

INFLUENCIA DEL PH Y DE LOS MEDIOS DE CULTIVO EN LA EXPRESIÓN DE LOS CARACTERES DE VALOR DIAGNÓSTICO DE LAS ESPECIES DEL GÉNERO FUSARIUM EN CUBA

Danay López y María O. López

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

RESUMEN

El género *Fusarium* se caracteriza por una gran variabilidad morfológica bajo diferentes condiciones de cultivo y tiende a degenerar rápidamente. En Cuba, aun cuando se ha incrementado el conocimiento sobre este importante género de hongos, no se han determinado las mejores condiciones para su cultivo debido a la escasa información que existe acerca del género y lo poco asequibles y costosas que resultan las técnicas más modernas. Para contribuir a la solución de este problema se procedió a estudiar la influencia del pH y los medios de cultivo en la expresión de los caracteres de valor taxonómico de las especies de *Fusarium* más frecuentes en Cuba. Se utilizaron con este fin ocho cepas frescas de la colección de hongos fitopatógenos del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Se determinó la influencia del pH en la producción de biomasa de las especies del género estudiadas y el mejor medio de cultivo, donde se expresaron adecuadamente todos los caracteres útiles para el diagnóstico de las especies del género *Fusarium*. Con el estudio del pH se comprobó que los valores óptimos de crecimiento se encontraron entre los valores 5,5-6,5. Por primera vez en el país se demuestra que la mejor expresión de caracteres morfológicos útiles para el diagnóstico de las especies de *Fusarium* estudiadas se logró en el medio de cultivo hojas de clavel-agar, seguido de agar de nutrientes especiales y finalmente agar papa con papel de filtro; los medios agar de papa-dextrosa y de papa-sacarosa resultaron adecuados para el estudio de los caracteres culturales.

Palabras clave: *Fusarium*, medios de cultivo, taxonomía, caracteres

ABSTRACT

The genus *Fusarium* is characterized by a great morphological variability under different culture conditions and the isolates degenerate quickly. The best conditions for the culture have not been determined in Cuba, even when the knowledge of this important genus has been increased, due to the scarce information about the genus and the costs of most modern techniques. To contribute to the solution of this problem, the influence of pH and culture media on the expression of character of taxonomic value of the more frequent Cuban *Fusarium* species was studied. With this purpose, eight fresh strains from Plant Health Research Institute Culture Collection were used. The influence of the pH on biomass production of the studied species was determined and the best culture medium to the expression of all the useful characters. With the study of the pH it was proven that the good values of growth were among 5.5 - 6.5. It was demonstrated that the best expression of useful morphological characters for the diagnosis of the studied *Fusarium* species was achieved with Carnation leaf-Agar, followed by SNA and finally Potato Agar with filter paper; the media Potato-Dextrose Agar and Potato-sucrose agar were appropriate for the study of the cultural characters.

Key words: *Fusarium*, culture media, characters, taxonomy

INTRODUCCIÓN

Fusarium Link es un género de Hyphomycetes clasificado en los hongos mitospóricos y generalmente considerado como un anamórfico de algunos Hypocreales (Ascomycetes) [Nelson *et al.*, 1983].

La correcta identificación de las especies de *Fusarium* requiere de una observación detallada del cultivo, ya que el género se caracteriza por una gran variabilidad morfológica bajo diferentes condiciones de cultivo y tiende a degenerar rápidamente [Seifrt *et al.*, 2000].

En Cuba, el género *Fusarium* es uno de los que mayores dificultades presenta para las determinaciones específicas, debido a la escasa información que de él existe y lo poco asequibles y costosas que resultan las técnicas más modernas, y aun cuando se han realizando esfuerzos para incrementar el conocimiento sobre este género de hongos, no se han determinado las mejores condiciones para su cultivo.

El presente trabajo tiene como objetivos estudiar la influencia del pH y de los medios de cultivo en la expresión

sión de los caracteres de valor taxonómico de las especies de *Fusarium* más frecuentes en Cuba.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fueron utilizadas ocho cepas frescas de la colección de hongos fitopatógenos del INISAV, las cuales se muestran en la *Tabla 1*.

Influencia del pH sobre la producción de biomasa

La influencia del pH en la producción de biomasa se determinó con las especies fitopatógenas *F. solani*, *F. moniliforme* y *F. oxysporum*. Se trabajó *F. solani*, *F. moniliforme* y *F. oxysporum*. Se trabajó con dos aislamientos para cada especie en erlenmeyers de 250 mL con 100 mL de caldo de papa sacarosa ajustados los pH a 3, 5, 6, 7 y 9. El pH se ajustó

con soluciones de hidróxido de sodio (NaOH) 1N y de ácido clorhídrico (HCl) 1N. Se utilizaron cuatro réplicas por variante. A partir de una placa madre se transfirieron asépticamente tres discos de 7 mm de diámetro a cada uno de los erlenmeyers y además se adicionaron 100 mg/L de sulfato de estreptomina para evitar la contaminación bacteriana. Los erlenmeyers fueron incubados a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ en condiciones de oscuridad para favorecer el crecimiento micelial. El tiempo de incubación estuvo entre 7-17 días en dependencia de la velocidad de crecimiento de las especies. Cada una de las variantes se filtró en papel de filtro, los cuales fueron colocados en una estufa a 45°C y pesados hasta obtener un peso constante. Se pesó cada réplica y se midió el pH final del caldo donde se desarrollaron. Los resultados fueron comparados por análisis de varianza simple y se aplicó el test de rangos múltiples de Duncan para un 5% de probabilidad de error.

Tabla.1. Aislamientos trabajados. Sección, sustrato y localidad a que pertenecen

Especie	Sección	Procedencia	Sustrato	Localidad
<i>F. moniliforme</i>	Liseola	Cepario	<i>Oryza sativa</i>	IIA (Ciudad de La Habana)
<i>F. moniliforme</i>	Liseola	Sustratos analizados	Agua de pozo	Artemisa (La Habana)
<i>F. oxysporum</i>	Elegans	Cepario	<i>Musa</i>	La Esmeralda (Camagüey)
<i>F. oxysporum</i>	Elegans	Cepario	<i>Musa</i>	Palma Soriano (Santiago de Cuba)
<i>F. proliferatum</i>	Liseola	Cepario	<i>Sorghum halepense</i>	Artemisa (La Habana)
<i>F. proliferatum</i>	Liseola	Cepario	<i>Sorghum halepense</i>	Ciudad de La Habana
<i>F. solani</i>	Martiella	Cepario	Suelo	UBPC Simón Bolívar (San Antonio de los Baños, La Habana)
<i>F. solani</i>	Martiella	Cepario	Suelo	UBPC Rolando Pérez Quintosa (San Antonio de los Baños, La Habana)

IIA: Instituto de Investigaciones del Arroz

UBPC: Unidad Básica de Producción Cooperativa

Selección del mejor medio de cultivo para el diagnóstico de las especies de *Fusarium*

Para la selección del mejor medio de cultivo se trabajó con los aislamientos de las especies fitopatógenas *F. moniliforme*, *F. oxysporum* y *F. solani*; además se incluyó a *F. proliferatum* por su dificultad para formar macroconidios sin la presencia de luz cercana a la ultravioleta (NUV), según Gerlach y Nirenberg (1982), Nelson *et al.* (1983) y Nirenberg (1990).

Se realizó un estudio de los caracteres útiles para el diagnóstico de cada una de las especies en los medios de cultivo PDA (agar-papa-dextrosa), recomendado por Nelson *et al.* (1983); PSA (agar-papa-sacarosa), recomendado por Booth (1977); Cz (agar czapek dox modificado), propuesto por Booth (1981); SNA (special nutrient agar), recomendado por Nirenberg (1976); CLA (carnation leaf agar), propuesto por Fisher *et al.* (1982); BLA (banana leaf agar), según Seifert *et al.* (2000) y agar papa con papel de filtro recomendado por López (1999). Se probó además agar-agua con hojas de banano.

La siembra en estos medios se realizó a partir de una placa madre, de donde fueron tomados discos de 7 mm de diámetro que se transfirieron al centro de las placas que contenían los diferentes medios. Se montaron cinco réplicas por medio de cultivo para cada aislamiento, las cuales se incubaron a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ en condiciones de alternancia de 8 horas luz por 16 de oscuridad, de 7-10 días, recomendado para un desarrollo óptimo de la morfología de los conidios por Nirenberg (1990) y Seifert *et al.* (2000). Se comparó la formación de esporodoquios, clamidosporas, pigmentación, forma y tamaño de conidios para la selección de los medios de cultivo en los cuales se desarrolla la morfología más típica de las especies de *Fusarium*.

Para la determinación de la cantidad de esporodoquios desarrollados se colocó un acetato cuadrículado (cada cuadrícula = 1 cm^2) sobre la placa de cultivo, y se contó la cantidad de esporodoquios observados en cinco cuadrículas a los 14 días de incubación. Se calculó la media por centímetro cuadrado del sustrato y se reali-

zó una escala valorativa que reflejara la cantidad de esporodoquios producidos en cada uno de las especies evaluadas en los diferentes medios.

Número de esporodoquios	Escala
0	-
1-3	+
4-10	++
>10	+++

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Influencia del pH sobre la producción de biomasa

Los valores óptimos de crecimiento micelial de las especies *F. solani*, *F. moniliforme* y *F. oxysporum* a determinados pH se muestran en la Fig. 1.

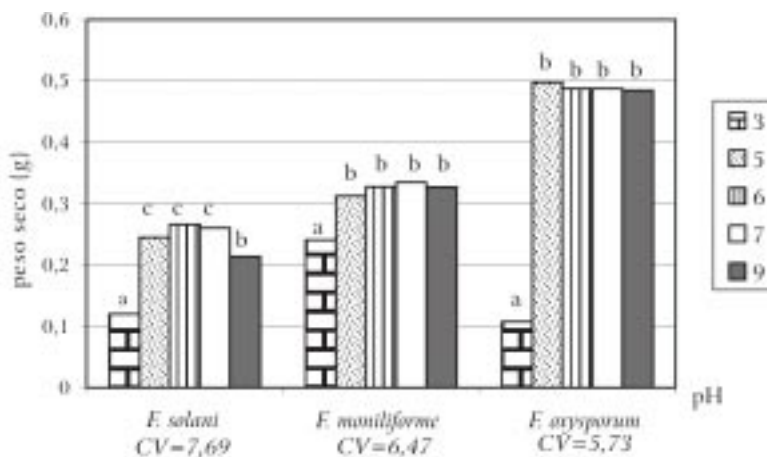


Figura 1. Influencia del pH en el crecimiento micelial de varias especies de *Fusarium*.

Para las tres especies probadas a pH 3 se obtuvo un crecimiento micelial significativamente menor. Los valores óptimos de crecimiento oscilaron en un amplio rango de pH desde 5 hasta 9 para la mayoría de las especies. *F. solani*, sin embargo, mostró un crecimiento óptimo solamente en el rango de pH de 5 a 7, con valores de crecimiento micelial algo mayores en el rango de pH de 6 a 7, tal y como se recomienda para la mayoría de los hongos [Johnston & Booth, 1983]. A pH ácidos o muy básicos, el crecimiento de esta especie fue significativamente menor. *F. moniliforme* mantuvo un crecimiento micelial óptimo entre 5-9 sin diferencias significativas a los 11 días de incubación, aun cuando entre los valores de pH 6 y 7 fue ligeramente mayor el crecimiento. *F. oxysporum*, a diferencia del resto de las especies probadas, mostró valores de crecimiento mayores a un pH más ácido, en este caso a pH = 5, aunque no significativamente mayor en comparación con el crecimiento obtenido en el rango de 6 a 9. Al evaluar el caldo resultante de las tres especies probadas se pudieron apreciar variaciones entre 5-6 en el pH final. Estos resultados, aunque variables, coinciden con lo planteado por Bilai (1955) con respecto a los parámetros óptimos de cultivo para las especies del género. Según esta autora, la mayoría de las especies de *Fusarium* están capacitadas para crecer en un amplio rango de pH que va de 2,0 a 9,0 y a veces superior, y en el proceso de crecimiento muchas especies cam-

bian el pH del medio, lo cual dependerá de la composición del medio y de otras condiciones de cultivo.

Selección del mejor medio de cultivo para el diagnóstico de las especies de *Fusarium*

En los medios de cultivo PDA, PSA y Cz las características desarrolladas por las especies probadas se diferenciaron notablemente de las desarrolladas en el resto de los medios menos ricos en nutrientes. Dentro de este último grupo las diferencias morfológicas fueron menos notables, pero los resultados en ellos son inferiores a los obtenidos en el medio CLA, donde se observó en todas las especies analizadas la óptima expresión del total de los caracteres útiles para la identificación.

En la especie *F. solani* los medios PDA, PSA y Cz resultaron idóneos para observar las características culturales. Lo observado coincide con lo descrito por Gerlach y Nirenberg (1982) y Nelson *et al.* (1983). Esta especie mostró en todos los medios de cultivo una rápida velocidad de crecimiento micelial lineal en el rango de 6,5-7,6 cm a los seis días a $27 \pm 2^\circ\text{C}$; sin embargo, la difusión de pigmento al medio, útil para el diagnóstico de la especie, solo se observó sobre los medios PDA, PSA y Cz. La producción de esporodoquios/cm² varió según el medio (Tabla 2). En PDA, PSA y Cz solamente se formaron los esporodoquios después de pasados 14 días de incubación. En el resto de los medios el número de esporodoquios formados fue desde muy escaso, como los obtenidos en agar agua

con hojas de banano y BLA, hasta muy abundantes, como aquellos formados sobre el papel de filtro en SNA. Estas masas conidiales permiten una determinación muy

precisa de la especie, ya que los macroconidios formados en los esporodoquios muestran un alto grado de uniformidad y exhiben todas las características típicas.

Tabla 2. Evaluación del número de esporodoquios/cm² de *F. solani* en los diferentes medios de cultivo, según la escala

Medios	Evaluación	Medios	Evaluación
Cz	–	BLA	+
PDA	–	CLA	++
PSA	–	Agar papa con papel de filtro	++
Agar agua con hojas de banano	+	SNA	+++

Para la evaluación de la morfología los medios PDA, Cz y PSA no resultaron adecuados, fueron escasos los macroconidios formados en el micelio aéreo, cortos al compararlos con aquellos formados en el resto de los medios con predominio de 1 a 3 septos, y célula basal en forma de pie poco pronunciada en gran número de ellos. Por otra parte, no se formaron clamidosporas en estos medios a los 11 días de realizarse la observación, lo cual es muy inconveniente, ya que estas estructuras constituyen un elemento crítico importante para identificar la especie.

Sobre el medio CLA, aun cuando las características culturales observadas no fueron tan definidas, todos los caracteres morfológicos vistos resultaron superiores a lo observado en el resto de los medios. En él se observó abundancia de esporodoquios sobre las hojas de clavel, de coloración castaño claro en ambos aislamientos; una mayor producción de clamidosporas y los macroconidios, tanto del micelio aéreo como lo de los esporodoquios, mostraban una célula basal y apical bien diferenciada. En los medios SNA, BLA y agar papa con papel de filtro, aun cuando las características morfológicas concuerdan con lo descrito por Gerlach y Nirenberg (1982); Nelson *et al.* (1983) y Singh *et al.* (1991), los macroconidios del micelio aéreo eran mucho más cortos, variables en longitud y con poca diferenciación en la célula basal y apical en comparación con los observados en medio CLA.

El comportamiento de las especies estudiadas de la sección *Liseola* (*F. moniliforme* y *F. proliferatum*) en los diferentes medios de cultivo fue similar al de la especie *F. solani*. Ambas mostraron una rápida velocidad de crecimiento en todos los medios, con un crecimiento micelial lineal en el rango de 6,8-7,4 cm a los seis días a $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Los medios PDA y PSA resultaron adecuados para evaluar culturalmente las dos especies, ya que lo observado en ambas variantes de cultivo coincide con lo descrito por Gerlach y Nirenberg (1982) y Nelson *et al.* (1983). En Cz la pigmentación púrpura que caracteri-

za a esta sección no se produjo. Las características morfológicas observadas en estos tres medios de cultivo no facilitan la determinación de ninguna de estas especies. Los microconidios formados en estos medios fueron muy variables en cuanto a forma, se presentaron gutulados y de menor tamaño en comparación a los observados en el resto de los medios para ambas especies; por otra parte, no se formaron macroconidios en ninguna de estas variantes de medio de cultivo.

Los resultados en medio CLA fueron sorprendentes. Según Gerlach y Nirenberg (1982) y Seifert *et al.* (2000), las especies de la sección *Liseola* requieren de luz cercana a la ultravioleta (NUV) para la formación de macroconidios en cualquier medio de cultivo. Algunas especies, como *F. moniliforme* y *F. subglutinans*, son capaces de formar macroconidios incluso en PDA y PSA; pero estos son escasos y no exhiben todas las características que permitan hacer una determinación precisa. *F. proliferatum*, según los referidos autores, solo forma macroconidios bajo luz NUV. En este trabajo en medio CLA en ambas especies se observó la presencia de macroconidios típicos de las especies de esta sección. La producción de estos fue más abundante en *F. moniliforme*.

En los medios SNA, BLA, agar papa con papel de filtro y agar agua con hojas de banano, se observó uniformidad en los microconidios para ambas especies; sin embargo, *F. proliferatum* no formó macroconidios en estos medios, mientras que en *F. moniliforme* la formación de macroconidios fue muy escasa, y solo en el medio agar agua con hojas de banano eran característicos de la especie.

En la especie *F. oxysporum* también se observó una rápida velocidad de crecimiento en todos los medios de cultivo, con un crecimiento micelial lineal en el rango de 6,5-8,0 cm a los seis días a $27 \pm 2^\circ\text{C}$. La difusión de pigmento al medio solo se observó sobre los medios de cultivo: PDA, PSA y Cz, y predominaron generalmente los tonos vináceos, aunque en Cz se apreciaron tonos salmón con zonas de coloración azul fuerte, lo que coincide con lo descrito por

Gerlach y Nirenberg (1982). La producción de esporodoquios/cm² varió según el medio de cultivo (Tabla 3). En los medios CLA, SNA y agar papa con papel de filtro, los esporodoquios fueron observados a los pocos días (6-8 días) con variaciones en número desde

muy escasos, como los obtenidos en el medio agar papa con papel de filtro, hasta muy abundantes, como aquellos formados sobre el papel de filtro en SNA y sobre hojas de clavel en CLA. En el resto de los medios no se formaron.

Tabla 3. Evaluación del número de esporodoquios/cm² de *F. oxysporum* en los diferentes medios de cultivo, según la escala

Medios	Evaluación	Medios	Evaluación
Cz	–	BLA	–
PDA	–	CLA	+++
PSA	–	Agar papa con papel de filtro	+
Agar agua con hojas de banano	–	SNA	+++

Para la evaluación de la morfología, los medios PDA, Cz y PSA no resultaron adecuados, ya que no se formaron macroconidios. En agar agua con hojas de plátano, agar papa con papel de filtro y BLA, los macroconidios formados en el micelio aéreo fueron escasos y con la célula basal pedicelada poco pronunciada en gran número de ellos. En el medio SNA los macroconidios formados en el micelio aéreo y en los esporodoquios fueron cortos en comparación con aquellos observados en los anteriores medios; sin embargo, en ellos, se observó una célula basal y apical bien diferenciada, fueron abundantes en el micelio aéreo y se apreció la formación de clamidosporas en ellos, estructuras que constituyen un elemento de gran valor para identificar la especie. En el resto de los medios las clamidosporas solo fueron formadas en el micelio aéreo.

En CLA los resultados para esta especie coinciden con lo obtenido en *F. solani* y las especies de la sección Liseola estudiadas. En este medio se observó abundancia de esporodoquios de coloración naranja sobre las hojas de clavel, los macroconidios mostraban una célula basal y apical bien diferenciada y se observó la formación de clamidosporas en el micelio aéreo. Aun cuando este medio resultó superior, en SNA las características morfológicas exhibidas por *F. oxysporum* concuerdan con lo descrito por Gerlach y Nirenberg (1982), Nelson *et al.* (1983) y Singh *et al.* (1991).

CONCLUSIONES

- Los valores óptimos de pH para el crecimiento de las especies de *Fusarium* se encontraron entre 5,5-6,5. En el proceso de crecimiento las especies estudiadas acidificaron el pH del medio.
- Por primera vez en el país se demuestra que la mejor expresión de caracteres morfológicos útiles para el diagnóstico de las especies de *Fusarium* estudiadas se logró

en el medio CLA, seguido de SNA y finalmente agar papa con papel de filtro, mientras que los medios PDA y PSA resultaron adecuados para el estudio de los caracteres culturales.

REFERENCIAS

- Bilal, V. I.: *The Fusaria (Biology and Systematics)*, Kiev: Akad. Nauk.Urk. Ssr., 1955.
- Booth, C.: *The genus Fusarium*, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, 1977.
- : «Perfect States (Teleomorphs) of *Fusarium* species», *Fusarium: Diseases, Biology and Taxonomy*, University Park, Pennsylvania State, Univ. Press, 1981, pp. 446-452.
- Fisher, N.; Burgess, L.; Toussoun, T. & Nelson, P. Carnation leaves as a substrate and for preserving cultures of *Fusarium* species. *Phytopathology* 72: 151-153. 1982.
- Gerlach, W.; Helgard Nirenberg: «The genus *Fusarium*-a Pictorial Atlas», *Mitt. Biol. Bundesanst. Ld-u. Forstw*, Berlin-Dahlem 209:1-406, 1982.
- Johnston, A.; C. Booth: *Plant Pathologist's Pocket Book*, 2nd Edition, Commonwealth Mycological Institute, Kew, Surrey, 1983.
- López, María Ofelia: «Contribución al diagnóstico de la micobiota de la caña de azúcar». Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas, Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, La Habana, 1999.
- Nelson, P.; T. Toussoun; W. Marassas: *Fusarium Species. An Illustrated Manual for Identification*, The Pennsylvania State University Park, University Park and London, 1983.
- Nirenberg, Helgard. Untersuchungen über die morphologische differenzierung in der *Fusarium*-sektion-Liseola. *Mitt. Biol. Bundesanst. Ld-u. Forstw. Berlin-Dahlem* 169: 1-117. 1976.
- Nirenberg, Helgard. Recent advances in the taxonomy of *Fusarium*. *Stud. Mycol.* 32: 91-101. 1990.
- Seifert, K.; Summerell, B.; Cooke, M.; Lightfoot, D. & Sundheim, L. Fuskey-Growing *Fusarium*. <http://res.agr.ca/brd/fusarium/growth.html>. 2000.
- Singh, K.; Frisvad, J.; Thrane, U. & Mathur, S. An Illustrated Manual on Identification of some Seed-borne *Aspergilli*, *Fusaria*, *Penicillia* and their Mycotoxins. Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. Demark. 133pp. 1991.