

## Conservación de Agentes Patógenos y Epífitos Presentes en los Cultivos de Tomate, Sandía y Banano y sus Beneficios para la Investigación

L. Espinoza\* <sup>(1)</sup>, M. Jiménez <sup>(1)</sup>, E. Peralta <sup>(1)</sup>

(1)Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador

Escuela Superior Politécnica del Litoral

Campus “Gustavo Galindo Velasco” La Prosperina Km. 30.5 vía Perimetral

\*ldespino@espol.edu.ec

### Resumen

*Los organismos patógenos tienen una gran importancia dentro de los ecosistemas, ya sea causando daños a la salud de humanos y animales o afectando a cultivos de importancia económica. A nivel mundial, el conocimiento de estas especies es vital para ofrecer soluciones para evitar los efectos del ataque de estos microorganismos. Por esta razón en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) se han comenzado investigaciones enfocadas a identificar y conservar las especies patógenas que están afectando a los cultivos de tomate, sandía y banano en la Península de Santa Elena y la zona de Taura. Para esto, se recolectaron muestras de plantas con síntomas de enfermedades, las que fueron procesadas en el laboratorio con la finalidad de aislar e identificar los agentes causales. Se encontraron especies de hongos pertenecientes a los géneros Fusarium, Botrytis, Alternaria y Mycosphaerella. No se detectó la presencia de bacterias fitopatogénicas. Lo más relevante de las observaciones en campo fue la presencia en la totalidad de las fincas visitadas de síntomas de virosis en los cultivos de tomate y sandía. Luego de la identificación de los microorganismos estos fueron conservados a -80°C para la realización de estudios posteriores.*

**Palabras claves:** conservación, microorganismos patógenos, tomate, sandía, banano, Península de Santa Elena, Taura

### Abstract

*Pathogenic organisms have an enormous importance in ecosystems, causing human and animal diseases or affecting crops with economic importance. Worldwide the knowledge of its species is vital to offer solutions to avoid the effect of microorganisms infection. The objective of this project is identify and conserve the pathogenic species that affect tomato, watermelon and banana crops that cause the most important issues at the Santa Elena Peninsula and in Taura zone. To fulfill the objectives of this project, the samples that present symptoms of diseases should be collected from field, then samples were analyzed and different microorganism were isolate and identified. Fungus belonging to Fusarium, Botrytis, Alternaria and Mycosphaerella genres were identifying. In the case of bacterial diseases, it wasn't present anyone. The most relevant that was observed at field was the presence of virus diseases symptoms in all the visited farms, but it was only in tomato and watermelon crops. After al the process of identification, the microorganisms were conserved on freezing at -80°C to perform subsequent studies.*

**Key words:** Conservation, pathogenic microorganisms, tomato, watermelon, banana, Santa Elena Peninsula, Taura

Recibido: Junio, 2009

Aceptado: Agosto, 2009

## 1. Introducción

A nivel mundial los microorganismos patógenos han representado y representan un serio problema para los humanos, animales y plantas, siendo agentes causales de enfermedades, que además de provocar daños a la salud, ocasionan pérdidas en cultivos de importancia económica [1].

A fin de aplicar mejores técnicas en el control de agentes patógenos es necesario conocer ampliamente sus características morfológicas y patogénicas, clasificando especies y manteniendo diferentes cepas para poder realizar investigaciones útiles para el diagnóstico y manejo efectivo de estas enfermedades que ocasionan tanto daño a los agricultores [2].

Cultivos como el tomate y la sandía, no tradicionales, estacionarios y generalmente no tecnificados, han sido muy poco estudiados en la Costa. La presencia de problemas fitosanitarios impone la necesidad de conocer sus causas para poder encontrar soluciones a lo que implicaría pérdidas en producción y serios problemas a nivel social, ya que la mayor parte de los productores son pequeños campesinos de limitados recursos que dependen de los cultivos de ciclo corto [3].

Por otra parte, el banano es uno de los cultivos más extendidos en Ecuador con 180.000 hectáreas sembradas y representa el 12% de la fuente de trabajo. Su principal limitante es la Sigatoka negra, enfermedad causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, el que además de causar daños a las plantas, incrementa considerablemente los costos de producción y la contaminación ambiental. Por otra parte, el gran número de fumigaciones que se aplica por año, incrementa la resistencia de este patógeno a los fungicidas de uso regular [4].

Otro problema relevante es el desconocimiento de enfermedades virales que se encuentran presente en el país, afectando generalmente a los cultivos de ciclo corto. Tal fue el caso en el año 2007, donde una virosis desconocida, –identificada con posterioridad por técnicos de la Compañía Monsanto–, afectó los cultivos de melón, sandía, tomate, pepino y pimiento en la provincia de Manabí, provocando pérdidas superiores a los 8 millones de dólares [5].

Teniendo en cuenta los problemas anteriormente señalados, es importante que en el país se cuente con un banco de microorganismos para poder desarrollar investigaciones dirigidas a caracterizarlos, conocer la variabilidad genética de sus poblaciones y determinar su sensibilidad a

pesticidas, entre otros. Esto permitiría mejorar las posibilidades de diagnóstico y manejo.

Es por esto que el objetivo de este trabajo, fue conocer y conservar agentes patógenos de interés, que sirvan para un estudio a futuro de los principales problemas que se encuentran afectando cultivos de importancia económica, además de iniciar una línea de investigación en el Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) encaminada a profundizar en la conservación y caracterización de microorganismos no solo patógenos sino benéficos.

## 2. Materiales y métodos

*Recolección de muestras y descripción de síntomas:* Se inspeccionaron tres fincas de la Península de Santa Elena (Agrofuturo, Biofuel y Fca. Sr. Arias) e igual cantidad en la zona de Taura (Hda. San Humberto, Fca. Sr. Arévalo y Fca. Sr. Villa).

Las variedades muestreadas fueron Ruby y Extasis, en sandía; Daniela y Ginat en tomate y Williams en banano. Además, se realizaron observaciones en cultivos de zapallo, pimiento y pepino que se encontraban alrededor de los sembríos de interés. Los muestreos realizados fueron dirigidos de acuerdo a los diferentes síntomas observados. Se tomaron muestras de hojas, frutos, tallos y raíces afectados. Las muestras fueron convenientemente identificadas y registradas, procediéndose a la descripción de los síntomas. Adicionalmente, se tomaron muestras sin síntomas como control.

*Procesamiento de muestras:* Las muestras con síntomas similares a los producidos por hongos fitopatógenos fueron desinfectadas superficialmente con una solución de hipoclorito (20%) y alcohol (10%) y luego lavadas con agua estéril. Una vez desinfectadas, se colocaron en cámara húmeda para permitir el desarrollo de las estructuras de los microorganismos presentes y se las dejó en incubación por cinco días a temperatura ambiente.

Para realizar el aislamiento de microorganismos epífitos se limpió las hojas con un poco de agua estéril y de igual manera las muestras fueron colocadas en cámara húmeda.

Seguido de la incubación en cámara húmeda, se procedió a seleccionar las estructuras con ayuda de una aguja; estas fueron transferidas a un medio semisólido nutritivo, (Papa Dextrosa Agar, PDA), y se incubaron durante siete días a 28°C. Luego de obtener los cultivos primarios, se procedió a realizar varios subcultivos para purificar las muestras obtenidas y poder determinar las características morfológicas de

las colonias puras. A partir de estas, se realizó la identificación de los hongos utilizando claves taxonómicas [6].

Luego de la identificación de cada uno de los microorganismos, se seleccionó los de importancia, de acuerdo a la frecuencia en que fueron encontrados y la compatibilidad con los síntomas observados. Se reprodujeron en medio líquido de papa dextrosa (PDB) durante siete días a 28°C. Una vez transcurrido este período y comprobada la multiplicación del microorganismo, se tomó 1ml del medio y se le agregó 20% de glicerol al 30%, se identificó y registró, colocándose a -80 °C. Por otra parte, las esporas de los hongos identificados fueron recolectadas y liofilizadas, conservándose en refrigeración a 4°C.

Las muestras con síntomas similares a los producidos por virus fueron conservadas en sílica gel y bajo refrigeración (Matthews, 2004). Se seleccionaron siete muestras (tres de tomate, tres de sandía y una de banano) con síntomas semejantes a los descritos para el virus del mosaico del pepino (CMV), las que fueron evaluadas mediante la técnica ELISA de triple sándwich (ELISA-TAS), empleando el kit comercial Compound ELISA, reagent set for CMV y el procedimiento sugerido por el fabricante (Agdia Incorporated).

### 3. Resultados

En las observaciones de campo realizadas en las plantaciones de tomate se observó una mayor incidencia de manchas foliares concéntricas que van de color café a amarillo. Se apreció también, aunque en menor grado, la presencia de pudrición blanda en frutos con presencia de micelio gris. Como síntomas compatibles con enfermedades virales se encontró la presencia de moteado, “ampollamiento” (“blistering”), clorosis, acucharamiento y deformación foliares; en frutos se evidenció la presencia de decoloraciones más o menos severas, en forma de manchas generalmente circulares, de color verde, amarillo o un tono más claro, que contrasta con el color rojo de los frutos maduros. Tales frutos se encontraron eventualmente en plantas secas o con parte de su follaje seco. Se observó también plantas de menor tamaño (Fig. 1).

En sandía, los problemas principales fueron: muerte de plantas; aparentes manchas necróticas en los ases vasculares del tallo y presencia de moteado clorótico en las hojas, además de deformidad en los frutos y plantas de menor tamaño. Los principales síntomas observados en banano fueron manchas foliares, con predominancia de manchas estriadas necróticas

(Fig. 1). Se observaron algunos síntomas compatibles con deficiencias nutricionales y una planta con síntomas de mosaico leve.

En todas las fincas visitadas se observaron síntomas virales, así como elevadas poblaciones de moscas blancas evidentes a simple vista, y presencia de otros insectos como thrips y áfidos. La existencia de insectos conocidos como vectores eficaces de numerosas enfermedades virales puede explicar la abundancia de síntomas característicos observada en las diferentes fincas.



**Figura 1.** Sintomatología encontrada en campo: A. Hoja de sandía con moteado clorótico B. Planta de tomate con aparentes síntomas de virus C. Hoja de sandía con acartuchamiento D. Tomate con manchas de bronceado E. Planta de tomate con síntomas de arpillamiento en las hojas F. Sintoma de clorosis en hojas de tomate, G. Estrias necróticas en banano

Por otra parte, en las observaciones realizadas en plantaciones de zapallo, pimiento y pepino cercanas a los cultivos de interés, se notó una alta incidencia de virus (Fig. 2).

Tales observaciones deben ser tomadas como un alerta, teniendo en cuenta que la aparición de nuevas patologías y la emergencia o re-emergencia de enfermedades conocidas, entre ellas algunas virales de interés, ha venido incrementándose durante las últimas décadas,

constituyendo un desafío, tanto para los agricultores como para la comunidad científica [8].



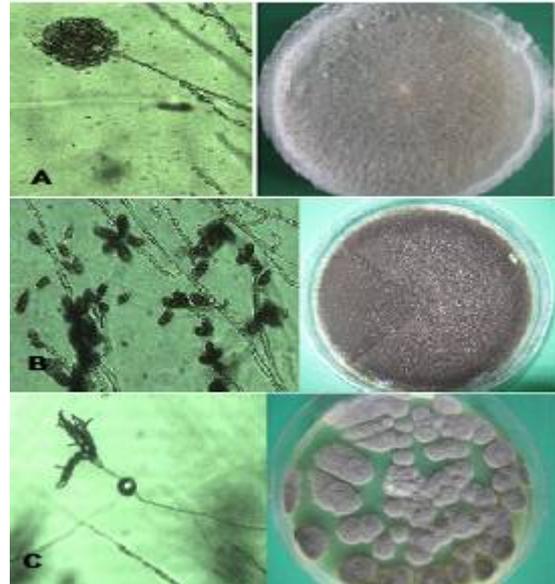
**Figura 2.** A. Clorosis total y arronchamiento en hojas de zapallo B. Clorosis en el borde de la hoja de zapallo C. Planta de pimienta con síntomas de virosis D. Hoja de pimienta con clorosis en la hoja a excepción de las nervaduras E. Moteado clorótico en pimienta F. Hoja de pepino con clorosis síntomas de ataque de virus.

Los análisis realizados en el laboratorio permitieron la identificación de cuatro hongos patógenos y tres epífitos de importancia. En la Tabla 1, se describen las características morfológicas de las colonias de los microorganismos aislados.

**Tabla 1.** Morfología de microorganismos aislados

PARTE AEREA	TEXTURA	TOPOGRAFIA	TASA DE CRECIMIENTO	CULTIVO AISLADO	ESPECIE
Gris claro	Algodonosa	Aplanada	Lenta	Tomate	<i>Botrytis sp</i>
Negro	Polvorienta	Aplanada	Lenta	Tomate, Sandía, Banano	<i>Curvularia lunata</i>
Gris oscuro	Aterciopelada	Aplanada	Lenta	Tomate, Sandía	<i>Alternaria alternata</i>
Verde oscuro	Polvorienta	Aplanada	Rapida	Tomate, Sandía	<i>Penicillium sp</i>
Crema	Algodonosa	Aplanada	Rapida	Sandía	<i>Mucor sp</i>
Blanco	Algodonosa	Aplanada	Rapida	Tomate, Sandía, Banano	<i>Fusarium oxysporum</i>
Blanco	Algodonosa	Rugosa	Lenta	Banano	<i>Mycosphaerella fijiensis</i>

Además, se logró identificar las estructuras microscópicas de cada uno de los microorganismos epífitos (Fig. 3).



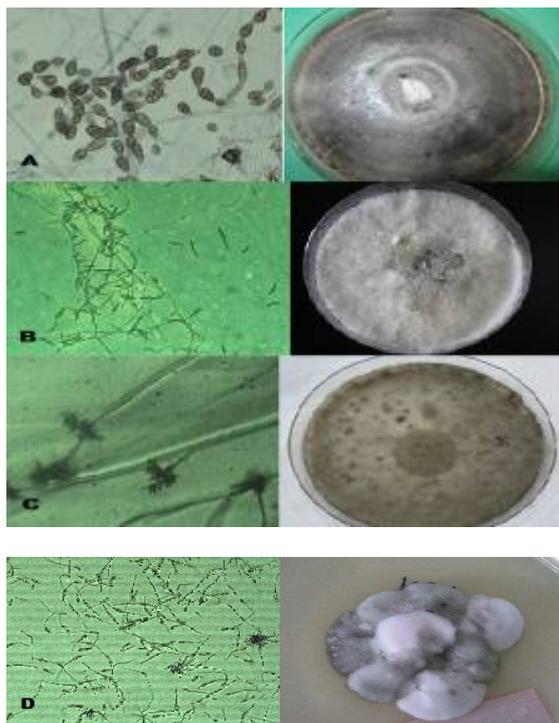
**Figura 3.** Estructuras microscópicas y colonias de hongos epífitos: A. *Mucor sp*, B. *Curvularia lunata*, C. *Penicillium sp*.

Estos microorganismos se encontraron presente principalmente en los cultivos de sandía y tomate, a excepción de *Curvularia lunata* y *Fusarium oxysporum* que se encontraron en los tres cultivos, pero en banano este hongo identificado no es de importancia económica [9].

*Alternaria alternata* fue aislada a partir de manchas foliares circulares concéntricas que van de color café a amarillo, recoletadas tanto en sandía como en tomate.

Se identificó la presencia de *Fusarium oxysporum* asociado a manchas amarillentas foliares tanto en tomate como en banano, mientras que *Botrytis sp* se encontró solo en tomate, a partir de pequeñas lesiones de color pardo en las hojas y podredumbre acuosa en frutos, con un micelio gris. En el caso de *Mycosphaerella fijiensis* solo se presentó en los cultivos de banano y se obtuvo a partir de manchas cafés en forma de estrías.

La figura 4 muestra las colonias de las especies mencionadas, así como las estructuras microscópicas útiles para su identificación.

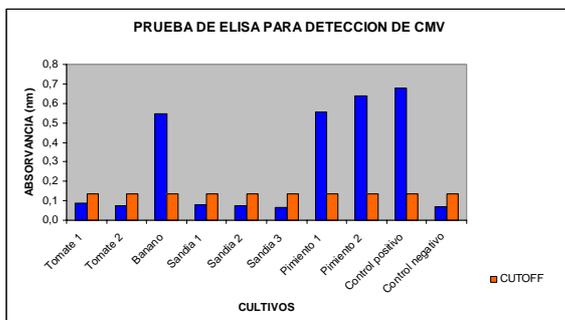


**Figura 4.** Estructuras microscópicas y colonias de hongos patógenos: A. *Alternaria alternata*, B. *Fusarium oxysporum* C. *Botrytis* sp. D. *Mycosphaerella fijiensis*.

Los microorganismos aislados e identificados fueron codificados, etiquetados y conservados a -80°C en el área de conservación de microorganismos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE), donde se mantendrán para estudios posteriores [10].

Todos los protocolos obtenidos de los trabajos realizados también serán de gran apoyo para los investigadores que deseen realizar aislamientos de agentes de importancia y colaboren con el enriquecimiento del banco de cepas que se está formando.

En los análisis realizados mediante ELISA-TAS, no se detectó la presencia de CMV en muestras de tomate y sandía, aunque sí en la muestra de banano que presentó un mosaico leve.



**Figura 5.** Lectura de longitud de onda (403nm) de muestras analizadas por medio de ELISA para

detectar la presencia de CMV (*Cucumber mosaic virus*)

En la Figura 5, se presentan los resultados de la medición de absorbancia para el análisis de CMV; el cut-off para estas muestras fue de 0.1666 (2 veces la media de las lecturas de los controles negativos), lo que significa que los valores por debajo de esta medida fueron considerados negativos. El hecho de no haberse detectado la presencia de CMV en las muestras de tomate y sandía, pero si en las de banano y pimiento demuestra la necesidad de profundizar en el estudio y diagnóstico de las entidades virales en el país, teniendo en cuenta que la expresión de síntomas, aunque es un elemento importante en el diagnóstico, puede variar en dependencia de la variedad, las condiciones ambientales y las especies virales que se encuentran afectando el cultivo, entre otros factores. No obstante, las observaciones de campo realizadas sugieren la posible presencia de potyvirus, tospovirus y comovirus en las áreas inspecciones, los cuales deberían ser investigados en trabajos posteriores.

#### 4. Discusión

Investigaciones anteriores realizadas por el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) determinó la presencia de enfermedades fungosas como *Oidium*, *Alternaria*, *Cercospora* y *Botryploidia* en cultivos de tomate [11].

En sandía, sin embargo, no se ha emitido ningún informe acerca de las enfermedades fungosas que se encuentran causando daños a este cultivo, limitándose la información existente a la presencia de nematodos [12]. En este trabajo, se identificó la presencia de *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*, asociados a síntomas foliares y de síntomas virales que sugieren estar relacionados con virus de los géneros Potyvirus, Comovirus, Tospovirus y Geminivirus [7].

Asimismo, no se cuenta con información referente a la existencia de algún banco de microorganismos que sirva como fuente de material biológico para investigaciones y estudios de laboratorio, de ahí la importancia de realizar trabajos como el presente que, aunque pudiera parecer muy basal, constituye el punto de partida para ir nutriendo el banco de cepas que se desea establecer en el CIBE.

Tal y como países desarrollados han volcado sus esfuerzos en asegurar la conservación de las especies microbianas patógenas y epífitas, también es importante resaltar la urgencia de iniciar investigaciones en el área de virología, ya que en la mayoría de los cultivos de ciclo

corto visitados se ha observado la presencia síntomas compatibles con enfermedades virales y los resultados existentes en el Ecuador no son suficientes para poder ejecutar diagnósticos confiables ni establecer medidas de control adecuadas para estos patógenos.

## 5. Conclusiones y recomendaciones

En este artículo, se muestran los primeros resultados obtenidos en las investigaciones dirigidas a la identificación y conservación de especies epífitas y patógenas de algunos cultivos de la costa. Una vez determinadas las metodologías y establecidos los protocolos se espera a corto plazo continuar enriqueciendo el banco de cepas del CIBE, para luego poder desarrollar investigaciones en las áreas de genética y controles biológicos. Por otra parte, las inspecciones de campo realizadas han puesto de manifiesto que en las plantaciones de tomate y sandía de la Península de Santa Elena y Taura, se mantiene la presencia de enfermedades fungosas, evidenciándose un incremento de síntomas compatibles con enfermedades virales, las cuales deben ser estudiadas de manera urgente, dada su importancia a nivel mundial, estableciendo las especies y los vectores de cada una, con el fin de poder ofrecer mecanismos de control a este problema cada vez más grave.

Se identificó la presencia de *Fusarium oxysporum*, *Botrytis sp.*, *Alternaria alternata*, *Mycosphaerella fijiensis*, *Mucor sp.*, *Curvularia lunata* y *Penicillium sp.*, además de la presencia de CMV (Cucumber mosaic virus) en una planta de banano y en 2 plantas de pimiento que a pesar de no haber estado incluido en la investigación la sintomatología observada en campo permitió determinar la presencia de este tipo de virus. Los cultivos y muestras se conservan en el banco de microorganismos del Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) bajo congelación y liofilizados, en un esfuerzo por iniciar la conformación de un banco de cepas de fitopatógenos que garantice la posibilidad de conocer las poblaciones circulantes en la región y garantizar investigaciones futuras. Este trabajo además deja la puerta abierta al desarrollo de otra línea de investigación muy importante y poco desarrollada en el país como es la Virología, por lo cual a corto o mediano plazo se espera poder desarrollar un proyecto de investigación en esta área.

## 6. Bibliografía

- [1] Mitchell, D. Benny, G. 2001. Clasificación of plant pathogenic fungi. Manual for students. University of Florida. 186p.

- [2] Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), 1998. Identificación de los problemas fitosanitarios en cultivos no tradicionales de la cuenca baja del río Guayas. Available in: [http://mail.iniap-ecuador.gov.ec/isis/view\\_detail.php?mfn=4326&qtype=query&dbinfo=PADIPR&words=sandia](http://mail.iniap-ecuador.gov.ec/isis/view_detail.php?mfn=4326&qtype=query&dbinfo=PADIPR&words=sandia).
- [3] Peralta, E. L. (2008). Enfermedades emergentes de interés agrícola. Causas y perspectivas. Conferencia presentada en el XIX Congreso Latinoamericano de Microbiología y VI Congreso Nacional de Microbiología. Resumen de conferencias, Libro Programa, pág 37.
- [4] Servicio de Información y Censo Agropecuario, SICA, 2002. Estudio potencial agroindustrial y exportador de la península de Santa Elena y de los recursos necesarios para su implantación. Available in: <http://www.sica.gov.ec/agronegocios/index.html>.
- [5] Staley, J. 2007. The value of in-situ microbial diversity. USA. WFCC (World federation for culture collections workshop).
- [6] Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), 1996. Identificación y determinación de los principales agentes causales de enfermedades en cultivos del área de influencia a la Estación Experimental Boliche. Available in: [http://mail.iniap-ecuador.gov.ec/isis/view\\_detail.php?mfn=3460&qtype=query&dbinfo=PADIPR&words=TOMATE](http://mail.iniap-ecuador.gov.ec/isis/view_detail.php?mfn=3460&qtype=query&dbinfo=PADIPR&words=TOMATE).
- [7] El Diario, 2007. Plantaciones de Tomate afectadas por virus. Publicado el: 1ro de Julio del 2007. Disponible en: <http://www.eldiario.com.ec/noticias-manabi-ecuador/38617-las-plantaciones-de-tomate-tambien-son-afectadas-por-el-virus/>
- [8] Llop, Alina; Fernández, C.; Moliner, L.; Otero, A.; Alfonso, Marta; Iglesias, E.; Menéndez, J.C. 1998 (jul). Colecciones de organismos biológicos típicos y biomoléculas relacionadas. Informe presentado al Frente Biológico. Cuba.
- [9] Jimenez, M.; Bermeo, J.; Jama, M.; Perez, L.; Guzman, M.; Maribona, R. 2004. Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* populations from Ecuador to propiconazole and azoxistrobin fungicides. CIBE.
- [10] Matthews, 2004. Plant virology. Fourth edition, 1001 págs. London.
- [11] Garcia, M. Uruburu, F. 2000. La conservación de cepas microbianas. Act SEM. 30:12-6.
- [12] Agrios, G.; 2005. *Plant Pathology* fifth edition, Academic Press. New York.