

ESPORULACION DE *Cercospora fijiensis* EN DIFERENTES AMBIENTES

Carl W. Williams Bailey*

ABSTRACT

The effect of growth culture, temperature, illumination and mode of conidia collecting on the sporulation of *Cercospora fijiensis* were studied. Highest sporulation was on V8 juice agar. The best mode of conidia collection was by scraping, flooding with sterile water and discarding of the suspension of 12 day old cultures and collecting the conidia four days later. Greater sporulation was attained with alternating lighting (12 hours) and fluctuated temperature 21-30°C.

RESUMEN

Se estudió el efecto de medios de cultivo, temperatura e iluminación sobre la esporulación del hongo *Cercospora fijiensis*. El hongo esporuló más sobre el medio agar jugo V8. Se comparó el método de recolección de conidios con otro método en donde, en cultivo de 12 días se raspa su superficie y se descarta la suspensión, colectando los conidios cuatro días después. La temperatura que fluctuó entre 21 y 30°C, fue la mejor para la esporulación. El mejor método de recolección fue el raspado de la superficie de las colonias y colecta cuatro días después.

INTRODUCCION

Es difícil lograr abundante esporulación "in vitro", de especies del género *Cercospora* (Tuite 1969). En *C. fijiensis* se mantiene este problema. Sin embargo, son escasos los estudios para determinar los factores que inciden en la esporulación de *C. fijiensis*.

Algunos investigadores han logrado la esporulación del hongo (Stover 1976, Fullerton y Tracey 1984, Mourichon *et al.* 1987), pero no indican cifras con las cuales se pueda establecer la diferencia entre una esporulación abundante o una pobre, de manera que contara con un método probado y aceptable para la esporulación. Se sugiere el uso de material homogéneo para realizar investigaciones en *Mycosphaerella fijiensis*, lo cual no es típico de sus ascosporas (Stover 1976), siendo mejor material en este caso, los conidios. Pero su obtención en forma abundante no está garantizada por los métodos actuales.

Los objetivos del ensayo fueron estudiar el efecto de cuatro medios de cultivo, dos condiciones de iluminación, cinco temperaturas y dos métodos de recolección de conidios en la esporulación de *C. fijiensis*, y determinar la interacción que produce la máxima esporulación.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron cuatro medios de cultivo, bajo dos condiciones de iluminación y cinco temperaturas usando dos métodos de recolección de conidios. El diseño fue completamente al azar en un arreglo factorial con cuatro repeticiones.

Recibido: 03/10/94. Aprobado: 25/07/95.

Basado en la Tesis de Mag. Sc. CATIE. Programa de Posgrado. 7170 Turrialba, Costa Rica.

*Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Agropecuarias. David, Chiriquí. República de Panamá.

Se probaron los medios de cultivo agar Mycophil (Mycophil), agar Czapeck + extracto de levadura al 0.1% (Czapeck), agar papa dextrosa (PDA), y agar jugo V8 (V8) modificado (según Mourichon *et al.* 1987). Las condiciones de iluminación fueron oscuridad total y oscuridad alternada con luz cada 12 horas.

Se ensayaron las temperaturas 23, 25, 27, 29°C y condiciones del laboratorio de fitopatología del CATIE en Turrialba (temperatura fluctuante entre 21 y 30°C e iluminación alternada de aproximadamente 12 h). Los métodos de recolección de conidios fueron: a) el tradicional (12 días) que consiste en cultivar el hongo en los medios mencionados, bajo las diferentes condiciones de temperatura e iluminación durante 12 días y contar la producción de conidios; b) el método propuesto (12 + 4 días) igual al anterior, pero a los 12 días se raspó la superficie del cultivo con un pincel estéril, previamente inundado en forma aséptica, con 10 ml de solución (estéril) + Tween 80 en agua a la concentración de 0.0133%. Se eliminó la suspensión y se colocó de nuevo los medios con los cultivos durante cuatro días, bajo las condiciones mencionadas para luego proceder a recolectarlos.

Se utilizaron platos petri de plástico de 9 cm x 1 cm y 20 ml de medio en cada uno. El inóculo fue de 4400 propágulos/plato (conidios y micelio), luego se sellaban con Parafilm "M" (American Can Company, Greenwich).

Las incubadoras que controlaban iluminación y temperatura, se regularon a 25 y 27°C e iluminación alterna cada 12 h. El efecto de oscuridad total se logró envolviendo los platos en papel aluminio. Dos incubadoras más que sólo controlaban temperaturas se regularon a 23 y 29°C, en ellas se colocaron los platos envueltos en papel aluminio. Bajo condiciones de laboratorio sólo se colocaron los platos bajo iluminación natural (aprox 12 h de luz y oscuridad diaria), sin incluir el efecto de oscuridad continua.

Las medias referentes a la máxima esporulación se obtuvieron para una interacción específica de un nivel del factor involucrado, dicha media provino del conteo de cuatro platos.

RESULTADOS

Para el factor temperatura no se encontró diferencia significativa entre las tres inferiores (23, 25 y 27°C) ni entre las dos superiores para oscuridad continua (Cuadro 1). Tampoco se observó diferencia significativa entre las temperaturas 25 y 27°C al analizar los datos para iluminación continua y alterna (Cuadro 2).

CUADRO 1. Producción de conidios de *C. fijiensis* en oscuridad continua bajo dos métodos de recolección de conidios, cuatro medios de cultivo, y cuatro temperaturas.

Métodos de Recolección			Esporulación max. ²
	N ⁴	\bar{x} ¹	
12+4 días	16	9 330 ^{ab}	43 500
12 días	16	3 390 b	24 750
Medios de Cultivo			
V8	8	14 250 ^a	43 500
PDA	8	4 800 b	14 250
Mycophil	8	4 020 b	21 000
Czapeck	8	3 360 b	10 500
Temperaturas (°C)			
23	8	9 660 ^a	21 000
25	8	7 740 ^a	43 500
27	8	5 520 ^{ab}	10 500
29	8	2 430 b	3 750

¹ Media de conidios por plato. ² Máx. número de conidios por plato a ese nivel del factor, en cuatro repeticiones. ³ Medias con letras iguales no difieren significativamente al 5% según la Prueba de Tukey. ⁴ Número de medias involucradas para ese factor, cada una de cuatro repeticiones.

CUADRO 2. Producción de conidios de *C. fijiensis* en dos condiciones de iluminación, dos métodos de recolección de conidios, cuatro medios de cultivos, y dos temperaturas.

Iluminación			Esporulación max. ²
	N ⁴	\bar{x} ¹	
luz alterna	16	7 849 ^{ab}	41 250
oscuridad	16	6 973 ^a	43 500
Métodos de recolección			
12+4 días	16	12 065 ^a	43 500
12 días	16	3 987 b	24 750
Medios de cultivo			
V8	8	21 989 ^a	43 500
PDA	8	5 399 b	15 750
Mycophil	8	5 377 b	12 750
Czapeck	8	2 772 b	6 000
Temperaturas (°C)			
25	16	8 398 ^a	43 500
27	16	6 480 ^a	41 250

¹ Media de conidios por plato. ² Máx. número de conidios por plato a ese nivel del factor, en cuatro repeticiones. ³ Medias con letras iguales no difieren significativamente al 5% según la Prueba de Tukey. ⁴ Número de medias involucradas para ese factor, cada una de cuatro repeticiones.

No hubo diferencia significativa para el efecto de ambas condiciones de iluminación 25 y 27°C. Aunque la producción media de conidios bajo iluminación fue mayor que en oscuridad continua, hubo máxima esporulación, producto de una interacción en la que estaba involucrada la oscuridad continua (Cuadro 2).

Cuando se analizaron los datos para las tres temperaturas que incluían iluminación (25; 27 y condiciones de laboratorio), la esporulación fue significativamente superior para todos los efectos que fueron sometidos bajo condiciones de laboratorio (Cuadro 3).

Para todos los factores el mejor método de recolección de conidios fue el raspado de la superficie de las colonias y el mejor medio fue el agar jugo V8 modificado (Cuadros 1, 2 y 3).

Se observó el fenómeno de un tipo de germinación "in situ" de los conidios sobre el conidioforo. El medio Mycophil, generalmente no se recuperó después del raspado como los otros medios. Finalmente, el medio Czapeck se contaminó con bacterias, con mayor frecuencia que los demás.

CUADRO 3. Producción de conidios de *C. fijiensis* en condiciones de iluminación bajo tres temperaturas (incluyendo la del laboratorio), dos métodos de recolección de conidios, y cuatro medios de cultivo.

Métodos de Recolección		Esporulación max. ²	
	N ⁴	X ⁻¹	
12+4 días	12	42 690 ^{a3}	346 200
12 días	12	11 640 b	165 000
Medios de Cultivo			
V8	6	50 670 ^a	346 200
PDA	6	23 700 b	174 500
Mycophil	6	12 240 b	30 500
Czapeck	6	10 500 b	49 500
L (°C)			
Lab (21-30)	8	64 680 ^A	346 200
25	8	10 440 ^B	27 750
27	8	8 850 ^B	41 250

¹ Media de conidios por plato. ² Máx. número de conidios por plato a ese nivel del factor, en cuatro repeticiones. ³ Medias con letras iguales no difieren significativamente al 5% según la Prueba de Tukey. ⁴ Número de medias involucrados para ese factor, cada una de cuatro repeticiones.

DISCUSION

Efecto de medios de cultivo. Los cuatro medios de cultivo permitieron la esporulación de *C. fijiensis*. Aunque el agar jugo V8 fue superior en este sentido, posiblemente debido a su alto contenido de elementos nutritivos naturales, comparado con las sustancias sintéticas de los demás medios.

En pruebas preliminares, se ensayó un medio con extracto de hoja de banano - tiamina - glucosa y agar donde creció el hongo, pero con una esporulación pobre. A pesar de contener sustancias nutritivas naturales no produjo abundante esporulación. Contenía glucosa, un elemento nutritivo sintético no existente en el medio agar jugo V8, por lo que se estima que la glucosa tiene algún efecto detrimental o inhibitorio en la esporulación. Esta respuesta concuerda con Berger y Hanson (1963), quienes en un trabajo similar sobre *C. zebrina*, encontraron que mediante un extracto de *Trifolium pratense* + 2% glucosa y agar, la esporulación era mínima comparada con ese medio sin la glucosa.

Es posible que Mycophil y Czapeck agar no propiciaran buena esporulación, dada la escasa recuperación de la colonia del hongo sobre agar Mycophil luego del raspado y/o inundación del medio en crecimiento, al igual que el efecto de la contaminación del agar Czapeck, lo cual fue propiciado probablemente, por la riqueza del medio (extracto de levadura) que promueve el crecimiento bacteriano.

Efecto de la luz. En experimentos preliminares se estableció que *C. fijiensis* esporuló sobre su hospedante, bajo condiciones de cámara húmeda dentro de una incubadora oscura. Pero no se comparó cuantitativamente la esporulación sobre el hospedante, bajo diferentes condiciones de iluminación. Con esto se podría determinar si el efecto de iluminación interactuara con algún nutriente, que no es suministrado al hongo bajo condiciones "in vitro". La esporulación "in vitro" fue menor bajo oscuridad en este ensayo; por lo cual se supone la existencia de un mecanismo fotosensitivo en la esporulación del hongo. Esto se confirma con los resultados de Foure *et al.* (1988) y Mourichon *et al.* (1987), quienes utilizaron iluminación continua. También coincide con los resultados de Fullerton y Tracey (1984) y Stover (1976), quienes trabajaron sobre la esporulación del hongo bajo condiciones de iluminación.

Efecto de la temperatura. Este factor parece no ser significativamente crítico para la esporulación de *C. fijiensis*, bajo oscuridad continua y a un rango de temperatura cercano al óptimo (23-29°). Posiblemente ocurre porque la iluminación ejerce mayor efecto sobre la esporulación que la temperatura en ese rango, o que es mayor el efecto de una temperatura fluctuante que una constante. La segunda suposición es más aceptable en vista de los resultados del análisis de los datos conjuntos de esporulación a las dos temperaturas (25 y 27°C), bajo oscuridad total e iluminación alternada. Esto también lo demuestra el hecho de que bajo temperatura de laboratorio 21 a 30°C la esporulación fue mayor que bajo otros niveles de temperatura constante.

No se incluyó un tratamiento de oscuridad continua en laboratorio (temperatura fluctuante), con lo que se hubiese evaluado el efecto de la iluminación bajo esas condiciones de temperatura. Berger y Hanson (1963) en su trabajo con *C. zebrina*, señalaron que la mejor temperatura para su crecimiento vegetativo, es igual que para su esporulación. No se conoce si hay una temperatura adecuada para el desarrollo vegetativo de *C. fijiensis*, diferente a la que promueva una máxima esporulación, pero si existiera, el mejor nivel de temperatura del ensayo sería aquel dado por las condiciones de laboratorio (ámbito más amplio), que para efecto de este ensayo coincide con la temperatura que promovió la mayor esporulación.

Efecto de método de recolección de conidios. Se podría pensar que los resultados obtenidos por el método de recolección de conidios, cuatro días después del raspado de la superficie de la colonia, se deba a que promueve un mayor número de inóculo por plato y por ende una mayor superficie esporulante. Pero al momento del conteo, se observó que en estos platos los sectores donde más esporulaba el hongo, era en colonias viejas y las nuevas (de cuatro días) eran escasas y de esporulación pobre.

El efecto de raspado podría ocasionar un daño mecánico, con lo que se promueve la esporulación, tal vez liberándose alguna sustancia que la estimula, como lo señalan Leonard y Stanley (1973), sobre el hongo *Schizophyllum commune*, al igual que Dahlberg y Van Etten (1982). Canova (citado por Dhingra y Sinclair 1985) obtuvo resultados semejantes a los de este trabajo con *C. beticola* bajo un procedimiento similar.

El efecto de la inundación de las colonias no se considera un factor definitivo en este método ya que fue por un período breve, aunque para el trabajo de Ludwig *et al.* (citados por Dhingra y Sinclair 1985), sí fue un factor definitivo en la esporulación de *Alternaria solani*.

Germinación *in situ* de los conidios sobre los conidióforos. Este fenómeno también lo observó Berger y Hanson (1963) sobre *C. zebrina*, y probablemente sea la causa de un bajo conteo de conidios ya que cuando se produce esto, se confunden los conidios y conidióforos. Tal vez, este factor se pueda controlar cosechando los conidios más temprano e impidiendo así que germinen sobre los conidióforos.

CONCLUSIONES

- La mayor esporulación del hongo se obtuvo sobre el medio agar jugo V8, bajo las diferentes temperaturas, cantidad de iluminación y métodos usados en el ensayo.
- La mayor esporulación se obtuvo bajo condiciones de iluminación.
- La esporulación fue mejor bajo un régimen de temperatura fluctuante entre 21 y 30°C, que a temperatura constante comprendidas en dicho ámbito (23, 25, 27 y 29°C), y con raspado y cosecha de conidios cuatro días después.

BIBLIOGRAFIA

- BERGER, R.D. y HANSON, E.W. 1963. Relation of environmental factors to growth and sporulation of *Cercospora zebrina*. *Phytopathology* 53:286-294.
- DAHLBERG, K. y VAN ETEN, J.L. 1982. Physiology and Biochemistry of fungal sporulation. *Ann. Rev. Phytopathol.* 20:281-301
- DHINGHRA, O. y SINCLAIR, J. 1985. *Basic plant pathology methods*. Florida, CRC. p. 19.
- FOURE, E. *et al.* 1988. La cercosporiose noire des bananiers et des plantains au Cameroun (*Mycosphaerella fijiensis*), Contribution a l'étude des premieres phases de l'infection parasitaire. Mise au point de tests précoces d'inoculation sur plants issus de vitro-culture. *Fruits* 43(6):339-348.

FULLERTON, R.A. y TRACEY, G.M. 1984. Tolerance of *Mycosphaerella fijiensis* to benomyl and carbendazim in the Pacific Islands. Trop. Agric. 61(2):133-136.

MOURICHON, D.P. *et al.* 1987. Inoculation experimentale de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet sur de jeunes plantules de bananiers issues de culture in vitro. Fruits 42(4):195-198.

STOVER, R.H. 1976. Distribution and cultural characteristics of the pathogens causing banana leaf spot. Trop. Agric. 53(2):111-114.

THOMAS J., L. y STANLEY, D. 1973. Induction of haploid fruiting by mechanical injury in *Schizophyllum commune*. Mycologia 65(4):809-822.

TUITE, J. 1969. Plant pathological methods: fungi and bacteria. Minn., Burgess. 239 p.

WILLIAMS B., C. 1989. Determinación de la sensibilidad de *Mycosphaerella fijiensis* a fungicidas inhibidores de la síntesis del ergosterol (ISE) utilizando ascosporas y conidios. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 114 p.

Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas
(CONICIT)

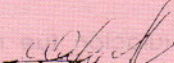
otorgan el

PREMIO A LA EMPRESA EDITORIAL CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA 1995

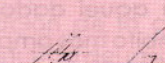
A

Editorial del Centro de Información y Comunicación en Fitoprotección
del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE)

San José, 4 de agosto de 1995


Alfredo Vargas Rodríguez
Presidente Consejo Director


Fernando Cortés
Director Ejecutivo


Max Cerdas López
Presidente del Jurado

PREMIO EDITORIAL CIENTIFICA Y TECNOLÓGICA
1995

REPRESENTACION DE UNA POLICROMIA DEL ARTE
ABORIGEN COSTARRICENSE

El isotipo, dibujado por Oscar Bákit, está basado en una vasija de cerámica encontrada en la Hacienda Templeque, Guanacaste. Perteneció al Período Temoprano VI, aproximadamente en el año 1100. Sus colores están dentro del patrón del llamado Estilo Nicoya-Papagayo.

El dibujo de este isotipo corresponde a un repetido diseño de ojos simbólicos "Mayold" de esa época. De acuerdo con algunos escritores, estos ojos se enfrentan normalmente a los ojos humanos y representan el continuo contraste y lucha de lo antiguo con lo nuevo, de lo tradicional con lo moderno, de la permanente superación de las condiciones propias a que está sujeta la naturaleza.