

**TITULO: Mycosphaerella fijiensis y musicola : Comportamiento en medio
líquido V-8
(*Mycosphaerella fijiensis and musicola* : Performance in liquid V-8
medium)**

Yulimar Castro, Armando Briceño y Maria Elena García*

Universidad de los Andes. Facultad de Ciencias. Centro de Ingeniería Genética

–CIGEN – Mérida. Venezuela

*

Dirección: Aptdo. Postal No. 37. Zona 5101. LA HECHICERA. Mérida.
Venezuela. Tel.: 58 274 2664642. FAX: 58 274 2401286. E-mail:
malena98@telcel.net.ve

RESUMEN

Mycosphaerella fijiensis y *M. musicola*, son organismos patógenos en plantaciones de banana y plátano, causantes de las enfermedades denominadas Sigatoka negra y amarilla, respectivamente. En el laboratorio, estos hongos han sido cultivados en medios sólidos usuales para estos organismos: usando agar como base sólida y diferentes mezclas de papa, zanahoria, dextrosa o preparados comerciales. El cultivo en medio líquido resulta ventajoso a la hora de obtener cantidades relativamente grandes de micelio para purificación de proteínas o ácidos nucleicos propios del organismo. En este trabajo se presenta un estudio comparativo del crecimiento de *Mycosphaerella* en medio sólido (agar micofílico) y líquido (con V-8).

En el medio líquido V8, el crecimiento óptimo de *Mycosphaerella fijiensis* toma entre 10 y 11 días, mientras que las colonias crecidas en medio sólido alcanzan su máximo crecimiento, aproximadamente 1,0 a 1,5 cm de diámetro, en 16 días. Una comparación de los pesos de micelio obtenido en ambos medios muestra que el V-8 produce dos veces más cantidad que el medio sólido. El periodo de latencia del micelio en medio sólido resulta menor, cuando éste proviene de micelio preservado en agua estéril, probablemente debido a que el material conservado procede de un cultivo en V-8. La purificación de ADN genómico a partir de micelio crecido en medio V-8 resultó ser de un alto rendimiento. Igualmente el medio V-8 provee una mayor garantía de preservación para el mantenimiento de colecciones de aislados, por largo tiempo.

Palabras clave: crecimiento, rendimiento, *Mycosphaerella*, V-8, preservación

ABSTRACT

Mycosphaerella fijiensis and *M. musicola*, are pathogenic organisms for banana and plantain plantations, which cause a disease called Yellow and Black SigatoKa respectively. In the laboratory these fungi are grown in the usual solid medium for such organisms, with an agar base and mixtures containing potato, carrot, dextrose and commercially available preparations. Liquid cultures are very useful when it comes to yielding large amounts of mycelia for protein, nucleic acid or else purification. In this paper we present a comparative study of *Miyosphaerella* growth in micophyll agar solid medium and liquid V-8 medium. The last one gives optimum yield of mycelium after ten or eleven days, while the same takes 16 days when growth is in micophyll agar. Comparing mycelia by weight there is twice as much mycelium in V-8 medium. There is also a shorter latent period when material has grown once in V-8 medium. DNA purification from these cultures yields good and highly concentrated preparations. It also provides a good, trusty medium for long term preservation of isolates.

Key words: growth, yielding, *Mycosphaerella*, V-8, long-term storage

INTRODUCCION

Los hongos son cada vez más utilizados en la industria, sobre todo en biotecnología. También son causantes de patologías en muchas plantaciones, por lo que su estudio es crucial para la protección de las mismas y muchas veces como agentes para el control de plagas. Es así como su estudio se convierte en un área prioritaria de investigación.

Mycosphaerella fijiensis y *M. musicola*, son organismos patógenos en plantaciones de banana y plátano, causantes de las enfermedades denominadas Sigatoka negra y amarilla, respectivamente (Fullerton 1994).

La enfermedad se desarrolla rápidamente en condiciones climáticas de alta humedad (>80%), temperaturas superiores a los 27 °C, y vientos predominantes (Martínez, 1997).

El estudio del hongo requiere obtener cultivos en óptimas condiciones de crecimiento y en el menor tiempo posible. Los requerimientos para el crecimiento de estos microorganismos varían de acuerdo con la especie o el género (Smith, and Agnes, 1983). En el laboratorio, este hongo ha sido cultivado en los medios sólidos usuales para estos organismos (Smith, and Agnes, 1983) usando agar como base sólida y diferentes mezclas de nutrientes como: i. papa , zanahoria y Agar (PZA), ii. papa-dextrosa o iii. agar micofílico obtenido comercialmente y preparado a base de: harina de soja digerida por enzimas, dextrosa y agar.

Estos medios producen resultados mas o menos similares y el uso preferencial de uno u otro depende de la disponibilidad de tiempo y de dinero del laboratorio.

Para cultivos en medio líquido se ha usado una variedad de fórmulas cuya base es el tomate o la leche (The HiMedia Manual, 1998). En el caso de *Micosphaerella*, el mejor crecimiento se ha obtenido en medios conteniendo tomate y mucho mejor cuando el tomate proviene del producto comercial llamado V-8 (Carlier, 1994) (marca comercial de jugo de vegetales, compuesto mayormente de tomate, obtenible en los supermercados). El cultivo en medio líquido resulta ser el más conveniente para la obtención de proteínas o ácidos nucleicos, en cantidades suficientes para estudios bioquímicos y/o genéticos (Gómez, et. al., 1992).

No se ha realizado un estudio del comportamiento específico de *Mycosphaerella* en los medios de crecimiento para hongos. Este trabajo se refiere a las condiciones de crecimiento de *Micosphaerella*. Se presenta un estudio comparativo del crecimiento de *Micosphaerella* en medio sólido (agar micofílico) y líquido (con V-8).

MATERIALES Y METODOS

Selección de las Muestras.

Las muestras se tomaron de tejidos presentando el último estadio de mancha (Stover, 1969), donde, por lo general, aparecen manchas secas y blanco – grisáceas con puntos negros en el centro. Las plantaciones muestreadas se encuentran en el Municipio Autónomo Francisco Javier Pulgar, Estado Zulia. Se usaron los criterios del muestreo jerárquico (Guzmán et. al., 1998).

Aislamiento de ascosporas.

Se usó el protocolo de CORBANA (1998), modificado como se describe a continuación. Se seleccionaron con lupa las lesiones que tenían el mayor número de pseudotecios y se cortaron con un sacabocado (10 mm de diámetro). Se engraparon siete de estos “discos” (envés contra el papel) en piezas de papel (corriente) de aproximadamente 10 x 15 cm. Se lavaron por 30 minutos con agua corriente, se eliminó el exceso de agua y se colocaron en cámara húmeda, incubando por 24 horas. Luego se sumergieron las muestras por 20 minutos en agua destilada, se eliminó el exceso de humedad y se procedió a la “descarga” de las ascosporas, colocándolas en placas de agar 3% – agua (haz en contacto con el medio), a temperatura ambiente. Por el reverso de las placas se marcó el área que ocupa cada disco, con el fin de facilitar la localización de las ascosporas. Estas se observaron al microscopio de luz, luego de 40 minutos. Finalmente, se incubaron por 24 horas, con luz, a temperatura ambiente.

Siembra y cultivo de ascosporas:

Utilizando el microscopio de luz (objetivo 20X) se observaron los puntos de descarga, enfocando preferiblemente las ascosporas que estaban solas y más alejadas de posibles formas contaminantes. Con una aguja fina o alfiler se “atrapó o pescó” una ascospora por vez, y se sembró en medio líquido V-8 (Carlier, 1994) con agitación (50 rpm). En medio sólido (agar micofílico) se sembraron siete de estas esporas colocándolas uniformemente distribuidas.

Ambos cultivos se incubaron a 26°C, en la oscuridad, durante 10 días en medio líquido V-8 o por aproximadamente 16 días, en el medio sólido.

Identificación del hongo por PCR (Polimerase Chain Reaction)

El ADN genómico se extrajo a partir de 1 gr de micelio, procesado de acuerdo al protocolo CTAB Hexadecyltrimethyl-Ammonium Bromide (Chirs, et al., 1994). La extracción de ADN a partir del cultivo en medio sólido, se hizo una vez que las colonias alcanzaron un tamaño de 1 a 1,5 cm de diámetro.

Los "primers" usados fueron los descritos por Johanson y Jeger (1993) y tienen las secuencias siguientes:

R635:5`GGTCCGTGTTTCAAGACGG3`;

MF137:5`GGCGCCCCCGGAGGCCGTCTA3`;

MM137:5`GGCGCCCCCGGAGGTCTCCTT3`

Las condiciones usadas en la PCR para la identificación de *M. fijiensis* fueron: Buffer de reacción composición (500mM KCl, 100mM Tris-HCl, (pH 9,0 at 25°C), 1,0% Triton.® X-100, 15mM MgCl₂) (Conc. Final =1X), MgCl 1,5 mM, dNTPs 0,2mM, "primers" 0,2μM y Taq DNA polimerasa 2U para una mezcla final de reacción de 50μl. El perfil de temperatura usado fue: 94°C, 3 min ; [94°C, 1 min ; 65°C, 1 min] x 34 ciclos; 72 °C, 2,30min ; 72°C, 7 min.

Preservación de aislados monoascospóricos.

Las cepas o aislados provenientes de estos medios se transfirieron a cuñas PZA y se incubaron a 26°C, en la oscuridad. Al tener los aislados un diámetro de aproximadamente 0,5 cm, se agregó 1 ml de H₂O: 18 MΩ, a cada tubo y se guardaron a 4°C.

Preparación de cultivos del hongo a partir de material preservado.

Para inducir el crecimiento de micelios mantenidos por largos períodos en cuñas, se siguieron los pasos siguientes:

- i. Se agregó un (1) ml de agua 18 MΩ, a la cuña.
- ii. Con una aguja estéril se rompió el micelio y se agitó con el vortex hasta despegarlo de las paredes del tubo.
- iii. En una caja de Petri con agar 2%-V-8-streptomicina(100UI/ml)-penicilina (10UI/ml), se sembraron 20 ó 30 gotas de la suspensión, con el rastrillo.
- iv. Después de envolver con parafilm, se incubaron las cajas invertidas, por 15 días, con luz.

Determinación de peso de las muestras de micelio

Los cultivos líquidos llegados a término fueron filtrados a través de papel WHATMAN No. 1, de 11 cm de diámetro. El material sólido sobre el papel, se incubó a 40 °C, por 1 hora y se determinó su peso “húmedo”. Para determinar “peso seco” se pesó el material sobre el filtro serialmente en el tiempo, hasta

obtener una variación mínima de peso. Usualmente el peso se estabilizó después de tres (3) horas de incubación a 40 °C.

En el caso de los cultivos sólidos, se tomaron colonias de 1,5 cm y se procedió a determinar su “peso húmedo” y “peso seco”, en la forma ya descrita.

Las determinaciones de peso se hicieron en una balanza analítica marca SAUTER.®

RESULTADOS Y DISCUSION

Caracterización de ascosporas de Mycosphaerella

Las esporas de *M. fijiensis* son bicelulares, hialinas y producen tubos germinativos rectilíneos, como se muestra en la Figura 1a y 1b, donde se observan claramente esporas contaminantes tricelulares, denominadas micronectriella (Stover, 1963). Las esporas de *M. musicola* producen tubos germinativos ondulados como se ve en la figura 1c (Luis Cedeño, comunicación personal, 2000).

La Figura 2 muestra un gel de agarosa con los productos específicos obtenidos con las sondas de identificación de *M. fijiensis* después de la PCR. *M. musicola* se usó como control negativo. En presencia de la sonda específica, *M. musicola* produce una banda específica (resultado no mostrado).

Estudio comparativo del Crecimiento en V-8 y en agar micofílico

En el medio líquido V-8, *Mycosphaerella fijiensis* desarrolló, durante todo el tiempo de crecimiento, “pelotitas” (grumos aproximadamente esféricos de diámetro < 1mm) compactas de micelio, de color negro, que luego se tornaban de color gris. Después de una semana de crecimiento, se observa abundante micelio y cuatro días más tarde, ocurre un gran aumento en el tamaño y la cantidad de “pelotitas”. El crecimiento óptimo toma entre 10 y 11 días. La Figura 3 muestra estos resultados.

Un PROTOCOLO para lograr el crecimiento de micelios almacenados por un largo período (los cuales muestran muy lento crecimiento al repicarlos), fue desarrollado durante este trabajo. En la sección Materiales y Métodos se describen detalladamente los pasos seguidos.

En el medio sólido, luego de una semana, se observan pequeños puntos de color negro, en el lugar donde se habían sembrado las ascosporas. Después de cuatro días se nota la formación de las colonias, las cuales son transferidas a una placa virgen a los cinco días. Las colonias alcanzan su máximo crecimiento, aproximadamente 1,0 a 1,5 cm de diámetro, en 16 días. La Figura 4 muestra una secuencia cronológica del crecimiento de las colonias.

La Tabla 1 compara los rendimientos obtenidos en cultivo sólido y líquido, “peso húmedo” (ver Materiales y Métodos), de dos (2) muestreos jerárquicos procedentes de dos localidades en el Municipio Francisco Javier Pulgar, Edo. Zulia. Evidentemente, existe un rendimiento 2X superior de los micelios crecidos en V-8, con respecto a los del medio sólido.

En un segundo ensayo: Tabla 2, se tomaron diez (10) muestras procedentes de la misma zona: Sector Hoya Grande. En este caso se partió de muestras de micelio (aprox. 0,5 cm) preservadas en viales con agar micofilico y agua 18 MΩ. De nuevo el rendimiento en V-8 resultó superior por 2,11 X, comparando tanto “pesos húmedos” como “pesos secos” (ver Materiales y Métodos).

Llama la atención el hecho de que esta vez todas las muestras presentaron igual período de latencia (desde la siembra hasta el momento en que se observa crecimiento a simple vista). Este hecho sugiere que el periodo de latencia del micelio en medio sólido es menor cuando este proviene de micelio preservado en agua estéril, después de crecimiento en V-8.

Con el fin de confirmar esta última hipótesis, se comparó el crecimiento de muestras provenientes de cultivo monoascospórico preservado en agua, y de muestras tomadas directamente de la lesión en la hoja. Los resultados se resumen en la Tabla 3, y demuestran que, en efecto, los cultivos monoascospóricos preservados mantienen una excelente condición fisiológica.

Con respecto a la patogenicidad se han logrado infecciones experimentales en laboratorio usando aislados, conservados en viales con agar micofilico y agua 18 MΩ por cuatro meses. También se ha logrado repicar los cultivos hasta tres veces, después de seis meses en medio de preservación.

Producción de ADN a partir de cultivos en V-8

La purificación de ADN genómico a partir de micelio crecido en medio V-8 resultó ser de un alto rendimiento, como puede verse en la Tabla 4. No fue posible obtener buenas preparaciones a partir de micelio crecido en agar micofilico. En algunos casos se obtuvieron cantidades ínfimas de ADN, que sufrieron una importante degradación después de un corto período de almacenamiento a 4°C. La imposibilidad de obtener un (1) gramo de micelio, como se requiere para el método de extracción de ADN (CTAB-buffer), puede ser la explicación de este resultado.

CONCLUSIONES

1. El medio V-8, preparado según Carlier (1994), resulta en un alto rendimiento y una mayor eficiencia en el tiempo, para obtener cultivos de *Mycosphaerella*.
2. Igualmente provee una mayor garantía de preservación para el mantenimiento de colecciones de aislados, a 26 °C, por largos períodos de tiempo.
3. La preparación de ADN, y probablemente de otras macromoléculas, a partir de cultivos en V-8, produce alto rendimiento y estabilidad.
4. Es posible que los hongos crecidos en V-8 también mantengan mejor sus propiedades biológicas como patogenicidad y resistencia a renovaciones sucesivas en el laboratorio, como lo demuestra la experiencia hasta ahora acumulada en el laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado a través de un proyecto INCO – DC de la Comunidad Económica Europea :EC Project CT97-0192, bajo la responsabilidad de María Elena García y Manuel Dágert. Nuestro Agradecimiento a los Profesores Luis Cedeño y Chrystian Carrero por su valiosa colaboración en la realización de este trabajo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- CARLIER, J. 1994. Etude de la Structure des Populations, par RFLP, de *Mycosphaerlla fijiensis*, Agent responsable de la Maladie des Raies Noires des Bananiers. Le Grade de Docteur en Sciences de l' Université Paris XI Orsay, Paris, 19 p.
- CHIRS, H.; D. WILKINSON; K. ZAGAFAS y R. HARRISON. 1994. A simplified method for the preparation of fungal genomic DNA for PCR and RAPD analysis. University of Oklahoma Norman, OK, USA. 16 (1): 48-9.
- GOMEZ, D., C. STOVER Y C. PRINS. 1992. Metodología para la manipulación *in vitro* de *M. fijiensis*. Hoja Técnica del CATIE. Vol.6, número 3.
- GUZMÁN, M., R. VARGAS & J. SANDOVAL. 1998. REPORT: Taller sobre Sigatoka (16-19 de junio de 1998). CORPORACIÓN BANANERA

- NACIONAL.. La Rita de Pococí, Limón, Costa Rica.
- FULLERTON R. A. 1994. Sigatoka leaf diseases, pp 12-14 in: Compendium of Tropical Fruit Diseases The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota.. Ploetz R.C. et al., eds.
- JOHANSON, A. and J. JEGER. 1993. Use of PCR for detection of *Mycosphaerella fijiensis* and *M. Musicola*, the causal agents of Sigatoka leaf spots in banana and plantain. Mycol. Res. 97(6): 670-674.
- MARTINEZ G. 1997. The present situation with regard to black Sigatoka Negra in Venezuela. INFOMUSA 6(1):16-17
- SMITH, D. and H. AGNES. 1983. The Preservation and Maintenance of Living Fungi. Commonwealth Mycological Institute, England, 27-30 p
- STOVER, R. 1969. The *Mycosphaerella* species associated with banana leaf spots. Tropical Agric. Trinidad 46: 325-332
- STOVER, R. 1963. Leaf spot of bananas caused by *Mycosphaerella musicola* : Associated ascomycetous fungi. Canadian J. Bot. 41: 1481-1485.
- The HiMedia Manual, 1998. For Microbiology Laboratory Practice, 428p

Figura 1a.- Ascosporas de *M. fijiensis* sin germinar, “descargadas” en placas de agar-agua al 3%. Fotografiadas al Microscopio de Luz (objetivo 20X, Exp.ADJ+1,Tiempo en seg 1,0)

Figura 1b.- Ascosporas de *M. fijiensis* germinadas en placas de agar-agua al 3%. Fotografiadas al Microscopio de Luz (objetivo 20X, Exp.ADJ+1,Tiempo en seg 0,91).

Figura 1c.- Ascosporas de *M. musicola* germinadas en placas de agar-agua al 3%. Fotografiadas al Microscopio de Luz (objetivo 20X, Exp.ADJ+1, Tiempo en seg 0,91).

Figura 2.- Identificación de *M. fijiensis* por PCR: preparaciones de ADN de aislados, fueron sometidas a electroforesis en gel de agarosa 0,8%. 1 – 20, ADN de aislados de un muestreo jerárquico completo; 21, control negativo (sin ADN); 22, ADN de *M. musicola*; 23, control positivo *M. fijiensis*; 25, escalera de Peso Molecular (1 Kb; obtenida de Promega).

Figura 3.- Crecimiento de *M. fijiensis* en medio líquido V8: una vez sembrados los cultivos, se hicieron fotografías a: A) tres (3) días; B) siete (7) días; C) once (11) días. Se usó película a color y una cámara fija de 35,0mm, ASA 100.

Figura 4.- Crecimiento de *M. fijiensis* en medio sólido (agar micofílico): una vez sembrados los cultivos, se hicieron fotografías a: una semana; A, B y C; 16 días: D y E. Se usó película a color y una cámaras fija de 35 mm, ASA 100.

Figura 5.- Electroforesis en gel de agarosa de preparaciones de ADN: ADN de *M. fijiensis* preparado a partir de 20 aislados de un muestreo jerárquico fueron corridos en un gel de agarosa 0,8%, a 60 voltios, por una hora.

Tabla 1. Rendimientos obtenidos en medios sólido y líquido (“Peso húmedo”), en dos (2) muestreos jerárquicos, de dos (2) localidades del Municipio Francisco Javier Pulgar. Edo Zulia. : Nivel jerárquico I: Sector Caño Muerto (medio sólido). Nivel jerárquico II: Finca Hoya Grande (medio líquido).

Nivel Jerárquico I	Peso húmedo (g)	Nivel Jerárquico II	Peso húmedo (g)
N ₁ P ₁	0,66	N ₁ P ₁	1,26
N ₁ P ₂	0,63	N ₁ P ₂	1,30
N ₁ P ₃	0,59	N ₁ P ₃	1,19
N ₁ P ₄	0,65	N ₁ P ₄	1,20
N ₂ P ₁	0,60	N ₂ P ₁	1,23
N ₂ P ₂	0,62	N ₂ P ₂	1,20
N ₂ P ₃	0,60	N ₂ P ₃	1,26
N ₂ P ₄	0,63	N ₂ P ₄	1,30
N ₃ H ₁	0,70	N ₃ H ₁	1,18
N ₃ H ₂	0,68	N ₃ H ₂	1,22
N ₃ H ₃	0,59	N ₃ H ₃	1,30
N ₃ H ₄	0,60	N ₃ H ₄	1,20
N ₄ L ₁	0,66	N ₄ L ₁	1,23
N ₄ L ₂	0,65	N ₄ L ₂	1,18
N ₄ L ₃	0,63	N ₄ L ₃	1,26
N ₄ L ₄	0,60	N ₄ L ₄	1,23
N ₅ L ₁	0,70	N ₅ L ₁	1,30
N ₅ L ₂	0,63	N ₅ L ₂	1,26
N ₅ L ₃	0,63	N ₅ L ₃	1,18
N ₅ L ₄	0,60	N ₅ L ₄	1,18
Promedio	0.63		1,23
Desviación Standard	0.001		0.002

Tabla 2 Rendimientos obtenidos en medios líquido y sólido, de 10 aislados provenientes de Finca Hoya Grande, Municipio Francisco Javier Pulgar. Edo Zulia.

Muestra N°	Pesos Húmedos (g)		Pesos Secos (g)	
	Medio Sólido	Medio Líquido	Medio Sólido	Medio Líquido
1	0,68	0,88	0,65	0,82
2	0,65	0,86	0,62	0,80
3	0,62	0,90	0,60	0,85
4	0,66	0,89	0,62	0,83
5	0,63	0,86	0,61	0,80
6	0,68	0,88	0,65	0,80
7	0,66	0,91	0,62	0,85
8	0,65	0,86	0,61	0,81
9	0,68	0,91	0,66	0,85
10	0,67	0,90	0,65	0,85
Promedio	0,65	0,88	0,62	0,82
Des. Estad	0.001	0.001	0	0

Tabla 3 Rendimiento en medio líquido V8 de aislados provenientes de campo (hoja lesionada) y de cultivos monoascospóricos preservados en agua.

Muestra No	Pesos Húmedos (g)		Pesos Secos (g)	
	Hoja lesionada	Micelio preservado	Hoja lesionada	Micelio preservado
1	0,86	0,92	0,77	0,84
2	0,84	0,91	0,75	0,84
3	0,84	0,88	0,75	0,81
4	0,83	0,91	0,75	0,82
5	0,84	0,90	0,74	0,82
Promedio	0,84	0,90	0,75	0,82
Desv Est	0,063	0,04	0	0,04

Tabla 4 : Rendimiento de ADN genómico obtenido a partir de micelio crecido en medio líquido V8, procedente de un muestreo jerárquico de la zona Sur del Lago de Maracaibo.

ADN de Aislados del Sector Guajira Sur del Lago	Concentración ADN ($\mu\text{g/ml}$)
N ₁ P ₁	2,6
N ₁ P ₂	2,9
N ₁ P ₃	2,1
N ₁ P ₄	2,1
N ₂ P ₁	3,4
N ₂ P ₂	3,0
N ₂ P ₃	3,2
N ₂ P ₄	3,0
N ₃ H ₁	3,6
N ₃ H ₂	4,5
N ₃ H ₃	4,0
N ₃ H ₄	2,5
N ₄ L ₁	3,0
N ₄ L ₂	2,8
N ₄ L ₃	2,3
N ₄ L ₄	4,6
N ₅ L ₁	3,9
N ₅ L ₂	2,2
N ₅ L ₃	3,2
N ₅ L ₄	3,6

