

Influencia de cuatro medios de cultivo sobre el crecimiento micelial de *Phytophthora palmívora* (Butler) Butl

Influence of four cultivate means on micelial grow of Phytophthora palmívora (Butler) Butl

Lázaro Cotilla Pelier, Amaury Díaz Rodríguez, Georgina Berroa Navarro, Rodolfo Rodríguez Ravelo.

Centro de Desarrollo de la Montaña, Limonar, El Salvador, Guantánamo. Telef: 82206, 82207, 322229, 82140, 82120, 82167

E-mail:

RESUMEN. *Phytophthora palmívora* (Butler) Butl. constituye el agente fitopatógeno de mayor importancia en el cultivo del cacao, tanto por sus niveles de incidencia, como por sus afectaciones al fruto. Se realizó la investigación con el objetivo de conocer un medio de cultivo óptimo para el crecimiento micelial de un aislado de *Phytophthora palmívora* (Butler) Butl. autóctono del municipio El Salvador, provincia de Guantánamo, como fuente para la obtención de inductores de resistencia sistémica (elicitors) frente al ataque del propio hongo y de otros agentes. La investigación fue realizada en el Centro de Desarrollo de la Montaña, en el período comprendido de enero a mayo de 2005, para lo cual, a partir de frutos afectados por el hongo patógeno, se aislaron colonias monospóricas del mismo para la obtención del aislado. El experimento se montó sobre un diseño completamente aleatorizado, con diez réplicas por tratamiento y se investigaron los siguientes medios: papa-dextrosa-agar; jugo de tomate-agar suplementado con carbonato de calcio; pulpa de tomate en conserva-agar suplementado con carbonato de calcio y pulpa de cacao-agar. Los medios se esterilizaron en autoclave a 1.5 atmósferas durante 15 minutos y se vertieron en placas de Petri en las que se depositaron discos de 5 mm del micelio del hongo. Se evaluó cada 24 horas el crecimiento radial de la colonia, obteniéndose como resultado que en el medio jugo de tomate-agar suplementado con carbonato de calcio, hubo mayor crecimiento micelial del aislado, mostrando diferencias significativas respecto a los restantes tratamientos.

Palabras clave: cacao, medios de cultivo, *Phytophthora palmívora*.

ABSTRACT. *Phytophthora palmívora* (Butler) Butl. is an important pathogenic fungus in the of cocoa crop, as much for its high presence as its damage to fruit. An investigation was carried out to learn the ideal growth medium for an isolate of *Phytophthora palmívora* (Butler) Butl. native to the municipality of El Salvador, Guantánamo province, as a source for identifying factors in the systemic resistance of plants against this and other pathogenic agents. The research took place in the Center of Mountain Development from January to May 2005, during which time monosporic colonies were isolated from *P. palmívora*-infected fruit. The experimental design was completely randomized, with 10 replicates each of the following treatment mediums: potato-dextrose-agar; tomato juice-agar supplemented with calcium carbonate; conserved tomato paste-agar supplemented with calcium carbonate; and cacao paste-agar. The mediums were sterilized in pressurized chambers of 1.5 atmospheres for 15 minutes and placed in Petri dishes into which were applied disks of 5 mm fungus mycelium. The radial growth of the colonies were evaluated every 24 hours, and results found that the tomato juice-agar supplemented with calcium carbonate was the most effective growth medium, with mycelium demonstrating significantly more growth than in the other treatments.

Key words: cocoa, cultire media, *Phytophthora palmívora*.

INTRODUCCIÓN

En la actualidad, cuando se aboga cada vez más por una agricultura ecológicamente sana y económicamente viable, se torna atractiva toda investi-

gación orientada al desarrollo de bioproductos efectivos para el control de plagas y enfermedades de los cultivos.

Dentro de los productos bioactivos de origen natu-

ral que se perfilan como una alternativa promisorio para combatir la incidencia de agentes fitopatógenos, se encuentran los elicitores; moléculas de origen biótico o abiótico que estimulan, aun en ausencia de microorganismos, la producción y acumulación de fitoalexinas y otras sustancias que participan en las defensas bioquímicas de la planta (Dixon y Harrison, 1990; Heath, 1991 y Echemendía y González, 2000), por lo que se conocen como inductores de resistencia sistémica.

Entre los elicitores bióticos más potentes que se conocen están los de origen fúngico los cuales tienen su base en una serie de sustancias que constituyen, en algunos casos, componentes estructurales importantes de los hongos y, en otros, metabolitos excretados al medio de cultivo por los mismos. En el primer grupo se hallan sustancias como la quitosana, un polímero de 1-4 glucosamina presente en la pared celular de muchos hongos fitopatógenos y que se obtiene por desacetilación alcalina de la quitina (Ramírez *et al.*, 2000 y Falcón *et al.*, 2004). El segundo grupo, comprende cierto número de metabolitos segregados al medio de cultivo por algunos gérmenes, generalmente de naturaleza proteica. Tal vez el ejemplo más interesante dentro de este grupo lo constituyan las elicinas; proteínas segregadas al medio por la mayoría de las especies del género *Phytophthora* estudiadas y que tienen la capacidad de inducir respuesta hipersensible y la activación de resistencia sistémica adquirida. (Acosta *et al.*, 1998)

La especie *Phytophthora palmivora* (Butler) Butl., pudiera constituir una fuente potencial de elicinas o de glucanos α 1,3-1,6 enlazados con actividad inductora de resistencia sistémica adquirida sobre el cultivo de *Theobroma cacao* L. Este, pudiera ser el punto de partida para la obtención de un elicitor efectivo para el control de este importante agente fitopatógeno del cacao. El objetivo de esta investigación es conocer el medio de cultivo mejor para el crecimiento micelial de un aislado de *Phytophthora palmivora* (Butler) Butl.

MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Centro de Desarrollo de la Montaña en el período comprendido de enero a mayo de 2005.

Obtención del aislado del *Phytophthora palmivora* (Butler) Butl.

Para la obtención del aislado de este agente patógeno se partió de frutos (bellotas) de cacao afectadas por el hongo patógeno procedentes de áreas cacaoteras del municipio El Salvador, provincia de Guantánamo. Las bellotas se desinfectaron externamente con alcohol etílico al 70 % y se colocaron fragmentos de las mismas en cámara húmeda para favorecer la aparición y crecimiento del micelio del hongo. Luego se comprobó al microscopio clínico con aumento 40x y claves taxonómicas de identificación de esta especie, la presencia de las estructuras reproductivas correspondientes a *Phytophthora palmivora* (Butler) Butl. a partir de las cuales se realizó la siembra en placas de Petri microbiológicas con medio agar-pulpa de tomate.

Determinación del medio óptimo para el crecimiento masivo del micelio

La investigación del medio óptimo para el crecimiento masivo del micelio del hongo se realizó mediante la evaluación de cuatro medios de cultivo naturales y sintéticos:

- Papa-dextrosa-agar.
- Jugo de tomate- agar suplementado con carbonato de calcio.
- Pulpa de tomate en conserva-agar suplementado con carbonato de calcio.
- Pulpa de cacao-agar.

Los medios se esterilizaron en autoclave a 1,5 atmósferas de presión durante 15 minutos y se vertieron en placas de Petri (100 x 15 mm). Posteriormente se sembró un disco de 5 mm de diámetro del micelio del hongo patógeno en cada placa y se evaluó, cada 24 horas, el diámetro de la colonia (cm) en cada medio.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con diez réplicas por tratamiento, donde la causa de variación fue el medio de cultivo empleado.

Los resultados se procesaron con ayuda del paquete estadístico STATGRAPHIC Plus ver 5.0. Se aplicó un análisis de varianza de clasificación simple y para la comparación de las medias se utilizó la prueba de Scheffe.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El crecimiento micelial del aislado *Phytophthora palmivora* en los diferentes medios de cultivo evaluados se aprecia en la tabla 1.

Tabla 1. Influencia de los medios de cultivo sobre el crecimiento micelial del aislado de *Phytophthora palmivora* (Butler) Butl.

| Medio de cultivo | Crecimiento radial de la colonia (cm) | | | | |
|--|---------------------------------------|----------|----------|----------|-----------|
| | 24 horas | 48 horas | 72 horas | 96 horas | 120 horas |
| Jugo de tomate-agar con CaCO ₃ | 0,64a | 1,11a | 1,90a | 2,74a | 3,13a |
| Pulpa de tomate en conserva-agar con CaCO ₃ | 0,00c | 0,00c | 0,00c | 0,07d | 0,15d |
| Pulpa de cacao-agar | 0,16b | 0,27b | 0,56b | 0,94b | 1,39b |
| PDA | 0,14b | 0,24b | 0,50b | 0,65c | 1,05c |
| Es x ± | 0,02 | 0,01 | 0,04 | 0,03 | 0,02 |

Letras desiguales en la misma columna difieren para $p < 0,05$ por Scheffe

El máximo crecimiento micelial del hongo se obtuvo a las 120 horas en el medio jugo de tomate-agar suplementado con carbonato de calcio, el cual mostró diferencias significativas respecto a los restantes medios de cultivo.

Le siguió, en orden decreciente, el obtenido con el medio pulpa de cacao-agar para el mismo periodo de tiempo y con diferencias significativas respecto a los restantes. A las 24, 48 y 72 horas de incubación no se observaron diferencias entre el crecimiento micelial obtenido en este medio y el obtenido en el medio papa-dextrosa-agar (PDA).

En el medio de cultivo pulpa de tomate en conserva-agar suplementado con CaCO₃ no se observó crecimiento del micelio hasta las 96 horas de incubación del hongo y el valor máximo alcanzado por el diámetro de la colonia, al cabo de las 120 horas, fue el menor con diferencias significativas en relación con los restantes tratamientos. Esto pudo estar dado por la presencia de los preservantes que normalmente se añaden a los productos comerciales en conserva y que pueden inhibir el crecimiento de muchos microorganismos.

Por otra parte, el máximo crecimiento del micelio del hongo observado en el medio jugo de tomate-agar está en correspondencia con los resultados obtenidos para otras especies del género *Phytoph-*

thora. Así, López *et al.* (1996) observaron un crecimiento óptimo de *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary cuando se cultivó en un medio con jugo de tomate fresco.

La determinación del medio óptimo para la obtención masiva del micelio de un hongo fitopatógeno, cobra enorme importancia cuando se investigan las potencialidades del mismo como fuente de obtención de fracciones oligoméricas con propiedades inductoras de resistencia sistémica frente al ataque de hongos patógenos. Estos inductores o elicitores exógenos proceden de la pared celular y el medio de cultivo de microorganismos fitopatógenos.

Numerosas investigaciones con especies del género *Phytophthora* han demostrado las posibilidades de este género al respecto: Así, se ha hallado que la pared celular de *Phytophthora parasitica var. nicotianae* está compuesta principalmente de glucanos α 1,3-1,6 enlazados, además de celulosa y proteínas en pequeñas cantidades. Del mismo, se ha aislado una glicoproteína (GP 34) la cual induce respuesta necrótica hipersensible y activación de genes defensivos cuando es infiltrada por inyección en tejidos foliares de tabaco (Gutiérrez *et al.*, 1998). Por otro lado, las enzimas α 1,3 glucanasas constituyen uno de los principales mecanismos defensivos de las plantas involucrados en la generación de elicitores procedentes del micelio de hongos fitopatógenos.

A partir de todo lo anterior, *Phytophthora palmivora* (Butler) Butl. se perfila como una posible fuente promisoriosa a los efectos de la obtención de fracciones de oligoglucanos con capacidad para la inducción de resistencia sistémica adquirida (SAR) en el cultivo del cacao.

CONCLUSIONES

1. La cepa aislada de *Phytophthora palmivora* (Butler) Butl. alcanzó el crecimiento micelial óptimo en el medio de cultivo jugo de tomate-

agar suplementado con carbonato de calcio seguido del medio pulpa de cacao a las 120 horas.

Recibido: 20/Diciembre/2006

Aceptado: 12/Febrero/2007

BIBLIOGRAFÍA

ACOSTA, A.; DALILA PAZ-LAGO Y A. GUTIÉRREZ: Obtención y purificación parcial de α y β elicítina a partir de cultivo estacionario de dos especies del género *Phytophthora*, en XI Seminario Científico del INCA. (Nov. 17-20, La Habana), Resúmenes, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 1998.

DIXON, R, A.; M. J. HARRISON: "Activation structure and organization of genes involved in microbial defense in plant", *Adv. Genet.* 28: 165-234, 1990.

EHEMENDÍA, ANA L. Y G. GONZÁLEZ: "Estudios sobre el empleo de elicitores para la inhibición del virus del mosaico del tabaco en plantas de tomate", *Fitosanidad* 4(1-2): 109-110, 2000.

FALCÓN, A.; DAIMY; COSTALES, J. C. CABRERA, Y M. A. RAMÍREZ: Productos naturales en la protección de los cultivos: quitosana como activador de respuestas defensivas e inductor de resistencia en plantas de tabaco contra patógenos fungos, en XIV Congreso Científico del INCA, (nov. 9-12, La Habana), Memorias, CD-ROM ISBN 959-7023-27-X, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 2004.

GUTIÉRREZ, A.; DALILA PAZ-LAGO; DAISY MORALES; A. ACOSTA Y OTROS: Actividad inmunizante de elicitores fúngicos extraídos de la pared celular de *Phytophthora parasitica* var. *Nicotianae* mediante enzimas industriales con actividad α 1,3 glucanasa en Seminario Científico del INCA, (Nov. 17-20, La Habana), Resúmenes, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 1998.

HEATH, M. C.: "Evolution of resistance to fungal parasitism in natural ecosystems", *New Phytol.* 119: 331-343, 1991.

LÓPEZ, M. O.; A. FERNÁNDEZ Y P. CEREZAL: Desarrollo de un medio de cultivo para *Phytophthora infestans* (Mont) de Bary. INISAV, 1996.

RAMÍREZ, M. A.; G. CABRERA; A. GUTIÉRREZ Y T. RODRÍGUEZ: "Metodología de obtención de quitosana a partir de quitina de langosta". *Cultivos Tropicales* 21(1): 81-84, 2000.