

Cultivo de *Mycosphaerella fijiensis* en medios líquidos para inoculación artificial de plantas de *Musa*

Cultivo de *Mycosphaerella fijiensis* en medios líquidos para inoculación artificial de plantas de *Musa*

Mileidy Cruz-Martín*, Yelenys Alvarado-Capó, Mayra Acosta-Suárez, Berkis Roque, Michel Leiva-Mora.

Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830

E-mail: mileidy@ibp.co.cu

RESUMEN. La evaluación de plantas de *Musa* en invernadero utilizando suspensiones miceliales como inóculo para la selección temprana de genotipos mejorados con resistencia a la Sigatoka negro constituye una valiosa herramienta para garantizar éxitos en los programas de mejoramiento. Sin embargo, lo compacto del crecimiento y el lento desarrollo de los aislados de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en medio de cultivo sólido hacen inadecuado la utilización de estos medios de cultivo para la obtención de inóculos. Teniendo en cuenta este criterio y la necesidad de contar con un medio de cultivo en donde sea abundante y rápido el desarrollo del micelio de *M. fijiensis*, así como, apropiado para la obtención de suspensiones miceliales se realizó este trabajo que tuvo como objetivo evaluar diferentes medios de cultivos líquidos para el crecimiento de *M. fijiensis*. Se utilizaron como inóculo suspensiones miceliales de dos aislados que se inocularon en los diferentes medios de cultivos líquidos (V-8 modificado, Caldo Papa Dextrosa, Extracto de Malta y M1-D modificado). Se le determinó peso seco a los 20 días de incubación así como, por observación visual, el color del micelio, el color del reverso, la textura, la consistencia, y la capacidad de pigmentar el medio de cultivo. Con el empleo de medios de cultivo líquido se obtuvo micelio abundante y textura poco compacta de *M. fijiensis*. En el Extracto de Malta se obtuvieron los mayores valores de peso seco para ambos aislados siendo este medio de cultivo el más favorable para el crecimiento del micelio en *M. fijiensis*.

Palabras clave: Evaluación temprana, mejoramiento genético, *Musa*, Sigatoka negra, suspensiones miceliales.

ABSTRACT. The evaluation of vitroplants of banana and plantain in greenhouse using mycelial suspensions as inoculum for the early selection of genotypes improved with resistance to black Sigatoka constitutes a tool valuable to guarantee greater possibilities of success in the programs of genetic improvement of *Musa* sp. Nevertheless the compact growth and the slow development of the isolated of *Pseudocercopora fijiensis* in the solid culture medium make the use of these culture media inadequate for the obtaining of inoculums for these tests. Considering this criterion and the necessity of having a culture medium where the development of mycelium of *P. fijiensis* is abundant and fast as well as its easy use for the obtaining of mycelial suspensions to be employed as inoculum in the assays of early selection this work was carried out having as objective: to evaluate different liquid culture media for the growing of *Pseudocercospora fijiensis* Morelet.

Key words: Early evaluation, genetic breeding, *Musa*, Black sigatoka, mycelial suspension.

INTRODUCCIÓN

Muchos esfuerzos se han unido durante las últimas décadas para lograr resistencia a la Sigatoka negra en los plátanos de postre y cocción (Novak y Van Duren, 1989; Okole y Schulz, 1997; Roux, *et al.*, 2003, Swennen *et al.*, 2003). El desarrollo de metodologías de selección temprana de cultivares de *Musa* con resistencia a Sigatoka negra es una prioridad de trabajo resaltada por varios autores para garantizar mayores posibilidades de éxito en

los programas de mejoramiento genético de *Musa* sp. (Frison *et al.*, 1997; Romero y Sutton, 1997; Alvarado *et al.*, 2003). Entre estas, se destaca la selección de vitroplantas en casas de cultivo utilizando suspensiones miceliales como inóculo (Leiva *et al.*, 2002). Estos autores, resaltan la factibilidad del empleo de micelio con este fin, por su fácil preparación, la posibilidad de trabajar con una concentración de la suspensión micelial

previamente calculada y ajustada así como el poder prepararlo en cualquier época del año. A diferencia de otros inóculos (fragmentos de hojas enfermas y conidios) solamente se requiere para su preparación de un medio de cultivo en que se desarrolle adecuadamente el micelio.

Varios investigadores han estudiado el crecimiento de aislados de *Mycosphaerella fijiensis* en medios de cultivo sólido (Meredith y Lawrence, 1969; Stover, 1976; Manzo et al., 2001). Estos autores coinciden con la obtención en estos medios de cultivo, de un micelio muy compacto y con un crecimiento extremadamente lento. Otros autores refieren similar comportamiento en diferentes especies de *Mycosphaerella* (Silué et al., 1999).

Lo compacto del crecimiento de *M. fijiensis* y su lento desarrollo en medio de cultivo sólido hacen inadecuado la utilización de estos medios de cultivo para la obtención de inóculos para los ensayos de inoculación. Teniendo en cuenta este criterio y la necesidad de contar con un medio de cultivo en donde sea abundante y rápido el desarrollo del micelio de *M. fijiensis* para ser utilizado como inóculo en los ensayos de selección temprana se realizó este trabajo. Este tuvo como objetivo evaluar diferentes medios de cultivos líquidos para el crecimiento de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet.

MATERIALES Y MÉTODOS

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Aplicada del Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP), perteneciente a la Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas.

Se incluyeron los medios de cultivos líquidos: V-8 modificado (Mourichon et al., 1987), Caldo Papa Dextrosa (PDB), Extracto de Malta (EM) y M1-D modificado (Pinkerton y Strobel, 1976). Para ello se seleccionaron dos aislados perteneciente a la colección de cultivos microbianos del Laboratorio de Microbiología Aplicada del Instituto de Biotecnología de las Plantas, el aislado CCIBP-Pf39 procedentes de la Estación experimental "Pedro Lantigua" de Remedios en la Provincia de Villa Clara y CCIBP-Pf-57 de la Empresa De Cultivos Varios "La Cuba" en Ciego de Ávila. Los mismos fueron aislados a partir de hojas enfermas

con síntomas en estado 6 (según la escala propuesta por Fouré (1982)) del cultivar Grande naine mediante el método de descarga de ascosporas propuestos por Stover (1976).

Se utilizó como inóculo una suspensión micelial (5.10^5 ufc.ml⁻¹) de cada uno de los aislados preparados a partir de cultivos crecidos durante 15 días en medio de cultivo Caldo Papa Dextrosa (PDB). Se inocularon 2.5 ml de suspensión micelial en Erlenmeyers de 500 ml que contenían 100 ml de medio de cultivo. Los mismos fueron mantenidos en cámara climatizada (*Gallenhamp*) a 28 °C, oscuridad constante y condiciones estáticas durante 20 días. Transcurrido este tiempo el micelio se separó del medio de cultivo mediante filtración con filtros de papel (Whatman de 125mm Ø), luego el micelio se desecó en estufa a 60 °C hasta mantener un peso constante y se le calculó el peso seco con el uso de una balanza analítica. Además, se determinó por observación visual el color del micelio, el color del reverso, la textura, la consistencia, y la capacidad de pigmentar el medio de cultivo. Se analizaron cuatro repeticiones por tratamiento.

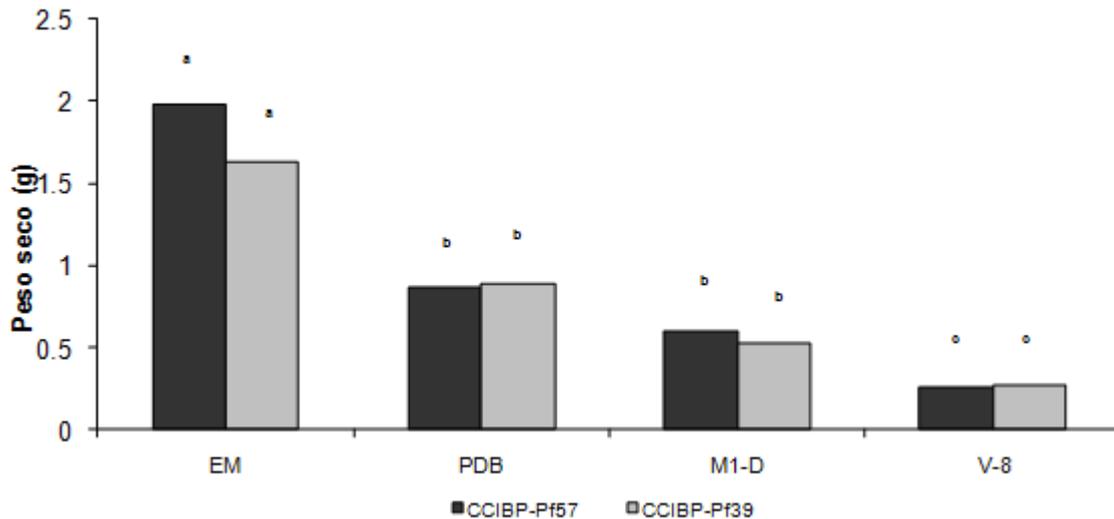
Los datos de la variable peso seco se analizaron por medio de un ANOVA de clasificación simple y las diferencias entre las medias se procesaron a través de la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan, con previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se logró el crecimiento de *M. fijiensis* (CCIBP-Pf 39 y CCIBP-Pf 57) en los medios de cultivo PDB, EM, M1-D y V-8 y el peso seco del micelio varió entre ellos (figura 1).

Estos resultados coincidieron con los referidos por Okole (1995) y Manzo et al. (2001) quienes comprobaron que el crecimiento de este patógeno depende de la composición de nutrientes en el medio de cultivo.

El Extracto de Malta resultó ser el medio de cultivo más favorable para el crecimiento del micelio en *M. fijiensis* ya que fue en él, donde se obtuvieron los mayores valores de peso seco para ambos aislados. Acosta (2004) encontró que, a los siete días de incubación, bajo similares condiciones, el peso seco



EM -Extracto de malta, PDB - Caldo papa dextrosa, M1-D modificado (Pinkerton y Strobel, 1976), V-8 - Caldo V-8 modificado por Mourichon *et al.* (1987)

Figura 1. Peso seco del micelio de los aislados CCIBP-Pf57 y CCIBP-Pf39 de *M. fijiensis* a los 20 días de inoculación en diferentes medios de cultivo

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren estadísticamente según Duncan para $P \leq 0.05$

de *M. fijiensis* en Caldo Extracto de Malta, fue superior al alcanzado en Mycophil, V-8 modificado, Caldo Papa y Dextrosa y Caldo Papa Zanahoria. Dicho autor encontró además, en condiciones de agitación excelentes resultados en la producción de biomasa de este patógeno en este medio de cultivo. Así mismo, Okole (1995), al evaluar cuatro medios de cultivo para la producción de micelio, encontró que en Extracto de Malta se produjo mayor cantidad, este superó a PDA, M1-D y SMGY (glucosa y extracto de levadura). También el Extracto de Malta ha sido referenciado por varios autores como candidato de elección para el desarrollo de micelio en *Colletotrichum acutatum* (Orozco-Santos *et al.*, 2004).

Otros autores refieren al medio de cultivo V-8 como ideal para el crecimiento fúngico. Este ha sido utilizado desde mucho tiempo atrás para diferentes géneros de hongos (Murk *et al.*, 1942; Miller, 1955). Para *M. fijiensis*, en particular, varios autores han obtenido buenos resultados en cuanto al crecimiento micelial en caldo V-8 así como, en la producción de biomasa. Este ha sido un medio de cultivo de referencia para el crecimiento de dicho patógeno (Mourichon *et al.*, 1987; Manzo *et al.*, 2001).

El medio de cultivo V-8 está constituido fundamentalmente por jugos naturales de ocho

verduras, esto trae como desventaja que la composición nutritiva varíe de un productor a otro y de una época a otra. Estas pequeñas variaciones pueden influir en el crecimiento de los microorganismos y provocar falta de repetibilidad en los resultados. No siempre se podrá contar con un medio de cultivo idéntico aún si se mantienen para su producción, determinadas normas de calidad.

Ambos aislados crecieron en la superficie del medio de cultivo con micelio superficial aterciopelado y compacto y micelio sumergido amorfo y de consistencia blanda. La coloración del crecimiento del micelio variaron con los medios de cultivo utilizados y fue independiente del aislado (tabla 1). En todos los medios de cultivo el micelio sumergido fue de color verde olivo oscuro.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Acosta (2004) y Manzo *et al.* (2001) al caracterizar el crecimiento de *M. fijiensis* en varios medios de cultivo donde encontraron diferencias en el hábito de crecimiento y en la coloración.

En ninguno de los medios de cultivos evaluados se detectó pigmentación del medio de cultivo hasta los 20 días de incubación.

Tabla 1. Coloración del micelio de los aislados CCIBP-Pf39 y CCIBP-Pf57 desarrollado en diferentes medios de cultivo a los 20 días de incubación

Aislados	Color del micelio 20 días			
	M1-D	V-8	EM	PDB
CCIBP-Pf39	rosado	rosado	gris-oliváceo	gris
CCIBP-Pf57	rosado	rosado	gris-oliváceo	gris

M1-D- modificado por Pinkerton y Strobel, 1976, V-8 -Caldo V-8 modificado por Mourichon *et al.* (1987), EM -Extracto de malta, PDB -Caldo papa dextrosa

Con el empleo de medios de cultivo líquido para la producción de biomasa de *M. fijiensis* se obtuvo micelio abundante y textura poco compacta. Según Silué *et al.* (1999) el crecimiento de *Mycosphaerella brassicicola* en medio de cultivo líquido le permitió obtener fragmentos de micelio de calidad suficiente para emplearlos como inóculo en ensayos con este patógeno ya que en medios de cultivo sólido se obtenía poco micelio y difícil de homogenizar.

El desarrollo de metodologías de selección temprana de cultivares de *Musa* con resistencia a Sigatoka negra es una prioridad de trabajo resaltada por varios autores para garantizar mayores posibilidades de éxito en los programas de mejoramiento genético de bananos (Frison *et al.*, 1997; Alvarado *et al.*, 2003). Entre estas, se destaca la selección de vitroplantas en casas de cultivo utilizando suspensiones miceliales como inóculo (Leiva *et al.*, 2002). Estos autores, resaltan la factibilidad del empleo de micelio por su fácil preparación, la posibilidad de trabajar con una concentración de la suspensión micelial previamente calculada y ajustada así como el poder prepararlo en cualquier época del año. A diferencia de otros inóculos (fragmentos de hojas enfermas y conidios) solamente se requiere para su preparación de un medio de cultivo en que se desarrolle adecuadamente el micelio.

Conocer que el medio de cultivo sintético Extracto de Malta permite la multiplicación adecuada de *M. fijiensis* (micelio abundante y textura poco compacta), constituye una alternativa para la producción de micelio como inóculo en ensayos de inoculación artificial para la selección temprana de genotipos de *Musa* con resistencia a Sigatoka negra.

BIBLIOGRAFÍA

1. Acosta, M. Evaluación temprana de la respuesta a Sigatoka Negra de genotipos de *Musa* spp. Tesis de Maestría, 2004. pp.57
2. Alvarado Y; Leiva M; Rodríguez M; Acosta M, Cruz M; Portal N; Kosky R; García L, Bermúdez I y Padrón J. Early evaluation of Black leaf streak resistance on *Musa* spp. breeding program by the use of mycelial suspension of *Mycosphaerella fijiensis*. En: Jacome L Lepoivre P; Marín D; Ortiz R; Romero R y Escalant V (eds) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas, present status and outlook. Proceeding of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease held in San José, Costa Rica. 2003: 169-175.
3. Fouré E. Les Cercosporiose du bananier et leur traitement. Comportement des variétés. Etude de la sensibilité variétale des bananiers et plantains a *Mycosphaerella fijiensis* Morelet au Gabon (maladies de raises noires). I Incubation et evolution de la maladie. II Etude de quelques parametres. *Fruits*. 1982. 37 (12): 749-754.
4. Frison E; Orjeda G y Sharrock S(eds.) Proceedings of meeting held in Gosier, Guadalupe. International network for the improvement of banana and plantain. 1997.
5. Leiva M; Dita M; Alvarado C; Acosta M; García L y Bermúdez I. Empleo de diferentes inóculos de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en condiciones de invernadero para evaluar el comportamiento de dos cultivares de banano. INFOMUSA. 2002. 11(2):41-42.
6. Manzo G; Orozco M y Guzmán S. Caracterización morfológica de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

- de la región Pacífico-Centro de México y su desarrollo en medios de cultivo líquidos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2001: 66-71.
7. Miller, P. V-8 juice agar as general-purpose medium for fungi and bacteria. *Phytopathology*. 1955. 45: 461-462.
8. Mourichon X ; Peter D ; Zapater M. Inoculation experimentale de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, sur jeunes plantules de bananier issues de culture *in vitro*. *Fruit*. 1987. 45 (4): 195-198.
9. Murk E; Phaff H y Douglas H. A sporulation stock medium for yeast and other fungi. *Science*. 1942. 96: 432
10. Novak F y Van Duren. Mutagénesis *in vitro* para el mejoramiento genético del banano y el plátano (*Musa* spp.). Informe Mensual 88-89. Panamá. UPEB. 1989: 61-80.
11. Okole B y Schulz F. Selection of *Mycosphaerella fijiensis*- resistant cell lines from micro-cross selection of banana and plantain. *Plant cell Reports*. 1997. Vol. 16: 339-343.
12. Okole B. Selection of banana and plantain (*Musa* spp.) tissue resistant to toxins produced by *Mycosphaerella* species using tissue culture techniques. PhD. Dissertation, Humboldt University, Germany. 1995.
13. Orozco-Santos M; Manzo-Sánchez G; Guzmán-González S; Farías-Larios J; Timmer T. Crecimiento y cambios morfológicos de *Colletotrichum acutatum* Simmonds, agente causal de la Antracnosis del Limón Mexicano (*Citrus aurantifolia* Christm. Swingle) incubado en diferentes medios de cultivo sólidos y líquidos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 2004. 22(3): 423-428.
14. Pinkerton F y Strobel G. Proc of the National Academy of Science, USA. 1976. 74:4007-4011.
15. Romero R y Sutton T. Reacción of tour *Musa* genotypes at three temperaturas to isolates of *Mycosphaerella fijiensis* from different geographical regions. *Plant disease*. 1997: 1139-1142.
16. Roux N; Toloza A; Busogoro J; Panis B; Strosse H; Lepoivre P; Swennen R y Zapata F. Mutagenesis and somaclonal variation to develop new resistance to *Mycosphaerella* leaf spot diseases. En: Jacome L; Lepoivre P; Marín D; Ortiz R; Romero R y Escalant V (eds) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas, present status and outlook. Proceeding of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease held in San José, Costa Rica. 2003: 239-250.
17. Silué D, Launay V y Tirilly Y. Pathogenic variability in *Mycosphaerella brassicola*, the causal agent of the ringspot disease of Crucifers. *J. Phytopathology* .1999.147: 141-147
18. Stover R. Distribution and cultural characteristics of the pathogen causing banana leaf spot. *Tropical Agriculture*. (Trinidad). 1976. 53: 111-114.
19. Swennen R; Arinaitwe G; Cammue B; Francois I; Panis B; Sági L; Santos E; Strosse H y Van Den Houwe I. Transgenic approaches for resitance to *Mycosphaerella* leaf spot disease in *Musa* spp. En: Jacome L; Lepoivre P; Marín D; Ortiz R; Romero R y Escalant V (eds) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas, present status and outlook. Proceeding of the Workshop on *Mycosphaerella* leaf spot disease held in San José, Costa Rica. 2003: 209-238.

Recibido: 18/02/2011

Aceptado: 07/06/2011