

Hoja Técnica

No. 44

CATIE



Cultivo in vitro de *Ojo de gallo*

Manrique González Vargas
Laboratorio de Fitopatología, CATIE

Introducción

La enfermedad causada por *Mycena citricolor*, conocida comúnmente como "ojo de gallo", es una de las más importantes en el cultivo del café. Se estima que, en Costa Rica, afecta del 10 al 15% de las 100 000 ha sembradas de café. Cálculos realizados por el MAG estimaron que esta enfermedad ocasiona pérdidas anuales de \$10 millones a nuestra caficultura (Vargas 2000).

M.citricolor es un hongo Basidiomicetes que produce dos tipos de cuerpos fructíferos: las gemas o cabezitas (asexual) y el basidiocarpo (sexual). Las gemas son pequeñas estructuras amarillas en forma de alfiler; constan de un pedicelo y una cabeza, la cual se desprende fácilmente cuando madura. El basidiocarpo, más grande que la gema, tiene forma de sombrilla y produce y libera una gran cantidad de basidiósporas.

El daño principal infligido por el "ojo de gallo" a las plantaciones de café es la defoliación, que disminuye notablemente el área fotosintética (Fig. 1). El cafeto utiliza sus reservas nutritivas en la producción de follaje nuevo y los pocos frutos formados también pueden ser atacados por la enfermedad, que provoca su caída.

M.citricolor es un patógeno favorecido por la humedad relativa elevada; por lo tanto, se desarrolla en cafetales excesivamente sombreados, con poca ventilación y en zonas de alta precipitación. Sin embargo, en algunas fincas puede aparecer en parches donde el microclima favorezca su desarrollo.

Dada la trascendencia de este patógeno, se considera importante divulgar la metodología utilizada en el Laboratorio de Fitopatología del CATIE para su manipulación y cultivo *in vitro*.



Figura 1. Hojas de café afectadas severamente por *Mycena citricolor*.

Producción de gemas de *M. citricolor* en cámara húmeda

Se recolectan hojas infectadas con *M. citricolor* y se lavan con bastante agua destilada para eliminar la suciedad que proviene del campo; posteriormente, se desinfectan con alcohol de 95° y se vuelven a enjuagar con agua destilada.

Seguidamente, se colocan dentro de una cámara húmeda que puede ser una caja plástica con una espuma o toalla esterilizada húmeda, tapada de tal manera que se asegure una humedad relativa alta propicia para estimular una nueva germinación (Fig. 2). A los 9 o 12 días aproximadamente, se observarán gemas o cabecitas maduras.

Aislamiento de *M. citricolor*

Se seleccionan las hojas con lesiones que presenten producción de gemas o cabecitas para su cultivo *in vitro*.

En la cámara de flujo laminar, con la ayuda de un estereoscopio y un haza fina estéril, se toma una gema o cabecita de *M. citricolor* y se cultiva en un plato de Petri previamente chorreado con algún medio de cultivo apropiado, PDA o V8 (aproximadamente 20 ml medio cultivo / plato) (Fig. 3).

Los platos de Petri cultivados se colocan en una incubadora a 22°C, con períodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.

Multiplicación de un cultivo de *M. citricolor*

Dentro de una cámara de flujo laminar, se escogen platos de Petri con crecimiento activo de *M. citricolor* (20-22 días de cultivado); se cortan trozos pequeños que se colocarán, con la ayuda de un haza fina o bisturí, en platos de Petri con medio nutritivo (V-8 o PDA). Los platos de Petri cultivados se colocan en una incubadora a 22°C, con periodos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (Fig. 4 y 5).



Figura 2. Cámara húmeda en la que se propicia una nueva producción de gemas de *M. citricolor*.

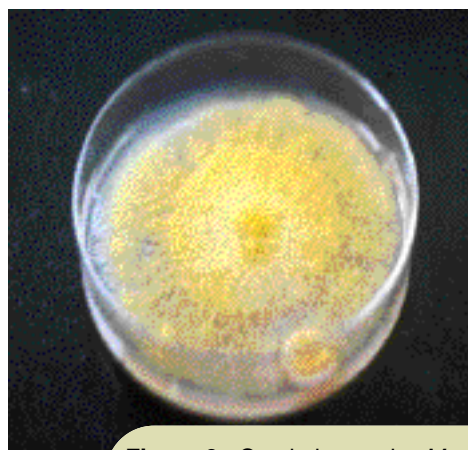


Figura 3 Crecimiento de *M. citricolor* en un plato de Petri chorreado con PDA. Nótese la gran producción de gemas.



Figura 4. Autoclave utilizado para la esterilización de medios de cultivo.

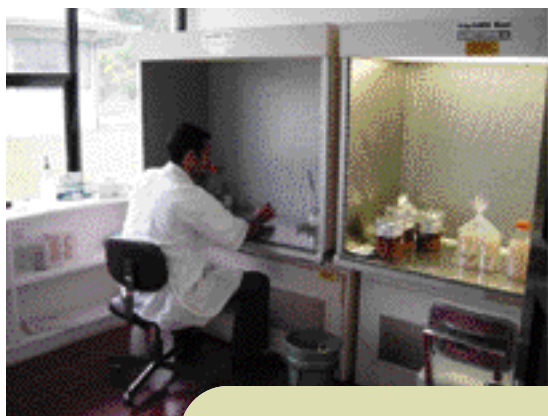


Figura 5. Cámaras de flujo laminar donde se realizan los trabajos con *M. citricolor*.

Medios de cultivo usados

AA al 3%. Este es un medio de cultivo sin nutrientes, usado para obtener un crecimiento ralo y lento de *M. citricolor*, lo cual ayuda a obtener un cultivo libre de contaminantes secundarios.

Se prepara agregando 30g de agar granulado a un litro de agua destilada caliente y agitando hasta que el agar se disuelva completamente.

V – 8. Este medio es altamente nutritivo y estimula la esporulación de *M. citricolor*. Se prepara agregando 200 ml de V-8 (jugo de vegetales), 3 gr de carbonato de calcio y 20 gr de agar a 500 ml de agua destilada; se ajusta a 1 litro y se calienta y agita hasta que los componentes se hayan disuelto completamente.

PDA. Este medio es bastante nutritivo y estimula la esporulación de *M. citricolor*. Se prepara cocinando 250 gr de papa en 500 ml de agua destilada durante 1 hora, mientras se disuelven en otro recipiente 20 gr de agar en otros 500 ml de agua destilada.

Se cuele el extracto de papas a través de gaza doblada en varias capas, se mezcla con el agar disuelto y se le agrega 20 gr de dextrosa. Restaure el volumen total a 1 litro. Es importante mencionar que este es el medio más comúnmente usado para obtener una buena producción de gemas infectivas de *M. citricolor*.

Esterilización

Los medios de cultivo se esterilizan en recipientes de 1 litro en un autoclave. El autoclave consiste en una cámara cerrada, de doble forro, que se utiliza para la esterilización con vapor de agua a presión. La mayoría de los medios de cultivo se esterilizan a una pre-

sión de 15 libras por pulgada cuadrada durante 20 minutos, a 120°C. Los recipientes grandes deben esterilizarse por más de 20 minutos (Fig. 6).

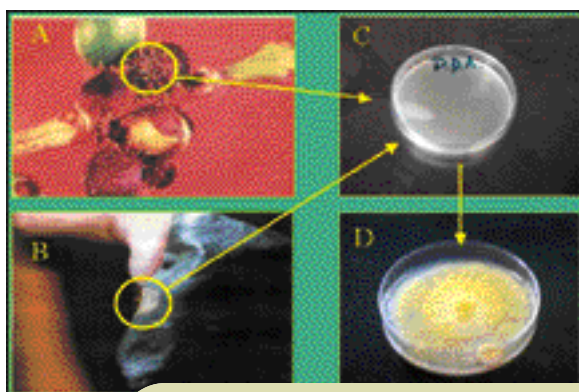


Figura 6. (A,B) Gemas de *M. citricolor* sobre hojas y frutos respectivamente. (C) Plato de Petri con PDA inoculado con una gema de *M. citricolor*. (D) Crecimiento de *M. citricolor* 22 días después de la inoculación.

Esterilización de la cristalería

La cristalería se esteriliza utilizando aire caliente; para ello, se coloca en un horno a 160°-180°C durante 1 hora.

Llenado de platos de Petri con los medios de cultivo

Una vez que el medio de cultivo y los platos de Petri se hayan esterilizado, se procede a dispensar en ellos el medio de cultivo. Utilice una cámara de flujo laminar para esta operación. El procedimiento es el siguiente:

- 1- Destape el recipiente que contiene el medio de cultivo y pase la boca de aquel sobre la llama de una lámpara de alcohol, evitando tocarla.
- 2- Levante un lado de la tapa del plato de Petri que va a chorrear, solamente lo necesario para insertar la boca del recipiente, y dispense de 20 a 25 ml del líquido.
- 3- Coloque la tapa del plato de Petri en su sitio y agite con un movimiento de rotación, para que el medio se distribuya uniformemente.
- 4- Espere a que el medio se solidifique antes de usarlo (aprox. 20 minutos).

Literatura citada

Vargas C, L. 2000. Determinación de la enzima trehalasa en el hongo *Mycena citricolor*. In Simposio Latinoamericano de Caficultura (19,2000, San José Costa Rica). Memorias. San José, CR, IICA/Promecafe/ICAFE. p. 355-364.