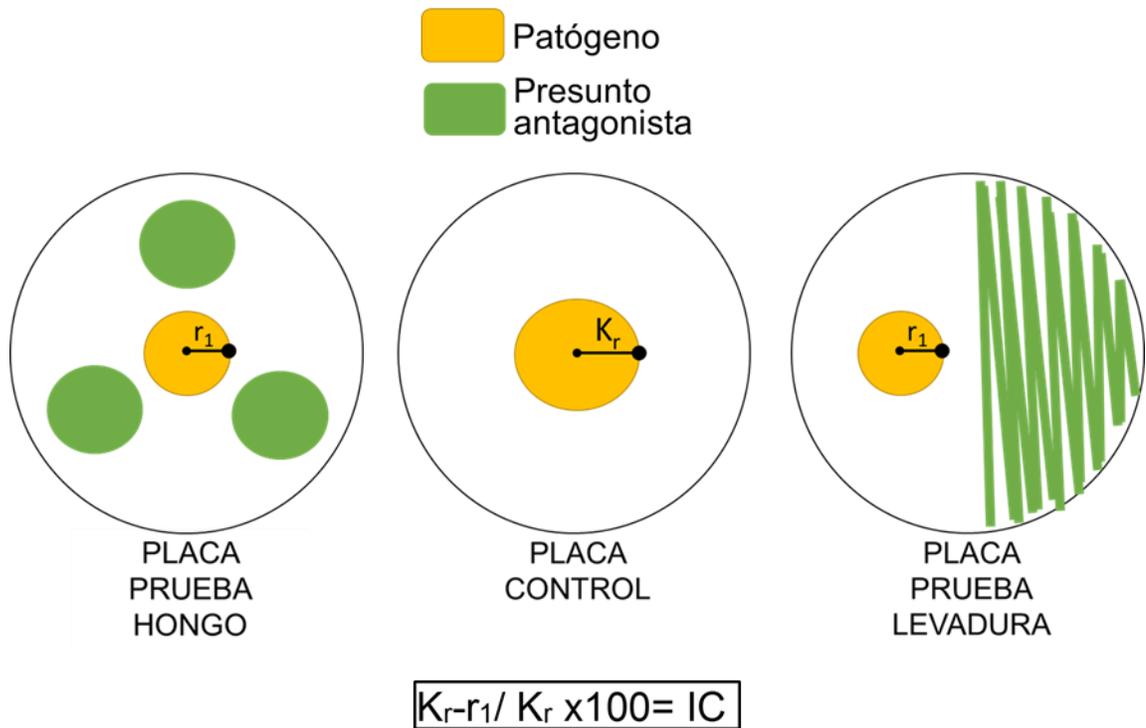
**AISLAMIENTO DE MOHOS Y LEVADURAS EPÍFITOS**



**Figura N° 18.** Aislamiento y selección de hongos epífitos antagonistas en el plátano

**ANEXO N° 9**

**PRUEBA DE INCUBACIÓN DUAL PARA MOHOS Y LEVADURAS**



**Figura N° 19.** Prueba de incubación dual

Donde:

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

$r_1$  = margen de distancia del crecimiento de hongos desde el centro hasta la dirección del antagonista.

**ANEXO N° 10**  
**PREPARACIÓN DE REACTIVOS PARA PCR**

### Buffer de extracción 1 (BE1)

Por litro	Concentración de adición	Concentración final
0.5 M EDTA pH 8.0	100 mL	50 mM
1M tris pH 8.0	100 mL	100 mM
4 M NaCl	125 mL	500 mM
H <sub>2</sub> O destilada	Hasta un litro	
BME (mercaptoetanol)	700 µL (agregar después de autoclavar)	

### TE

Por litro	Concentración de adición	Concentración final
0.5 M EDTA pH 8.0	20 mL	10 mM
1 M Tris pH 8.0	50 mL	50 mM
H <sub>2</sub> O destilada	Hasta 1 L	

SDS al 20% (no esterilizar en autoclave) preparar en cabina de flujo laminar

Para 100 mL	Concentración de adición
SDS	20 g
H <sub>2</sub> O destilada	80 mL

### Acetato de potasio 5M (KOAC)

Para 100 mL	Concentración de adición
KOAC	49.1 g
H <sub>2</sub> O destilada	Hasta 100 mL

### Acetato de sodio 3M (NaOAC)

Para 100 mL	Concentración de adición
NaOAC	24.6 g
H <sub>2</sub> O destilada	Hasta 100 mL

**ANEXO Nº 11**

**MÉTODO ALTERNO DE AISLAMIENTO DE ADN UTILIZANDO  
ARNASAS**

## Procedimiento

1. Cortar tres discos miceliales del patógeno con 7 días de incubación en PDA en un erlenmeyer que contenga 100 mL de caldo Sabouraud e incubar por 7 días a temperatura ambiente.
2. Filtrar el micelio contenido en el caldo Sabouraud con papel watman N°1 estéril.
3. Secar el micelio con ayuda de papel watman estéril.
4. Pesar aproximadamente 0.05g del hongo aislado que mostró mayor patogenicidad.
5. Moler el micelio con ayuda de mortero y pistilo el tejido en presencia de nitrógeno líquido, transferir el polvo fino a un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
6. Adicionar 750  $\mu$ L de solución Buffer de Extracción 1 (BE1), adicionar 50  $\mu$ L de dodecilsulfato sódico (SDS) al 20%, cerrar el tubo y mezclar por agitación vigorosa, e incubar en baño de agua a 65°C durante 10 minutos.
7. Añadir 2  $\mu$ L de la solución de ARNasa al ADN y mezclar invirtiendo el tubo.
8. Incubar a 37°C (temperatura de activación de la ARNasa) por 15 minutos.
9. Transcurridos los 10 minutos de incubación añadir 250  $\mu$ L de Acetato de Potasio (KOAC) de concentración 5M, mezclar bien por agitación vigorosa, y proceder a la incubación a 0°C (en hielo) durante 20 minutos.
10. Centrifugar la muestra a 13000 rpm 10 minutos, retirar cuidadosamente el sobrenadante utilizando una micropipeta y recibir en un tubo de microcentrífuga que contiene 700  $\mu$ L de isopropanol puro, invertir el tubo 20 veces para mezclar bien e incubar a -20°C durante un mínimo de 30 minutos.
11. Centrifugar la muestra a 12000 rpm durante 15 minutos en una centrifuga, retirar cuidadosamente el sobrenadante y lavar el precipitado (ADN) con etanol al 70%.
12. Retirar el etanol utilizando micropipeta e invertir el tubo sobre toallas de papel para secar durante 10 minutos.

13. Disolver el ADN con 700 mL de TE, dejar reposar durante la noche a 4°C.
14. Centrifugar la muestra a 12000 rpm en una microcentrifuga durante 10 minutos para eliminar los residuos insolubles.
15. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo de microcentrifuga y añadir 75 µL de Acetato de Sodio (NaOAc) 3M y 500 µL de isopropanol, mezclar bien invirtiendo el tubo 20 veces y dejar sedimentar el ADN durante 30 segundos utilizando una microcentrifuga a 12000 rpm, lavar con 500 mL de etanol (EtOH) al 70%, y secar completamente. Volver a disolver en 100 µL de TE.
16. Verificar cantidad e integridad del ADN con Nanodrop o mediante electroforesis.

**ANEXO N° 12**

**ESPECTRO DE SECUENCIACIÓN DE LAS MUESTRAS 4 Y 13.**





File: 13B\_JTS4.ab1 Run Ended: 2017/2/17 18:47:4 Signal G:1649 A:2175 C:3237 T:2878  
Sample: 13B\_JTS4 Lane: 11 Base spacing: 17.436087 563 bases in 6763 scans Page 1 of 1

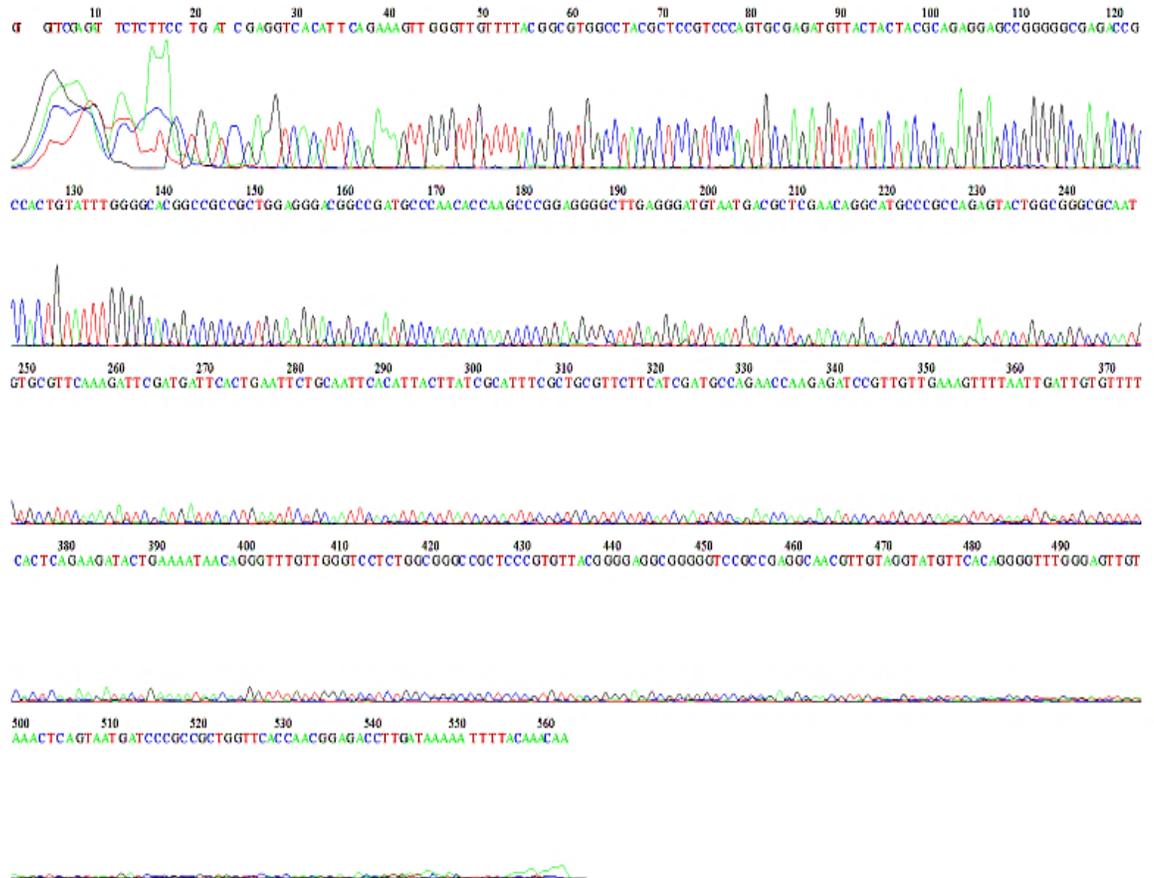


Figura Nº 21. Secuenciación correspondiente al patógeno 13

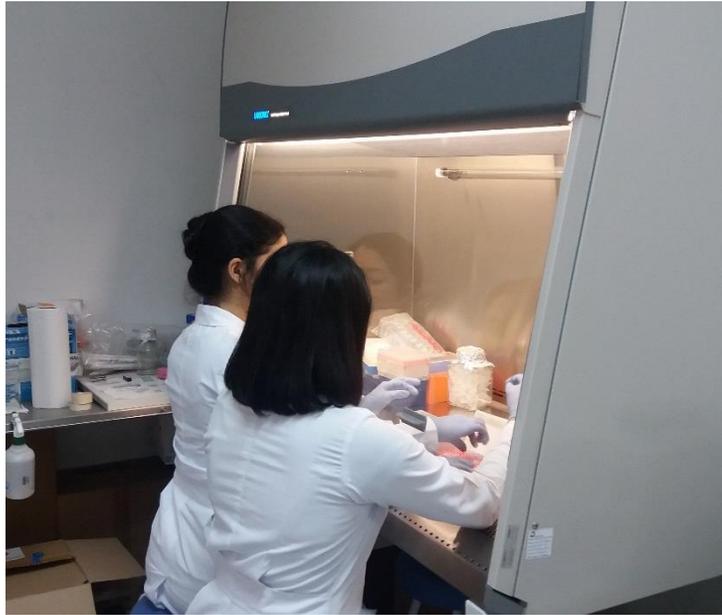
**ANEXO Nº 13**  
**MEMORIA DE IMÁGENES DE LA INVESTIACIÓN**



**Figura N° 22.** Preparación de placas con PDA en cabina de flujo laminar



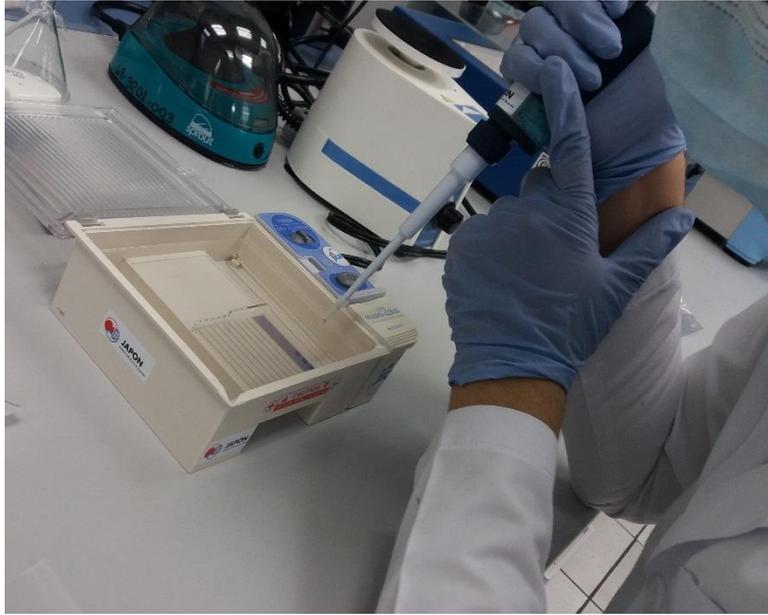
**Figura N° 23.** Método de esparcido en placa



**Figura N° 24.** Extracción de ADN en cabina de flujo laminar



**Figura N° 25.** Diluciones seriadas para el aislamiento de mohos y levaduras



**Figura N° 26.** Llenado de pocillos en gel de agarosa al 1%.

