

ALGUNAS CONSIDERACIONES SOBRE EL CULTIVO *in vitro* DE *Lecanosticta* ANAMORFO DE *Scirrhia acicola*

ROSA MARIA ALONSO MAGALY PORTAL SANDRA LOPEZ
Y PILAR PEREZ

RESUMEN

Se presentan los resultados obtenidos en el laboratorio para determinar el efecto de **10** medios de cultivo bajo tres condiciones diferentes (oscuridad, luz continua y movimiento-oscuridad continua) durante **17** días de incubación a **28 ± 2°C**.

La evaluación del crecimiento del hongo se realizó mediante dos métodos: medida del crecimiento lineal y peso seco. Este último resultó ser más ventajoso al procesar estadísticamente los datos a través de un análisis de varianza de clasificación doble para un 5 % de significación.

Se recomienda el medio chícharo (*Pisum sativum* Lin.) como el más estimulante para el crecimiento micelial de *Lecanosticta*, estado de *Scirrhia acicola* (Dearn) Siggers.

INTRODUCCION

El incremento de las áreas boscosas, como una exigencia impuesta por el constante desarrollo forestal de Cuba, no solamente con fines de cubrir la necesidad de madera sino también para la protección del suelo y de sus cuencas hidrográficas (Hochmut y Manso, 1975), impone el estudio de las enfermedades fungosas, por cuanto son las de mayor incidencia y afectación.

Así se aprecia como el hongo Lecanosticta, estado de Scirrhia acicola (Dearn) Siggers se ha reconocido nacional e internacionalmente como un patógeno virulento de Pinus spp. (Nicholls y Hudler, 1972; Phelps et al., 1978; Delgado et al., 1985).

Por la importancia que revisten las investigaciones de este patógeno fungoso y dadas las afectaciones evaluadas en las especies de pino en Cuba, debido a la caída del follaje, su incidencia en el crecimiento y desarrollo de las plantas, se hace necesario un control más efectivo tanto a corto como a largo plazos, por lo que la obtención de individuos tolerantes o resistentes a dicha enfermedad resulta de gran importancia para reducir en el futuro las pérdidas actuales. Para lograr esto se inicia, con el objetivo de este trabajo, la acumulación de información necesaria, tratando de determinar bajo qué condiciones de laboratorio tiene mejor crecimiento micelial el hongo L. acicola, con vistas a determinar en trabajos futuros el momento óptimo de concentración proteica e iniciar los estudios comparativos de proteínas de Pinus spp. y L. acicola, estimando así individuos con caracteres tolerantes o resistentes ante el mencionado patógeno fungoso desde el punto de vista bioquímico.

MATERIALES Y METODOS

En la localidad de El Winche, Pinares de Mayarí, provincia de Holguín, en árboles de Pinus caribaea Morelet de tres años de edad, se efectuó un muestreo al azar para localizar plantas con necrosis total y parcial del follaje, de color pardo a pardo rojizo, y fructificaciones de L. acicola, que hacían un total de 50 plantas en general.

Las muestras recogidas se llevaron al laboratorio, donde fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 1 % y dos pases sucesivos de agua destilada estéril. Bajo el estéreo se localizaron los cuerpos fructíferos (acérvulos) maduros, a partir de los cuales se aisló el hongo en un medio basal agarizado de papa dextrosa (PDA) o de chícharo (Pisum sativum Lin.).

Del crecimiento inicial se obtuvieron discos miceliales de 0,4 mm, los cuales fueron transferidos a los 10 medios sólidos

Medios de cultivo			Medios de cultivo		
Composición			Composición		
Cantidad			Cantidad		
Zanahoria	Zanahorias	100 g	Crecimiento	Bacto agar	40 g
	Azúcar de caña	20 g		Maltosa	5 g
	Agua destilada	1 000 mL		Dextrosa	2 g
Papa	Glucosa	20 g		Glicerina	2 g
	Papa	400 g		Peptona	0,2 g
	Agua destilada	1 000 mL		Asparagina	0,2 g
Zanahoria-papa	Zanahorias	100 g		Extracto levadura	2 g
	Papa	400 g		Sulfato magnésico	0,5 g
	Glucosa	15 g		Nitrato de sodio	0,5 g
	Agua destilada	1 000 mL		Fosfato de potasio	0,5 g
Solución Czapek (mod.)	Nitrato sódico	2-3 g		Dibásico	0,5 g
	Cloruro potásico	0,5 g		Sulfato ferroso	1 000 mg trazas
	Sulfato magnésico	0,5 g		Agua destilada	1 000 mL
	Sulfato ferroso	0,01 g		Peptona	10 g
	Fosfato potásico	1 g		Glucosa	20 g
	Malta	25 g		Cloruro de sodio	7,5 g
	Azúcar de caña	15 g		Extracto de carne	3,5 g
	Agua destilada	1 000 mL		Agua destilada	1 000 mL
	Crema de arroz	20 g	Agujas de pino	Agujas de pino verdes	500 g
	Tween 80	1 mL	Zanahoria	Dextrosa o glucosa	10 g
	Agua destilada	1 000 mL		Zanahorias	100 g
Arroz	Chicharos secos	400 g		Agua destilada	1 000 mL
	Glucosa	16 g			
	Agua destilada	1 000 mL			
Chicharo	Chicharos secos	400 g			
	Glucosa	16 g			
	Agua destilada	1 000 mL			
Glucosa	Glucosa	16 g			
	Agua destilada	1 000 mL			

Para el caso de los medios sólidos se utilizaron de 15 - 20 g de agar-agar.

(en placas de 10 cm x 10 cm) y líquidos (en erlenmeyers de 300 mL), relacionados en el Anexo 1.

La evaluación del crecimiento micelial entre los distintos medios de cultivo ensayados se estudió mediante dos métodos: medida del crecimiento lineal y peso seco.

El crecimiento lineal fue evaluado individualmente por placa, midiendo en el sentido de las "X" el diámetro de la colonia. Posteriormente ambos resultados se promediaron por placa para obtener un único valor.

Los aislamientos en placas (60) fueron incubados a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y oscuridad continua.

Para evaluar por el método de peso seco, se tomó el crecimiento de cada erlenmeyer, filtrando la torta micelial por un embudo Euchner al vacío. Se tomaron papeles de filtro individuales (previamente tarados) con la muestra y se pusieron en una estufa (Mettler H 18) a $90 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 24 horas; se pesaron en balanza analítica (Mettler H 18) y se repitió este proceso de pesaje y estufa cada 24 horas, hasta que no hubo variación en las pesadas.

Los 30 erlenmeyers inoculados fueron repartidos a Partes iguales en tres condiciones diferentes: oscuridad continua, luz fluorescente continua y movimiento-oscuridad continua durante 20 días e incubados a $20 \pm 2^\circ\text{C}$.

Se hicieron observaciones fenológicas de las colonias y se procesaron estadísticamente ambos resultados mediante un diseño bifactorial completamente al azar para un nivel de significación del 5 %, según Lerch (1977).

RESULTADOS Y DISCUSION

La Tabla 1 y la Figura 1 muestran los caracteres fenológicos observados para las colonias obtenidas en los distintos medios ensayados después de 20 días de cultivo a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ y oscuridad continua.

Como se puede observar, los mismos difieren en algunos casos a pesar de proceder el inbculo de una misma cepa monosébrica, por lo que este resultado está dado por las condiciones brindadas por los distintos medios de cultivo donde han variado las fuentes de carbono, nitrógeno, macroelementos y microelementos.

Al comparar las medidas de crecimiento micelial por los dos métodos utilizados, los medios con mejor crecimiento micelial no coinciden para ambos casos. En la Tabla 2 se presentan los resultados medidos por crecimiento lineal, siendo el medio X el de mejor crecimiento, aunque no difiere significativamente de los medios I, III, VIII, VII y IV. El medio IX resultó ser el menos estimulante para el crecimiento micelial, aunque no difiere significativamente con los medios VI y II.

TABLA 1. Caracteres fenológicos de los aislamientos de Lecanosticta acicola después de 20 días de cultivo en los diferentes medios agarizados ensavados.

Medios de cultivo	Caracteres morfológicos			
	Estructura	Color de la colonia		Presencia de fructificaciones
		Centro	Bordes	
I (zanahoria)	Foco algodonosa, compacta, en grumos, formando estrías radiales	Gris oscuro	Gris claro	Abundantes en el centro de la colonia
II (papa)	Poco algodonosa, compacta, en grumos, formando estrías radiales	Gris oscuro	Grisa rosado en partes	Abundantes en la superficie de toda la colonia
III (zanahoria papa)	Poco algodonosa, compacta, en grumos, formando estrías radiales	Gris claro a oscuro	Rosados	Abundantes en la superficie de toda la colonia
IV (Czapek)	Compacta, sin grumos ni estrías	Blanco	Blanco a rosado	Escasas a ninguna
V (crecimiento vegetativo)	Compacta	Gris oscuro	Blanco	Escasez en el centro de la colonia
VI (arroz)	Compacta	Gris oscuro	Blanco	Escasez en el centro de la colonia
VII (Sabouraud glucosa)	Compacta formando estrías radiales	Gris claro a rosado	Gris claro a rosado	Abundantes en toda la superficie de toda la colonia
VIII (chicharo)	Compacta formando estrías radiales	Gris oscuro casi negro	Rosado a gris claro y crema	Sólo en el centro de la colonia
IX (glucosa)	Compacta en grumos, sin estrías radiales	Gris oscuro	Gris claro	Abundantes en la superficie de la colonia
X (pino zanahoria)	Compacta en grumos, sin estrías radiales	Gris claro	Gris claro	Escasas

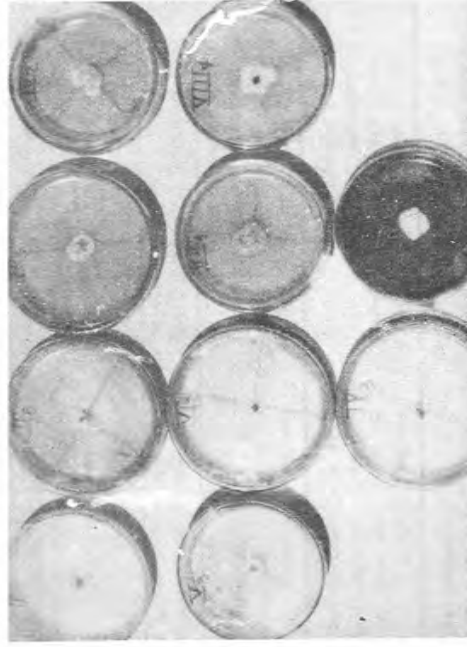


FIGURA 1. Colonias de Lecanostictia, estado de Scirrhia acicola (Deary) Siggers en los 10 medios de cultivo ensayados (Anexo 1).

TABLA 2. Comparación de medias del crecimiento micelial lineal obtenidas en los diferentes medios ensayados a los 20 días de cultivo in vitro (0,05).

Medios de cultivo	Medias
X	1,96
I	1,91
III	1,85
VIII	1,81
VII	1,69
IV	1,64
V	1,51
II	1,33
VI	1,30
IX	1,00

ES $\bar{x}$ = 0,333 9

Al analizar los resultados de la Tabla 3 el medio VIII resultó ser el más estimulante para el crecimiento micelial; se hallaron diferencias significativas con respecto a los medios IV, III, II, X y VII.

Sin embargo, el resultado obtenido con el método de peso seco sobre el medio de cultivo menos estimulante al crecimiento micelial de Lecanosticta acicola sí coincidió con el método lineal (medio IX). En todos los medios los aislamientos rindieron un crecimiento medible, en las Figuras 2a y 2b se presentan de forma comparativa las colonias de mayor y menor crecimiento, respectivamente, a partir de los resultados de la Tabla 2.

En la Figura 3 se representaron gráficamente las curvas de crecimiento registradas en los cultivos de placas para el medio X (más estimulante) y el IX (menos estimulante); se observa un desarrollo sinuoso que denota la variación del crecimiento del hongo estudiado.

La Figura 4 muestra colonias de L. acicola en medio líquido (IV y I) como representación del crecimiento más y menos estimulado. Por otra parte, también es de señalar que al analizar la interacción medios-condiciones (oscuridad, movimiento y luz) no hay diferencia significativa en la comparación de las medias, por lo que ambos factores son independientes.

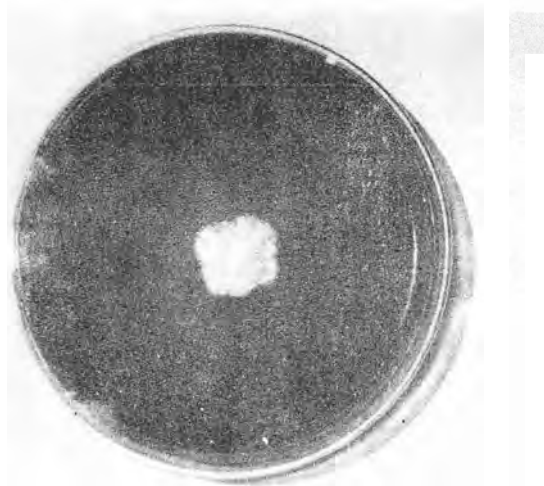


FIGURA 2a. Mejor resultado de crecimiento micelial de L. acicola en medio agarizado (X) evaluado por el método lineal.

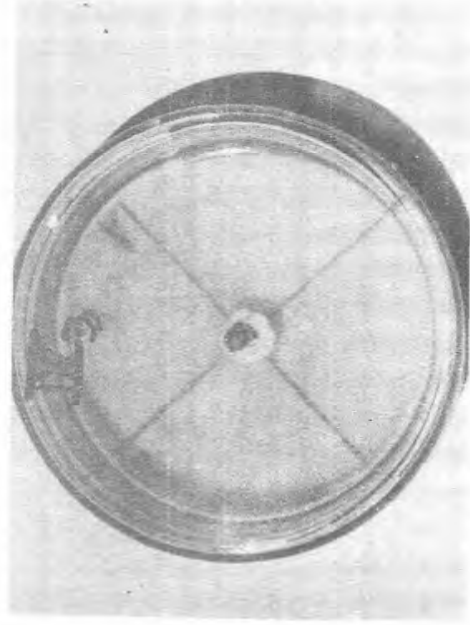


FIGURA 2b. Crecimiento de L. acicola en medio agarizado (IX) menos estimulante evaluado por el método lineal.

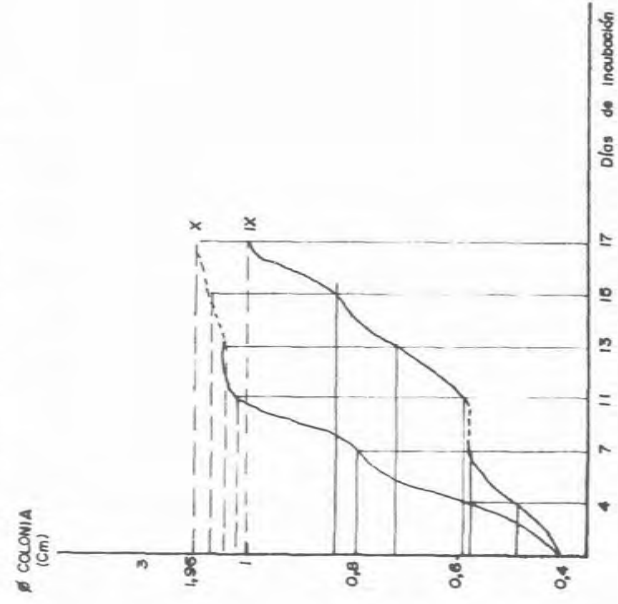


FIGURA 3. Curvas de crecimiento máximo y mínimo de Lecanosticta, estado de Scirrhia acicola en los medios de cultivo X y IX, respectivamente.



FIGURA 4. Crecimiento de L. acicola en medios líquidos más y menos estimuladores, respectivamente.

TABLA 3. Comparación de medias del crecimiento micelial por unidad de masa (peso seco) obtenidas en los diferentes medios ensayados a los 20 días de cultivo in vitro (F 0,05).

Medios de cultivo	Medias	
VIII	0,965	I
IV	0,767	
III	0,675	
II	0,642	
X	0,607	
VII	0,603	
V	0,554	
VI	0,533	
I	0,487	
IX	0,483	
ES $\frac{s}{x} = 0,060$		

Según la literatura consultada, Delgado y Clivera (1984) recomiendan el medio líquido al 2 % como el más adecuado para la germinación conidial de L. acicola, mientras que Gómez et al. (1986) obtuvieron un buen crecimiento en medio zanahoria-agar.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el presente trabajo y teniendo en cuenta los dos métodos ensayados para la medida del crecimiento micelial, se considera el método de peso seco como más confiable, pues da una medida del crecimiento por unidad de masa que incluye tanto el crecimiento lineal como el aéreo de la colonia, resultado este no medible con el método lineal. Por todo lo expuesto se sugieren los medios VIII (chicharo) y IV (Czapek modificado) como los más favorables para obtener abundante crecimiento micelial de L. acicola con escasa a ninguna presencia de fructificaciones fértiles según la Tabla 1.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El mejor medio de cultivo según el método de peso seco fue el VIII (chícharo), por lo que se recomienda para la obtención de micelio abundante de L. acicola utilizable en trabajos fisiopatológicos.

También se recomiendan los medios IV, III, II, X y VI (en orden decreciente) para la obtención de micelio de L. acicola.

ABSTRACT

OBSERVATIONS ON IN VITRO CULTURE OF Lecanosticta acicola ANAMORPHOUS. CF Scirrhia acicola

Results obtained under laboratory conditions to determine the effect of 10 culture media under three different conditions (darkness, constant light and shaking-constant darkness) during 17 days of incubation at $20 \pm 2^\circ\text{C}$, are given.

Fungus growth was evaluated with the methods: lineal growth measure and dry weight. The best was the best when data were evaluated statistically by analysis of variance with double classification, obtaining 5 % of significance.

Medium with Pisum sativum Lin. is recommended as stimulant of mycelium growth of Lecanosticta, a stage of Scirrhia acicola (Dearn) Siggers.

BIBLIOGRAFIA

- DELGADO, A., E. ECHEVARRIA, M. MORALES y EMILIA ALFONSO. Consideraciones sobre las medidas fitosanitarias aplicadas en una campaña contra la enfermedad "mancha parda" Lecanosticta acicola en pino, Revista Forestal Baracoa 15 (2): 65-84, 1985.
- DELGADO, A. y CECILIA OLIVERA. Efecto de diferentes medios de cultivo líquidos, pH y fungicidas sobre la germinación de

Lecanosticta acicola (Thüm) Syd, en condiciones de laboratorio. La Habana, 1984. (Inédito.).

GCMEZ, GUADALUPE, A. DELGADO y ANA FERNANDEZ. Aislamiento y caracterización de Lecanosticta acicola, causante de la mancha parda en acículas de pino en Cuba. Cienc. Téc. Agric., Protección de Plantas, 9 (2): 29-50, 1986.

HOCHMUT, R. y D.M. MANSO. Protección contra plagas forestales en Cuba. -- La Habana: Ed. Orbe, 1975. -- 290 p.

LERCH, G. La experimentación en las Ciencias Biológicas y Agrícolas. -- La Habana: Ed. Científico-Técnica, 1977. -- 422 p.

NICHOLLS, T.M. and G.W. HUDLER. Red pine: A new host for brown spot (Scirrhia acicola). Plant Dis. Rep. 56 (8): 712-713, 1972.

PHELPS, W.R., A.G. KAIS and T.H. NICHOLLS. Brown spot needle blight in pines. For. Insects Dis. Leaflet. USDA 44: 1-8, 1978.

Manuscrito recibido para su publicación 23 de febrero de 1989