

INFLUENCIA DE DIFERENTES TIPOS DE AGAR Y DEL SELLADO DE LAS PLACAS SOBRE LA PIGMENTACIÓN Y EL CRECIMIENTO MICELIAL DE LAS ESPECIES DE FUSARIUM

Danay López y María Ofelia 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

Se ha comprobado que el empleo de medios ricos en carbohidratos, las variaciones en los nutrientes, el uso de antibióticos en los medios de cultivo, la presencia de contaminaciones bacterianas y los cambios genéticos introducidos durante la preservación de la cepa, entre otros, afectan la expresión de caracteres importantes para el diagnóstico de las especies de *Fusarium*. El tipo de agar empleado y el sellado de las placas son factores poco estudiados. Con el objetivo de determinar la influencia del tipo de agar y del sellado de las placas en la expresión de algunos caracteres culturales importantes para el diagnóstico de las especies de *Fusarium*, se evaluó la influencia de estos caracteres en la pigmentación y el crecimiento micelial de las especies del género. La influencia del tipo de agar se determinó con las especies *F. chlamydosporum*, *F. incarnatum*, *F. subglutinans* y *F. ventricosum* en papa sacarosa agar (PSA) con agar no. 1, con agar no. 3 y con agar industrial. La influencia del sellado de las placas se determinó con las especies fitopatógenas más importantes como son *F. moniliforme*, *F. oxysporum* y *F. solani*. Fueron incluidas *F. incarnatum* y *F. chlamydosporum* por ser buenas productoras de pigmento. Se probaron dos variantes en PSA, una de placas selladas con parafilm y otra de placas sin sellar. Para las especies estudiadas se obtuvo una adecuada pigmentación y óptimo crecimiento micelial en las variantes con agar no. 1 y no. 3. El medio PSA con agar industrial no resultó adecuado para el desarrollo uniforme de los caracteres culturales con fines diagnósticos. El sellado de las placas causó una disminución considerable en el grado de pigmentación y el crecimiento micelial en medio PSA de las especies estudiadas.

Palabras clave: *Fusarium*, morfología, crecimiento micelial

ABSTRACT

It has been proven that the employment of carbohydrates rich media, nutrients variations, antibiotics use in culture media, bacterial contaminations presence and genetic changes introduced during the preservation of the strains, among others, affect the expression of important characters for the diagnosis of *Fusarium* species. Agar type used and Petri dishes sealing are elements shortly studied in this sense. With the aim of determining the influence of both the agar type and the sealing of Petri dishes on the expression of some important cultural characters for the diagnosis of *Fusarium* species, the influence of these characters in the pigmentation and the mycelial growth of the species of the genus were evaluated. The influence of agar type was determined with species *F. chlamydosporum*, *F. incarnatum*, *F. subglutinans* and *F. ventricosum* in potato sucrose agar No. 1, potato sucrose agar No. 3 and potato sucrose with industrial agar. The influence of the sealing of Petri dishes was determined with the most important phytopathogenic species *F. moniliforme*, *F. oxysporum* and *F. solani*. Since they are good producers of such a pigment *F. incarnatum* and *F. chlamydosporum* were included. Two variants were proven in PSA, one with parafilm to seal Petri dishes and the other without sealing. An appropriate pigmentation and good mycelial growth in the variants with agar No. 1 and agar No. 3 was obtained for the studied species. PSA with industrial agar medium was not appropriate for the uniform development of the cultural characters with diagnostic purposes. The sealing of Petri dishes caused a considerable decrease in the grade of pigmentation and the mycelial growth on PSA medium for the studied species.

Key words: *Fusarium*, morphology, micelial growth

INTRODUCCIÓN

La influencia de las condiciones de cultivo en la morfología del género *Fusarium* es de vital importancia al determinar las especies que a él pertenecen, y ha sido estudiada por autores como Fisher *et al.* (1982), Nelson *et al.* (1983), Nirenberg (1990), Pascoe (1990), López (1999), Castañeda (2000) y Seifert *et al.* (2000), entre otros.

Se ha comprobado que el empleo de medios ricos en carbohidratos, variaciones en los nutrientes, el uso de antibióticos en los medios de cultivo, la presencia de contaminaciones bacterianas y los cambios genéticos introducidos durante la preservación de las cepas, entre otros,

afectan la expresión de caracteres importantes para el diagnóstico de especies de este género y ocasionan la degeneración de la cepa; como consecuencia, el cultivo puede manifestar una lenta velocidad de crecimiento, abundante micelio aéreo, escasez de macroconidios y reducción de la producción de pigmento, entre otras variaciones [Seifert *et al.*, 2000].

El tipo de agar empleado y el sellado de las placas son elementos poco estudiados en este sentido. El agar, polímero de largas cadenas formado por ciertas algas marinas, es uno de los compuestos presente general-

mente en los medios de cultivo. Existen varias clases. De hecho, el agar de diferentes algas tiene distintas estructuras químicas y por tanto diferentes propiedades, y puede ser capaz de influir en las características culturales de ciertos microorganismos [Eddleman, 1999]. Seifert (2000) plantea la influencia negativa del sellado de las placas en algunos caracteres culturales de las especies del género *Fusarium*.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la influencia del tipo de agar y del sellado de las placas en la pigmentación y el crecimiento micelial de las especies del género *Fusarium*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Influencia del tipo de agar sobre la pigmentación y el crecimiento micelial lineal

La influencia del tipo de agar se determinó con las especies *F. chlamydosporum*, *F. incarnatum*, *F. subglutinans* y *F. ventricosum*, seleccionadas sobre la base de su capacidad de producir pigmento y la velocidad de crecimiento. Las especies *F. chlamydosporum* y *F. incarnatum* representan a aquellas del género de rápida velocidad de crecimiento, *F. subglutinans* a las de crecimiento intermedio y *F. ventricosum* a las especies de crecimiento lento. La producción de pigmento solamente se evaluó sobre *F. chlamydosporum*, *F. incarnatum* y *F. subglutinans* por sus capacidades de producirlo.

Para cada uno de los aislamientos se utilizó una placa madre que contenía agar agua, la que fue incubada por 24 h. La placa fue preparada esparciendo asépticamente 2 mL de suspensión conidial en el medio de cultivo con una espátula de Drigalski. A partir de la placa madre se tomaron discos de 5 mm de diámetro, los cuales fueron sembrados en tres variantes de placas que contenían papa sacarosa agar no. 1, papa sacarosa agar no. 3 y papa sacarosa con agar industrial. Con todas estas variantes se realizaron cinco réplicas y se incubaron selladas con parafilm, bajo un régimen de alternancia de 8 horas luz por 16 de oscuridad a $27 \pm 2^\circ\text{C}$ durante siete días. Al cabo de este tiempo se midió el diámetro de las colonias y se evaluó cualitativamente el tipo de pigmento producido, su intensidad y la distancia que difundió en el agar en el total de las especies probadas en los diferentes tipos de agar.

Los valores obtenidos para evaluar el crecimiento micelial lineal se compararon mediante un análisis de varianza simple y se aplicó el test para rangos múltiples de Duncan para un 5% de probabilidad de error.

Influencia del sellado de las placas sobre la pigmentación y el crecimiento micelial lineal

La influencia del sellado de las placas se determinó con las especies fitopatógenas más importantes: *F. moniliforme*, *F. oxysporum* y *F. solani*; se incluyeron *F. incarnatum* y

F. chlamydosporum, ya que mostraron ser buenas productoras de pigmento por observaciones prácticas realizadas en el laboratorio.

Se prepararon placas madre para cada aislamiento, de la misma forma que la descrita anteriormente; a partir de estas se transfirieron asépticamente discos de 5 mm de diámetro a placas que contenían papa sacarosa agar (no. 3). Se probaron dos variantes, una de placas selladas en sus bordes con parafilm y otra de placas sin sellar. Para cada una de las variantes se realizaron cinco réplicas y se incubaron bajo condiciones de alternancia de 8 horas luz/16 de oscuridad a $27 \pm 2^\circ\text{C}$. Las placas se evaluaron a los siete y catorce días de sembradas, se midió el diámetro de las colonias y se observó el grado de pigmentación de cada una de las especies estudiadas.

Los valores obtenidos para evaluar el crecimiento micelial lineal se compararon mediante un análisis de varianza simple y se aplicó el test para rangos múltiples de Duncan para un 5% de probabilidad de error.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Influencia del tipo de agar sobre la pigmentación y el crecimiento micelial lineal

Las especies *F. chlamydosporum*, *F. incarnatum* y *F. subglutinans* mostraron diferencias en cuanto al grado de pigmentación en los diferentes tipos de agar.

Para *F. chlamydosporum*, aunque la intensidad de la pigmentación rojo carmesí que este hongo produce no cambió en las diferentes variantes, la distancia que el pigmento difundió en el medio fue mucho mayor en papa-sacarosa-agar no. 1, seguido de la variante de este medio con agar no. 3. En papa-sacarosa-agar industrial esta distancia fue mucho menor en comparación con el resto (Fig.1). En la especie *F. subglutinans* se observó una pigmentación púrpura en papa-sacarosa-agar no.1 que caracteriza a las especies de la sección *Liseola*, mientras que en este medio con las variantes de agar no. 3 y agar industrial, el hongo no produjo casi pigmento, y solo fue visible por el reverso de la colonia una coloración café muy tenue (Fig. 2). La pigmentación característica de la especie *F. incarnatum* solamente se observó en los medios elaborados con agar no. 1 y no. 3, donde se apreció una coloración naranja salmón cerca del centro de la colonia, seguida de un tono café más intenso en comparación a la pigmentación café desarrollada en la variante de agar no. 4. En esta variante se observó mayor difusión de un pigmento que no es característico de la especie. Las causas de comportamientos tan similares de las especies probadas en los tres tipos de agar no se conoce; pero factores como el tamaño de la partícula de agar y las sustancias que acompañan cada uno de sus distintos tipos pueden ser las razones de tales resultados.

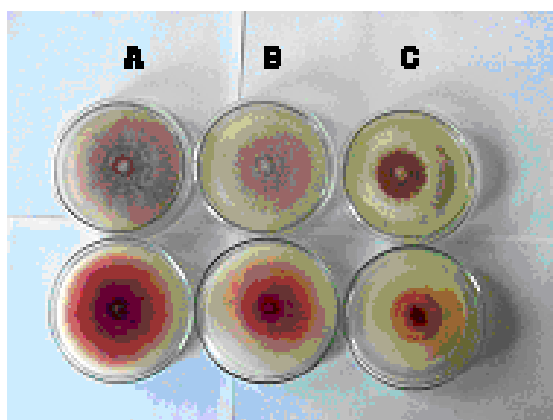


Figura 1. *F. chlamydosporum*. Grado de pigmentación variable en PSA.

A: Agar no. 1, B: Agar no. 3, C: Agar industrial.

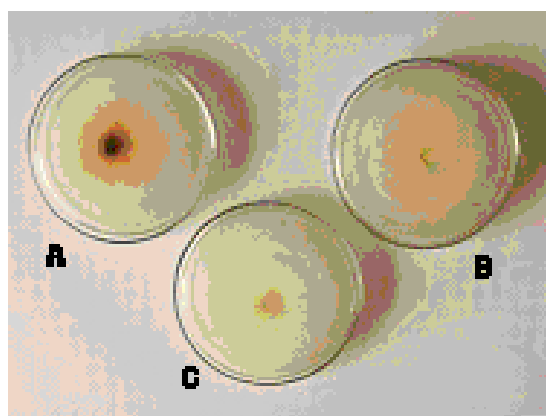


Figura 2. *F. subglutinans*. Grado de pigmentación variable en PSA.

A: Agar no. 1, B: Agar no. 3, C: Agar industrial.

La influencia del tipo de agar sobre el crecimiento micelial de estas especies, incluido *F. ventricosum*, se muestra en la Fig. 3.

Para *F. chlamydosporum* y *F. subglutinans* se obtuvieron resultados similares, al ser el crecimiento micelial significativamente

mayor en papa sacarosa agar no. 1 y papa sacarosa agar no. 3 con respecto a la variante realizada con agar industrial. Para *F. incarnatum* y *F. ventricosum* no se observaron diferencias significativas en el crecimiento micelial en papa-sacarosa con las tres variantes de agar.

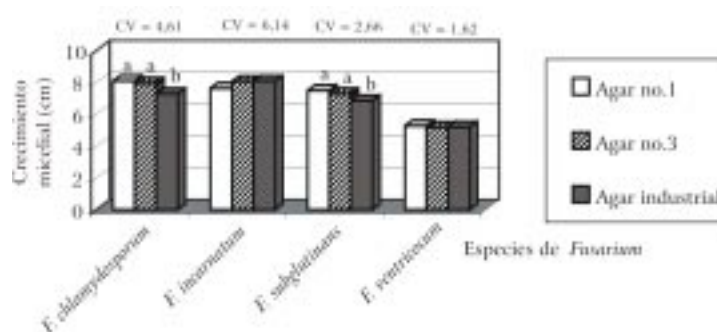


Figura 3. Influencia del tipo de agar en el crecimiento micelial de varias especies de *Fusarium*.

Según Mycosupply (2002) los tipos de algas de donde se extrae el agar industrial y los distintos grados de agar bacteriológico no son los mismos, además de que el primero puede contener residuos de blanqueadores y preservantes que son adecuados para la industria alimenticia, pero no para el adecuado desarrollo de los microorganismos; aunque sí se obtuvo buen crecimiento de las especies estudiadas en este tipo de agar, este no resultó adecuado para el desarrollo uniforme de los caracteres culturales con fines diagnósticos.

Influencia del sellado de las placas sobre la pigmentación y el crecimiento micelial lineal

Los resultados demuestran que el sellado de las placas causa una disminución considerable en el grado de pigmentación en medio PSA de las especies estu-

diadas, en comparación con la variante de placas sin sellar (Figs. 4 y 5).

Para todas las especies probadas se obtuvo un crecimiento micelial significativamente mayor en las placas sin sellar que en las placas selladas a los siete días de incubación; ambas variantes alcanzaron igual crecimiento a los 14 días (Fig. 6). Seifert *et al.* (2000) han obtenido resultados similares para algunas especies de *Fusarium*. Estos autores plantean que este factor puede causar la degeneración de las especies en medio de cultivo debido a la acumulación de dióxido de carbono dentro de las placas. Tal degeneración puede ser determinada precisamente por una velocidad de crecimiento más lenta que la descrita en la literatura para esa especie y por una reducción considerable de la pigmentación en medio de cultivo.

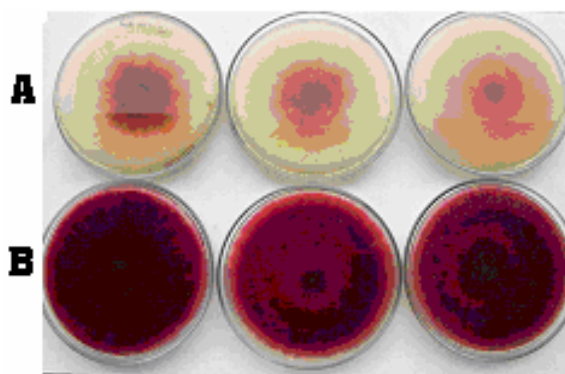


Figura 4. *F. chlamydosporum*.
Grado de pigmentación variable en PSA.
A: Placas selladas por 14 días.
B: Placas sin sellar.

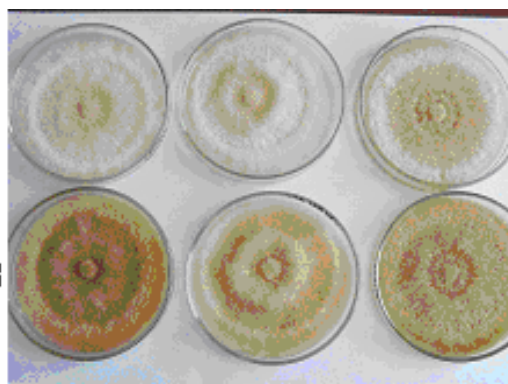


Figura 5. *F. incarnatum*.
Grado de pigmentación variable en PSA.
A: Placas selladas por 14 días.
B: Placas sin sellar.

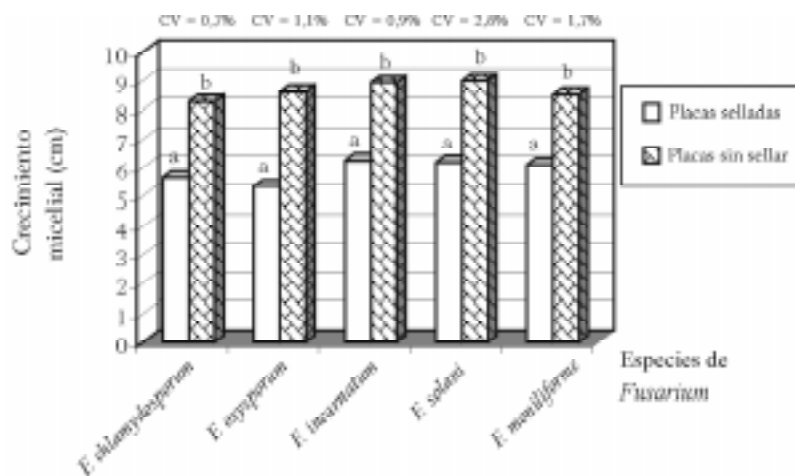


Figura 6. Influencia del sellado de las placas en la velocidad de crecimiento de varias especies de *Fusarium* en placas selladas y sin sellar a los siete días de crecimiento.

CONCLUSIONES

- En los medios de cultivo preparado con agar no. 1 y en agar no. 3, las especies de *Fusarium* estudiadas mostraron mejor pigmentación y óptimo crecimiento micelial. Estos resultados se demuestran por primera vez en este trabajo.
- En todas las especies estudiadas se obtuvo un crecimiento micelial significativamente mayor en las placas sin sellar que en las placas selladas a los siete días de incubación; ambas variantes alcanzaron igual crecimiento micelial a los 14 días. Se pudo apreciar además una disminución considerable de la pigmentación en las placas selladas en comparación con la variante sin sellar para cada una de las especies probadas. Estos resultados también son novedosos.

REFERENCIAS

Castañeda, R.: «Hyphomycetes de hortalizas en Cuba». Tesis presentada en opción al título de Doctor en Ciencias Agrícolas, Instituto de

Investigaciones Fundamentales de la Agricultura Tropical, La Habana, 2000.

Eddleman, H.: «Agars Used in Microbiological Media», <http://www.disknet.com/indiana-biolab/b041.htm>, 1999.

Fisher, N.; L. Burgess; T. Toussoun; P. Nelson: «Carnation Leaves As a Substrate and For Preserving Cultures of *Fusarium* Species», *Phytopathology* 72:151-153, 1982.

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.

Mycosupply. Culture Media-Bacteriological Grade Agar. General Agar Information. <http://www-mycosupply.com/index.htm>, 2002.

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: «Recent Advances in the Taxonomy of *Fusarium*», *Stud. Mycol.* 32:91-101, 1990.

Pascoe, I.: «*Fusarium* Morphology II: Experiments of Growing Conditions and Dispersal of Mesoconidia», *Mycotaxon* 37:161-172, 1990.

Seifert, K.; B. Summerell; M. Cooke; D. Lightfoot; L. Sundheim: «Fuskey-Growing *Fusarium*», <http://res.agr.ca/brd/fusarium/growth.html>,