

COMPARACION MORFOLOGICA IN VITRO DE *Cercospora caribaea* Ciferri & Chupp Y *C. henningsii* Allescher EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO

*Morphological comparison in vitro of Cercospora caribaea Ciferri & Chupp and
C. henningsii Allescher in different culture media*

Marilene da Silva Cavalcanti
Francisco Cordeiro Neto
María Auxiliadora de Quieroz Cavalcanti

Departamento de Micología
do Centro de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Pernambuco
Brazil

Palabras Clave : *Cercospora caribaea*, *C. henningsii*, comparación morfológica, cultivos,
Key words: *Cercospora caribaea*, *C. henningsii*, morphological comparison, cultures

RESUMEN

Se comparó el desarrollo de cultivos de *Cercospora caribaea* y *C. henningsii* en 8 diferentes medios, incubados a 22 °C durante 20 días, para verificar su influencia sobre el crecimiento radial de ambas especies. Posteriormente se estableció una curva de crecimiento basada en el peso seco de la masa micelial de estos hongos, en el medio que expresó el mayor diámetro de las colonias. Las colonias de *C. caribaea*, lo alcanzaron (19mm), en el medio de agar extracto de hoja de mandioca adicionado de extracto vitaminizado Piam, mientras las colonias de *C. henningsii*, lo obtuvieron (12mm), en el medio agar extracto de hoja de mandioca adicionado de extracto de malta compuesto. El peso seco de la masa micelial de ambas especies obtenida en medio líquido (extracto de hoja de mandioca adicionado con extracto de malta compuesto), demostró después de un período lag de 3 días, un crecimiento exponencial hasta el día 12 y una fase de desaceleración hasta el último día de observación (día 36). No se observó en el período de tiempo de estudio, la fase estacionaria.

INTRODUCCION

La cercosporiosis de la mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), ocasionada por especies de *Cercospora*, produce la disminución del área fotosintética de la planta, ocasionando la caída de la producción, como es el caso de la mancha parda causada por *Cercospora henningsii* Allescher, en las hojas

SUMMARY

The development of *Cercospora caribaea* and *C. henningsii*, incubated at 22 °C for 20 days in 8 different media was compared in order to confirm their influence on the radial growth of both species. Then a growth curve based on the dry weight of the micelial mass of these fungi was derived in the media showing the greatest diameter of the colonies. *C. caribaea* reached that level (19mm) in the yucca leaf extract agar media, added with Piam vitaminized extract, whereas *C. henningsii* got their maximum in the yucca leaf extract agar media added with compound malt extract. The dry weight of the micelial mass of both species obtained in a liquid media (yucca leaf extract added with compound malt extract) revealed after a 3 day lag period, an exponential growth until day 12 and a deceleration stage until the last examination day (day 36). A stationary stage was not observed throughout the period of study.

más viejas y el de las manchas blancas, producida por *Cercospora caribaea* Ciferri & Chupp, que aparece incluso en hojas nuevas (Galli et al., 1980).

Algunos trabajos sobre aislamiento de *Cercospora*, fueron realizados en Brasil y en el exterior, principalmente en relación a la capacidad de esporulación de determinadas especies en medios de cultivo específicos (Nagel, 1934; El Gholl et al., 1982; Ekpo & Esuruoso, 1978; Rawla et al., 1976;

Asmus & Dhingra, 1983 y Del Peloso et al., 1989).

La producción abundante de los conidios viables en medios de cultivo es un requisito básico para realizar trabajos de mejoramiento genético. En tanto, las especies de *Cercospora* se caracterizan por tener un crecimiento lento, escasa esporulación e incluso su ausencia en medios de cultivo artificiales (Nagel, 1934).

Este trabajo tiene por objetivo determinar el crecimiento radial final in vitro en diferentes medios de cultivo de estas 2 especies y establecer posteriormente una curva de crecimiento basada en el peso seco de la masa micelial de estos hongos, en aquel medio que exprese el mejor diámetro de las colonias en un tiempo definido.

MATERIALES Y METODOS

Los conidios de *C. caribaea* y *C. henningsii*, fueron aislados según la metodología descrita por Silva et al., 1988 y luego sembrados en los siguientes medios de cultivo en triplicado:

a) Extracto de malta compuesto (EMC), preparado con extracto de malta vitaminizado 25g, glucosa 20g, peptona de carne 1g, agar-agar 15g y agua destilada q.s.p. 1000ml.

b) Extracto de hoja de mandioca-agar (EHMA), preparado con extracto de hoja de mandioca 400ml, agar-agar 15g y agua destilada q.s.p. 1000ml.

c) Extracto de hoja de mandioca-agar + EMC (EHMA+EMC), preparado con EMC y adicionado con EHMA.

d) Extracto de hoja de mandioca-agar + biotina (EHMA+ BIOTI-NA), preparado con EHMA y adicionado con 20 UI. de biotina.

e) Extracto de hoja de mandioca-agar + biotina + EMC (EHMA+BIOTINA + EMC), preparado con EHMA más biotina y adicionado con EMC.

f) Extracto de hoja de mandioca-agar + tiamina (EHMA+TIAMINA), se agregó al EHMA 30 UI. de tiamina.

g) Extracto de hoja de mandioca-agar + tiamina + EMC (EHMA+TIAMINA+ EMC), al EHMA más tiamina se agregó EMC.

h) Extracto de hoja de mandioca-agar + extracto vitaminizado Piam (EHMA+EVP), preparado con EHMA y adicionado con 25g de extracto de malta vitaminizado, agua destilada q.s.p. 1000 ml.

Todos los medios fueron esterilizados en autoclave a 120°C, por 20 minutos, a 1 atm de presión y con ajuste de pH final de 5,5. Cuando hubo necesidad de adicionar las vitaminas (biotina y tiamina, previamente esterilizadas en filtro Seitz nº5115 -C₃), se esperó que la temperatura del medio bajara hasta aproximadamente 40°C y se agregó las soluciones de las vitaminas.

Los diámetros de las colonias fueron medidos en mm a los 20 días de incubación. Se determinó también la curva del crecimiento de *C. caribaea* y *C. henningsii*, utilizando colonias de estos fitopatógenos incubadas durante 7 días, en EHMA+EMC, a 20 - 22°C. Las colonias se removieron y se llevaron a una solución (50ml) de Tween 80 a 0,01%,

esterilizado en autoclave durante 20 minutos a 120°C y luego se maceraron en un mortero en condiciones asépticas, durante 5 minutos. Alicuotas de 1 ml de esas suspensiones fueron transferidas a 36 frascos de Erlenmeyer de 150 ml, conteniendo cada uno 50 ml de EHM+EMC, siendo incubadas a 21°C durante 36 días en cultivos estacionarios. Después de 3 días de la incubación y, cada 72 horas, 3 frascos de Erlenmeyer fueron retirados al azar y la masa micelial separada del medio por filtración en papel filtro (Frama, Sao Paulo, Brasil) y pesado en una balanza de precisión Mettler, mod. H6.

Después de la filtración, el papel filtro con la masa micelial, se secó en una estufa Fanem mod. 306/3, regulada a 80°C, hasta un peso constante. De todas las determinaciones del peso seco de la masa micelial, se calculó el peso correspondiente a 1 ml del inóculo.

Para la determinación del peso seco de los inóculos, fue utilizada la misma suspensión de conidios empleados para las inoculaciones en los medios de cultivo contenidos en los frascos de Erlenmeyer. De esos frascos fueron retirados 6 alicuotas de 1ml y filtrados en papel filtro de peso conocido y, en seguida, el papel filtro y los inóculos fueron colocados en una estufa a 80°C hasta alcanzar un peso constante, determinándose la media del peso seco de cada inóculo.

RESULTADOS Y DISCUSION

Después de 20 días de la incubación, las colonias de *C. caribaea* y *C. henningsii* incubadas a 22°C, presentaron diferentes diámetros en los medios de cultivo empleados (Tabla 1). La media del diámetro mínimo de la colonia de *C. caribaea* fue de 9,0mm en el medio EHMA+ TIAMINA+EMC, mientras que el diámetro de la colonia de *C. henningsii* en el mismo medio, fue de 6,0mm. El diámetro máximo alcanzado por *C. caribaea*, fue de 19 mm en el medio EHMA+EVP, mientras que en *C. henningsii*, alcanzó los de 12 mm, en el medio EHMA+EMC. Los diámetros de las colonias de *C. caribaea* fueron mayores en todos los medios empleados al compararlas con las de *C. henningsii*. Nuestros resultados obtenidos con el cultivo de *C. henningsii* concuerdan en el tiempo con los encontrados por Matos (1976), al cultivar la misma especie en el medio EHMA+TIAMINA y con el mismo pH, durante 7 días, obteniendo un crecimiento cercano a los 4,0mm. Quedó demostrado que ambas especies pueden ser cultivadas en medios con agar, constituídos básicamente de decocciones de hojas de mandioca, con o sin factores de crecimiento, tales como biotina y tiamina. Resultados semejantes fueron obtenidos en otras especies de *Cercospora* con decocciones de hojas de otros hospedadores (Rangaswami & Chandrasekaran, 1962; Berger & Hanson, 1963; Stavely & Nimmo, 1968; Jandaik & Kapoor, 1972; Loch et al., 1975; Rawla et al., 1976; Chahal et al., 1976; Asmus & Dhingra, 1983 y Del Peloso et al., 1989). La adición de vitaminas a los medios con hojas de mandioca y otros factores de crecimiento contenidos en el EMC, favorecen el crecimiento micelial, en desmedro de la esporulación.

Tabla 1.

Medias del diámetro de las colonias de *C. caribaea* y *C. henningsii* con 20 días de cultivo a 22°C, en los diferentes medios de cultivo en triplicado

Medios de cultivo	Medias del diam. de las colonias en mm.	
	<i>C. caribaea</i>	<i>C. henningsii</i>
EHMA	14	8
EHMA+Biotina	13	8
EHMA+Biotina+EMC	17	10
EHMA+Tiamina	18	8
EHMA+Tiamina+EMC	9	6
EHMA+EVP	19	10
EHMA+EMC	16	12
EMC	18	8

Resultados semejantes fueron relatados por Del Peloso et al., 1989, cuando agregó a los medios de cultivo el complejo vitamínico Panvit. La interacción de tiamina y del extracto de malta compuesto adicionado al EHMA, inhibió tanto la esporulación como el crecimiento radial. El desarrollo de *C. caribaea* y *C. henningsii* en el medio líquido EHM+EMC, a la temperatura de 22°C, empleado en la determinación del peso seco de la masa micelial recojida cada tres días, dejó en

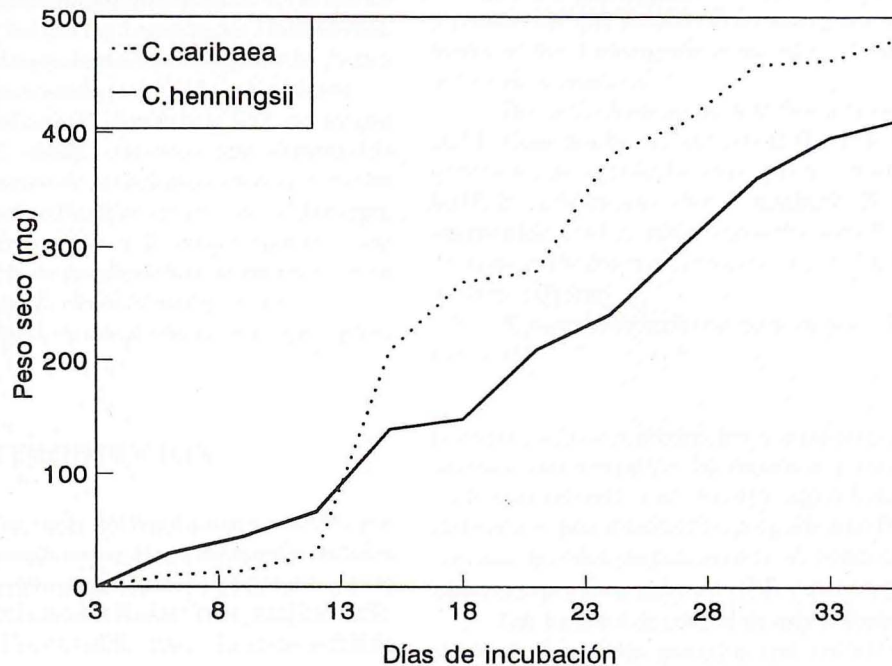
Tabla 2.

Peso seco de la masa micelial de *C. caribaea* y *C. henningsii* en el medio líquido EHM+EMC a 22°C

Edad (Días)	Peso seco (mg)	
	<i>C. caribaea</i>	<i>C. henningsii</i>
3	0	0
6	10	29
9	14	44
12	29	66
15	208	139
18	269	148
21	279	209
24	380	240
27	408	302
30	458	360
33	462	395
36	482	411

Los resultados son las medias de 3 repeticiones.

evidencia que después de una fase *lag* de 3 días, se inició la fase exponencial del crecimiento hasta 12 días y una fase de desaceleración lenta hasta el último día de observación (día 36) (Tabla 2 y Fig.1). Durante ese período no se observó la fase estacionaria característica del agotamiento del medio. Tal situación sugiere que, hasta el último día, el medio de cultivo aún contenía considerables cantidades de nutrientes que permitieron el crecimiento de ambas especies.

Fig.1 Crecimiento de *C. caribaea* y *C. henningsii* en medio líquido EHM+EMC a 22°C.

REFERENCIAS

- Asmus, G.L. & Dhingra, O.D. (1983). Isolation, cultivation and sporulation of *Cercospora vanderystii*. Fitopatologia Brasileira, 8:305-310
- Berger, R.D. & Hanson, E.W. (1963). Relation of environmental factors to growth and sporulation of *Cercospora zebrina*. Phytopathology 53:286-293
- Chahal, S.S. & Rawl, G.S. (1976). Requirement of scandium for the growth of *Cercospora granati*. Indian Phytopathology 29:104-105
- Del Peloso, M.C.; Fernandes, C.D.; Figueiras, A.T. & Chaves, G.M. (1989). Esporulação de *Cercospora coffeicola* em diferentes meios de cultura. Fitopatologia Brasileira 14:41-44
- Ekpo, E.J.A. & Esuruoso, O.F. (1978). Growth and sporulation of *Cercospora cruenta* and *Cercospora canescens* in culture. Canadian Journal of Botany 56:229-233.
- El-Gholl, N.E.; Alfieri, Jr. S.A.; Ridings, W.H. & Schoulties, C.L. (1982). Growth and sporulation in vitro of *Cercospora apii*, *Cercospora aracchidicola*, *Cercospora kikuchii*, and other species of *Cercospora*. Canadian Journal of Botany 60:862-868
- Galli, F. et al. (1980). Manual de Fitopatologia; doenças das plantas cultivadas. Sao Paulo, Agronômica. Ceres, Vol. 2.
- Jandiak, C.L. & Kapoor, J.N. (1972). Studies on vitamin requirements of *Cercospora cruenta*. Indian Phytopathology 25:563-565
- Loch, L.C.; Carvalho, M.G.; Oliveira, L.M. (1975). Esporulação de *Cercospora capsici* em meio de cultura. Experimental 19:259-266
- Matos, A. P. (1976). Esporulação de *Cercospora henningsii* Allesch, em função de fatores físicos e nutricionais. 39 pp. (Tese Maestrado Universidade Federal de Vicosa)
- Nagel, C.M. (1934). Conidial production in species of *Cercospora* in pure culture. Phytopathology 24:1101-1109
- Rangaswami, G. & Chandrasekaran, S. (1962). *Cercospora* species on Cucurbitaceous host in south India. II Physiology and Pathogenicity of four isolates. Mycologia 54:331-341
- Rawla, G.S.; Chahal, S.S.; Singh, T. (1976). Organic growth factor requirements of *Pseudocercospora vitis* (Lev) Speg. and *Cercospora mitteerina* Syd. Proceedings Indian Academy of Sciences 83:232-236
- Silva, M.F.; Cavalcanti, M.A.Q.; Poroca, D.M. & Lima, D.M. (1988). Cultivo e esporulação de *Cercospora caribaea* e *Cercospora heningsii*, agentes causais de manchas foliares em mandioca. Fitopatologia Brasileira 13: 54-58
- Stavelly, J.R. & Nimmo, J.A. (1968). Relation of pH and nutrition to growth and sporulation of *Cercospora nicotianae*. Phytopathology 58:1372-1376