

EFECTO DE LOS MEDIOS DE CULTIVO Y LA TEMPERATURA EN EL CRECIMIENTO DE *CLADOSPORIUM FULVUM* COOKE (SIN. *PASSALORA FULVA*)

Alexander Bernal Cabrera,¹ Benedicto Martínez Coca,² Manuel Díaz Castellanos,¹ Lidcay Herrera Isla¹ y Yanelys Alonso Díaz¹

¹ Universidad Central de Las Villas. Carretera a Camajuaní Km 5½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, CP 54830, alexanderbc@agronet.uclv.edu.cu

² Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA). Apartado 10, San José de las Lajas, La Habana

RESUMEN

El moho de la hoja causado por *Cladosporium fulvum* es una de las enfermedades más comunes del tomate en los invernaderos cubanos. Para conocer la influencia del medio de cultivo y la temperatura se estudió el crecimiento micelial y la esporulación de tres aislamientos de *C. fulvum* (nos. 3, 6 y 10), procedentes de plantaciones comerciales de tomate bajo condiciones de invernadero, en cuatro medios de cultivo (PDA, SDA, AEM y Czapek) y cinco temperaturas en un rango entre 15 y 35°C. Los medios de cultivos papa-dextrosa agar y sabouraud-dextrosa-agar, así como las temperaturas comprendidas entre 20 y 25°C, y 25 y 30°C, fueron las condiciones óptimas para diferenciar los aislamientos de este hongo en cuanto a su crecimiento micelial y esporulación.

Palabras clave: medios de cultivo, temperatura, esporulación, crecimiento micelial

ABSTRACT

Leaf mould caused by *Cladosporium fulvum* is one of the most common tomato diseases in Cuban greenhouses. In order to know the effect of culture media and temperature on mycelial growth and sporulation of three *C. fulvum* isolation (numbers 3, 6 and 10), coming from commercial tomato plantation under greenhouse conditions, was realized a study in four culture media (PDA, SDA, MEA and Czapek) and five temperatures (from 15 to 35°C). Potato-Dextrose-Agar and Sabouraud-Dextrose-Agar culture media, as well as temperatures between 20-25°C and 25-30°C, were the optimum conditions to differ among the isolations of this fungus as for their mycelial growth and sporulation.

Key words: culture media, temperature, sporulation, mycelial growth

INTRODUCCIÓN

Cladosporium fulvum (sin. *Passalora fulva*) [Braun *et al.*, 2003] es uno de los principales hongos fitopatógenos que incide en el tomate en Cuba, bajo las condiciones de cultivo protegido. Este microorganismo provoca, junto a otros agentes fúngicos, pérdidas importantes [Bernal *et al.*, 2001], y está ampliamente distribuido en las regiones donde se siembra el cultivo [Blancard., 1992; Jones *et al.*, 1997].

La temperatura y el medio de cultivo son aspectos fundamentales en la fisiología y distribución de los hongos [Thomma *et al.*, 2005]; sin embargo, existen pocas experiencias sobre la influencia de estos factores en el hongo mencionado, y son en la mayoría de los casos empíricas. Por ello el presente trabajo se propone estudiar el efecto del medio de cultivo y la temperatura sobre el crecimiento de este patógeno, y así incrementar los conocimientos acerca de su biología con el fin de poder ejercer sobre él un control más eficaz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se evaluó la influencia de los medios de cultivo papa dextrosa-agar (PDA), czapek dox-agar (ACZ), agar extracto de malta (AEM) y Sabouraud-dextrosa-agar (SDA) con pH 5,6 y las temperaturas 15, 20, 25, 30 y 35°C sobre el crecimiento de *C. fulvum*. Para ello se sembraron discos de micelio de 7 mm de diámetro de cultivos monospóricos de tres aislamientos de este patógeno (Tabla 1) en cada una de cuatro placas Petri por variante, las que contenían los medios de cultivo respectivos, y se incubaron a las temperaturas señaladas. El diámetro de las colonias por aislados se midió a los siete y catorce días, y la esporulación a los catorce días de incubación. Se vertieron 10 mL de agua destilada sobre las colonias y se barrió suavemente con la ayuda de un pincel. La concentración de conidios en la suspensión obtenida se determinó mediante la cámara de Neubauer por observación al microscopio óptico Olympus con 40X de aumento.

Tabla 1. Descripción de los aislamientos seleccionados de *C. fulvum*

Aislamiento	Provincia	Localidad	Híbrido de procedencia	Año de aislamiento
3	La Habana	San José de las Lajas	HA-3108	2001
6	Villa Clara	Santa Clara	FA-180	2004
10	Ciego de Ávila	Ceballos	HA-3019	2004

Los datos de las evaluaciones se procesaron por análisis de varianza de clasificación doble. Las comparaciones de medias se realizaron mediante las pruebas de Dunnett C y Duncan. Para la aplicación de los métodos, procedimientos y pruebas se utilizó el paquete estadístico Stagraphics plus 4.1, sobre Windows.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados muestran que el hongo estudiado crece en todos los medios y temperaturas probadas, excepto a 35°C. Los mayores valores de crecimiento micelial se obtuvieron en el medio papa-dextrosa-agar a los siete

y catorce días, respectivamente (*Tabla 2*), no ocurrió así con la esporulación, donde la mayor concentración de conidios se alcanzó en el medio sabouraud-dextrosa-agar (*Tabla 3*).

Los resultados presentan utilidad práctica, pues permiten disponer de varias opciones de sustratos para los trabajos de rutina en relación con el mantenimiento y conservación del cepario en el laboratorio, además de constituir una alternativa para la obtención de conidios *in vitro*, ya que admite utilizar otro medio sintético como el sabouraud-dextrosa-agar y no solo el papa-dextrosa-agar y agar V-8, referidos en la literatura científica para estos fines [Oliver *et al.*, 2000].

Tabla 2. Crecimiento micelial de aislamientos de *C. fulvum* en diferentes medios de cultivos

Medios de cultivo	Aislamientos	Crecimiento micelial (7 días)	Crecimiento micelial (14 días)
PDA	3	3,22 a	5,75 a
	6	2,37 e	4,50 c
	10	3,1 ab	5,40 b
SDA	3	2,85 bc	4,57 c
	6	2,37 e	3,75 ef
	10	2,95 ab	4,75 c
AEM	3	2,30 e	4,05 de
	6	1,92 f	3,52 fg
	10	2,77 cd	4,6 c
Czapek Dox	3	1,82 f	2,82 h
	6	1,87 f	2,7 i
	10	2,2 e	4,15 d
ES ($\pm$)	0,07		0,13
Cv (%)	19,35		21,85

Medias con letras diferentes difieren para $p \leq 0,05$ por la prueba de Duncan.

Tabla 3 Esporulación de aislamientos de *C. fulvum* en diferentes medios de cultivo

Medios de cultivo	Aislamientos	Esporulación (10 ⁻⁷ esp/mL)
PDA	3	3,12 ef
	6	4,84 cd
	10	4,37 d
SDA	3	5,45 b
	6	7,18 a
	10	5,00 bc
AEM	3	5,30 bc
	6	2,95 f
	10	3,58 e
Czapek dox	3	1,40 g
	6	0,76 h
	10	1,71 g
ES (±)	0,54	
CV(%)	23,0	

Medias con letras diferentes difieren para $p \leq 0,05$ por la prueba de Dunnett'C.

En la *Tabla 4* se aprecia que las temperaturas probadas permitieron diferenciar los aislamientos de *C. fulvum*. Las temperaturas comprendidas entre 20 y 25°C fueron

las mejores en cuanto al crecimiento micelial de este fitopatógeno en los dos momentos de evaluación ensayados, y difieren significativamente de las demás. Temperaturas superiores a 30°C presentan una tendencia a la disminución progresiva del crecimiento del hongo.

Los datos obtenidos son similares a los informados por Chupp y Sherf (1960) y Mayea *et al.* (1983), quienes reportan que el desarrollo del micelio de *C. fulvum* tiene lugar en un rango óptimo entre 21 y 25°C, pese a que estos mismos autores reportan un rango mucho más amplio que oscila desde 4 hasta 32°C. Esto podría ser una evidencia de la existencia de aislamientos con diferentes grados de adaptación a las temperaturas.

Al evaluar la concentración de conidios se encontró, de igual forma, diferencias entre los aislados a las diferentes temperaturas ensayadas. Se determinó además que las temperaturas comprendidas entre 25 y 30°C favorecen la esporulación de este agente fitopatógeno.

Diferentes temperaturas de incubación se han utilizado *in vitro* para la producción de conidios de *C. fulvum*. Lindhout *et al.* (1989) y de Wit (1977) utilizaron 22°C y obtuvieron una concentración de 10⁶ conid/mL en medio de cultivo papa-dextrosa-agar.

Tabla 4. Crecimiento micelial y esporulación de tres aislados de *C. fulvum* en diferentes condiciones de temperaturas

Temperaturas	Aislamientos	Crecimiento micelial (7 días)	Crecimiento micelial (14 días)	Esporulación (10 ⁻⁷ esp/mL)
15°C	3	3,35 c	5,87 de	1,08 fg
	6	2,60 e	4,97 g	1,71 de
	10	2,90 d	5,17 f	0,76 gh
20°C	3	4,50 a	8,22 a	1,40 ef
	6	4,20 b	7,12 b	2,18 d
	10	3,37 c	6,47 c	0,92 fg
25°C	3	4,00 b	6,97 b	4,21 b
	6	3,17 c	5,72 e	4,84 a
	10	3,42 c	6,35 cd	2,96 c
30°C	3	2,27 f	4,05 g	3,90 b
	6	1,90 g	2,50 i	4,37 ab
	10	2,25 f	3,37 h	2,96 c
35°C	3	0,00 h	0,00 j	0,00 i
	6	0,00 h	0,00 j	0,00 i
	10	0,00 h	0,00 j	0,00 i
ES (±)	0,121		0,236	0,2
CV (%)	25,31		29,1	25,1*

Medias con letras diferentes difieren para $p \leq 0,05$ por la prueba de Dunnett'C.

Estos hallazgos resultan de importancia para trabajos genéticos con este hongo y en la obtención de material para estudios de patogenicidad.

CONCLUSIONES

- Los mayores valores del crecimiento micelial y esporulación para los tres aislamientos se obtuvieron en los medios de cultivo papa-dextrosa-agar y sabouraud-dextrosa-agar.
- Las temperaturas entre 20 y 25°C permitieron diferenciar los aislamientos en cuanto a su crecimiento micelial, mientras que las comprendidas entre 25 y 30°C permitieron diferenciar los aislamientos en cuanto a la esporulación.
- La temperatura de 35°C no permite diferenciar los aislamientos en cuanto al crecimiento micelial y esporulación.

REFERENCIAS

- Blancard, D.: *Enfermedades del tomate. Observar, identificar y luchar*, INRA, Ed. Mundi-Prensa, 1992.
- Bernal, Blanca; L. Rivero; E. Fernández; Wendolyn Pérez: «Manejo de plagas en híbridos de tomate bajo condiciones de cultivo protegido», *Fitosanidad* 5(1):57-61, 2001.
- Braun, U.; P. W. Crous; F. Dugan; J. Z. Groenewald; G. S. de Hoog: «Phylogeny and Taxonomy of *Cladosporium*-like hyphomycetes, Including *Davidiella* Gen. Nov., the Teleomorph of *Cladosporium*», *Mycology Progress* 2, 2003.
- Chupp, C.; A. F. Sherf: *Vegetable Disease and Their Control*, Constable, Londres, 1960, pp. 541-545.
- Jones, J. B.; J. P. Jones; R. E. Stall; T. A. Zitter: *Compendium of Tomato Diseases*, APS Press, E.U., 1997.
- Lindhout, P.; W. Korta; M. Cislík; I. Vos; T. Gerlagh: «Further Identification of Races of *Cladosporium fulvum* (*Fulvia fulva*) on Tomato Originating from the Netherlands, France and Poland», *Neth. J. Plant. Path.* 95:143-148, 1989.
- Mayea, S.; L. Herrera; C. M. Andreu: *Enfermedades de las plantas cultivadas en Cuba*, Ed. Pueblo y Educación, La Habana, 1983, pp. 234 y 235.
- Oliver, R. P.; B. Henricot; G. Segers: *Cladosporium fulvum*, Cause of Leaf Mould of Tomato», *Fungal Pathology*, Kluwer Academic Publishers, 2000. pp. 65-91.
- Thomma, B. P. H. J.; H. P. van Esse; P. W. Crous; P. J. G. M. de Wit: «*Cladosporium fulvum* (syn. *Passalora fulva*), a Highly Specialized Plant Pathogen As Model for Functional Studies on Plant Pathogenic *Mycosphaerellaceae*», *Molecular Plant Pathology* 6(4):379-393, 2005.
- Wit, P. J. G. M. de: «Light and Scanning-Electron Microscopic Study of Infection of Tomato Plants by Virulent and Avirulent Races of *Cladosporium fulvum*», *Neth. J. Plant Pathol.* 83:109-122, 1977.