

EFFECTOS DE LA TEMPERATURA, MEDIO DE CULTIVO Y PH EN EL CRECIMIENTO COLONIAL DE *DIPLODIA MUTILA* FR. APUD MONT.

por
JORDI LUQUE*

Resumen

LUQUE, J. (1989). Efectos de la temperatura, medio de cultivo y pH en el crecimiento colonial de *Diplodia mutila* Fr. apud Mont. *Anales Jard. Bot. Madrid* 46(1): 215-221.

Se estudiaron las respuestas del crecimiento colonial de *Diplodia mutila* Fr. apud Mont. (*Coelomycetes*) en relación con la temperatura, el tipo de medio de cultivo y pH del mismo. Se estudió el crecimiento a 16, 25, 28, 30 y 37 °C, estableciéndose el rango óptimo en 25-28 °C. Se probaron seis medios de cultivo, semidefinidos sólidos, de los cuales en PDA se manifestaba una tasa de crecimiento mayor (14,5 mm/día en el período 24-72 horas). El pH óptimo se estableció en el intervalo 4,0-6,0, con crecimiento insignificante a pH \geq 6,0.

Palabras clave: *Diplodia mutila*, crecimiento colonial, temperatura, medio de cultivo, pH.

Abstrac

LUQUE, J. (1989). Effects of temperature, culture medium and pH on colony growth of *Diplodia mutila* Fr. apud Mont. *Anales Jard. Bot. Madrid* 46(1): 215-221 (in Spanish).

This paper deals with colony growth responses of *Diplodia mutila* Fr. apud Mont. (*Coelomycetes*) to temperature, culture medium and pH. Five temperatures ranging from 16 to 37 °C were studied, and the optimum range was established at 25-28 °C. Six semidefined, solid media were tested. On PDA the colony showed the fastest growth rate (14,5 mm/day in the period 24-72 hours). The optimum pH was between 4,0 and 6,0, with insignificant growth rates at pH \geq 6,0.

Key words: *Diplodia mutila*, colony growth, temperature, culture medium, pH.

INTRODUCCIÓN

Diplodia mutila Fr. apud Mont. (*Coelomycetes*) ha sido asociada con frecuencia a enfermedades (chancros) de diversas especies vegetales. SHOEMAKER (1964), SUTTON (1980), NALLI (1984) y VAJNA (1986) citan los siguientes géneros huésped: *Acacia*, *Fraxinus*, *Lycopersicon*, *Malus*, *Piper*, *Populus*, *Prunus*, *Pyrus*, *Quercus*, *Solanum*, *Syringia*, *Thuja*, *Ulmus* y *Vitis*.

En prospecciones realizadas entre enero y julio de 1987, en alcornocales gerundenses, observamos la presencia de dicho hongo en la corteza lesionada de alcornoques. Se ha determinado el poder patógeno de *D. mutila* sobre esta espe-

* Departamento de Biología Animal, Biología Vegetal y Ecología, Facultad de Ciencias, Universidad Autónoma de Barcelona. 08193 Bellaterra (Barcelona).

cie vegetal (LUQUE & GIRBAL, 1989) y ahora presentamos el estudio de los efectos que, sobre el crecimiento y morfología de las colonias, tienen factores como la temperatura de incubación, el tipo de medio de cultivo y el pH. El conocimiento de la fisiología del hongo *in vitro* es esencial para estudios fitopatológicos como la producción de inóculo, el ensayo de productos fitosanitarios y el control biológico.

MATERIAL Y MÉTODOS

El organismo objeto de estudio, *D. mutila*, procede de aislamientos monoclonales de muestras originarias de Vidreres (Gerona, 11-II-1987; cepa de nuestra referencia S0017). Los aislamientos se llevaron a cabo en PDA, a 16 °C. La base de inóculo, para todas las experiencias, fueron bloques de agar de 4 mm de diámetro obtenidos del margen activo de colonias crecidas a 16 °C, a oscuras y durante siete días. Todos los ensayos se practicaron por triplicado, en placas de Petri de 8,5 cm de diámetro. Los medios fueron esterilizados a 120 °C durante 20 minutos y las placas se dejaron reposar 24 horas antes de la inoculación.

Influencia de la temperatura y tipo de medio de cultivo: Se probaron seis medios de cultivo: CMA, LBA, OMA, MEA, PDA y YEA. Los tres primeros se prepararon con materias primas, siguiendo a RIKER & RIKER (1936). Los tres restantes eran preparados comerciales suministrados por Biolife (Milán, Italia). Cada medio se probó a las temperaturas siguientes: 16, 25, 28, 30 y 37 °C, siempre a oscuras y con humedad relativa constante al 100%.

Influencia del pH: Se prepararon placas de PDA con un rango de pH de 3,5 a 8,5, a intervalos de 0,5 unidades. Se empleó como solución tampón una disolución de $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ de concentración final de iones fosfato 0,1 M. Concentraciones mayores pueden representar una inhibición en el crecimiento, como ya se ha demostrado en otros casos (GILTRAP & LEWIS, 1981; ROSSET & BARLOCHER, 1985), aunque no específicamente para el caso de nuestro hongo. Los diferentes valores se consiguieron añadiendo NaOH y HCl 1N. Se comprobó el pH antes y después de la experiencia, sin que se encontraran variaciones en el mismo.

Estimación del crecimiento: Para expresar el crecimiento de *D. mutila* se han utilizado dos métodos distintos. En el primero de ellos, el de medida lineal, se tomaron medidas al azar de dos radios de la colonia, perpendiculares entre sí, cada 24 horas. Se calcularon para todos los casos, por medio de regresiones lineales, las tasas de crecimiento durante las 24-72 horas de incubación desde la inoculación.

El segundo método consistió en determinar la biomasa de las colonias cada 24 horas. Este experimento se llevó a cabo sólo a 28 °C y con los seis medios ya explicados. Se prepararon 15 placas de Petri de cada uno de los medios y se dispuso sobre la superficie del medio, en condiciones estériles, un disco de papel de celofán permeable del mismo diámetro que la placa. A intervalos de 24 horas se retiraron tres placas de cada medio. Se midió el radio de la colonia y se calculó su peso, después de haberlas separado del celofán y secado a 80 °C hasta peso constante, durante un día.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Influencia de la temperatura y del medio de cultivo: La tabla 1 muestra las tasas de crecimiento a las 24-72 horas de incubación para la combinación de medios y temperaturas. En todos los casos se observan mayores tasas en las temperaturas de 25 y 28 °C. No existen diferencias significativas entre las tasas de una y otra temperatura. Por lo general, las tasas de crecimiento radial son ligeramente inferiores a 30 °C y significativamente más bajas en las dos temperaturas extremas, puntos en los que se manifiestan efectos inhibidores. Es de destacar el crecimiento que se da en PDA (14,5 mm/día a 25 °C), muy superior al de los otros medios. En YEA se observa el crecimiento menor (6,1 mm/día a 28 °C).

TABLA 1

TASAS DE CRECIMIENTO RADIAL DE *DIPLODIA MUTILA*
(MM/DÍA EN EL PERÍODO 24-72 HORAS DE INCUBACIÓN)
SEGÚN LA COMBINACIÓN DE MEDIOS Y TEMPERATURAS

MEDIO	Temperatura (°C)				
	16	25	28	30	37
CMA	6,1	9,9	8,1	6,4	2,1
LBA	7,0	8,9	10,7	10,4	2,6
MEA	5,5	9,6	9,5	7,0	3,4
OMA	4,9	9,2	10,1	8,2	3,9
PDA	9,6	14,5	14,4	12,5	4,0
YEA	6,4	7,1	6,1	6,1	2,4

El medio de cultivo influye en el aspecto de las colonias. En general, el micelio es blanquecino y con el tiempo se oscurece. Sin embargo, este cambio de coloración se produce antes o después según el medio que empleemos. En MEA y YEA se da hacia el quinto día de incubación. Poco tiempo después lo observamos en LBA y PDA y, finalmente, hacia el octavo o noveno día, en CMA y OMA. Los cambios de coloración necesitan más tiempo cuando trabajamos a 16 °C.

Otra característica muy variable es la producción de cuerpos fructíferos. Los picnidios aparecen normalmente agregados en MEA, PDA y LBA, y relativamente aislados en CMA y OMA. En CMA, LBA, OMA y YEA se producen en menor cantidad.

La diferencia más notoria, sin embargo, consiste en el efecto que producen los medios de cultivo sobre el hábito de la colonia. En LBA y PDA obtenemos colonias con abundante micelio aéreo, algodonoso. En MEA y YEA el micelio es muy compacto y fijo al sustrato. Además, en estos dos medios el crecimiento se manifiesta rítmicamente, producción de zonaciones concéntricas. Este fenómeno ha sido ya citado para otras especies (JEREBZOFF, 1965). En CMA y OMA, el micelio es postrado y muy laxo (véase fig. 1).

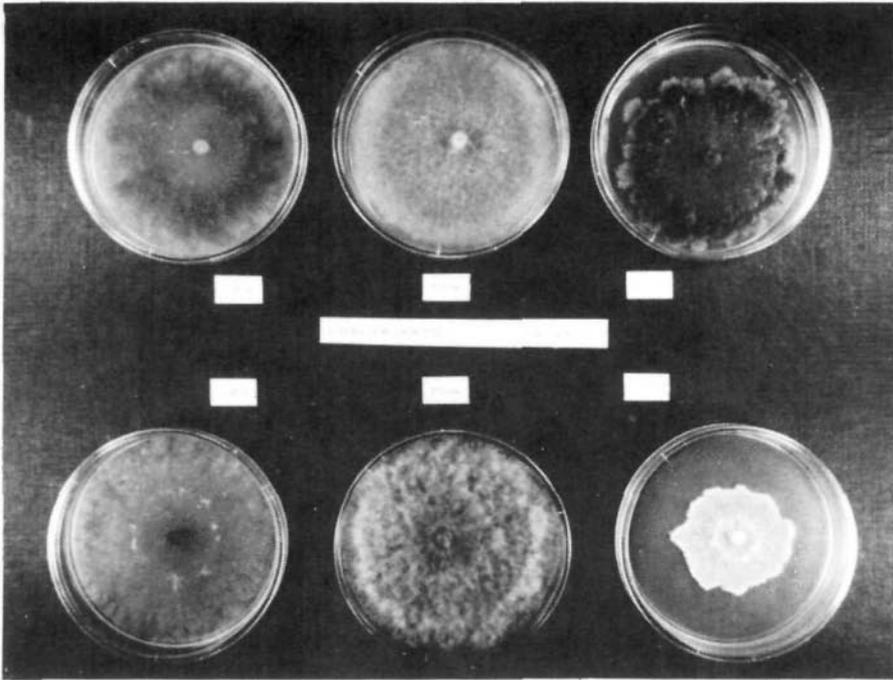


Fig. 1.—Aspecto de las colonias de *Diplodia mutila* crecidas a 16 °C durante diez días. De izquierda a derecha: CMA, LBA y MEA (arriba), OMA, PDA y YEA (abajo).

Estas diferencias observadas nos llevaron posteriormente a estudiar el crecimiento de *D. mutila*, expresándolo como la biomasa producida por el hongo en un período determinado de tiempo. En la fig. 2 se representan los valores de biomasa fúngica (peso seco) para el período de cinco días de incubación, a 28 °C. El valor máximo corresponde a 106,7 mg en PDA (cinco días) y el mínimo 4,3 mg en CMA para el mismo período de tiempo. En el resto de los sustratos se midieron valores medios de 40,0 mg (LBA), 52,5 mg (YEA) y 63,9 mg (MEA).

Finalmente, se intentó encontrar una relación entre el radio y la biomasa producida por la colonia fúngica en cada medio. El ajuste a ecuaciones potenciales fue bueno en todos los casos. En la tabla 2 se presentan los resultados obtenidos. Las ecuaciones resultantes son de la forma

$$\text{Biomasa} = A * \text{Radio}^b$$

donde A y ^b corresponden a los coeficientes expresados en la tabla mencionada. A la vista de ellos, se puede llegar a intuir una cierta relación entre el aspecto de la colonia, su radio y la biomasa producida. Así, por ejemplo, en PDA, donde se observan colonias con crecimiento aéreo mayor, se da el valor del exponente más grande, y en CMA, con colonias muy laxas, el exponente toma el valor menor.

Influencia del pH: En la tabla 3 se resumen las tasas de crecimiento de *D. mutila* en función de las variaciones del pH del medio. Este hongo crece bien para

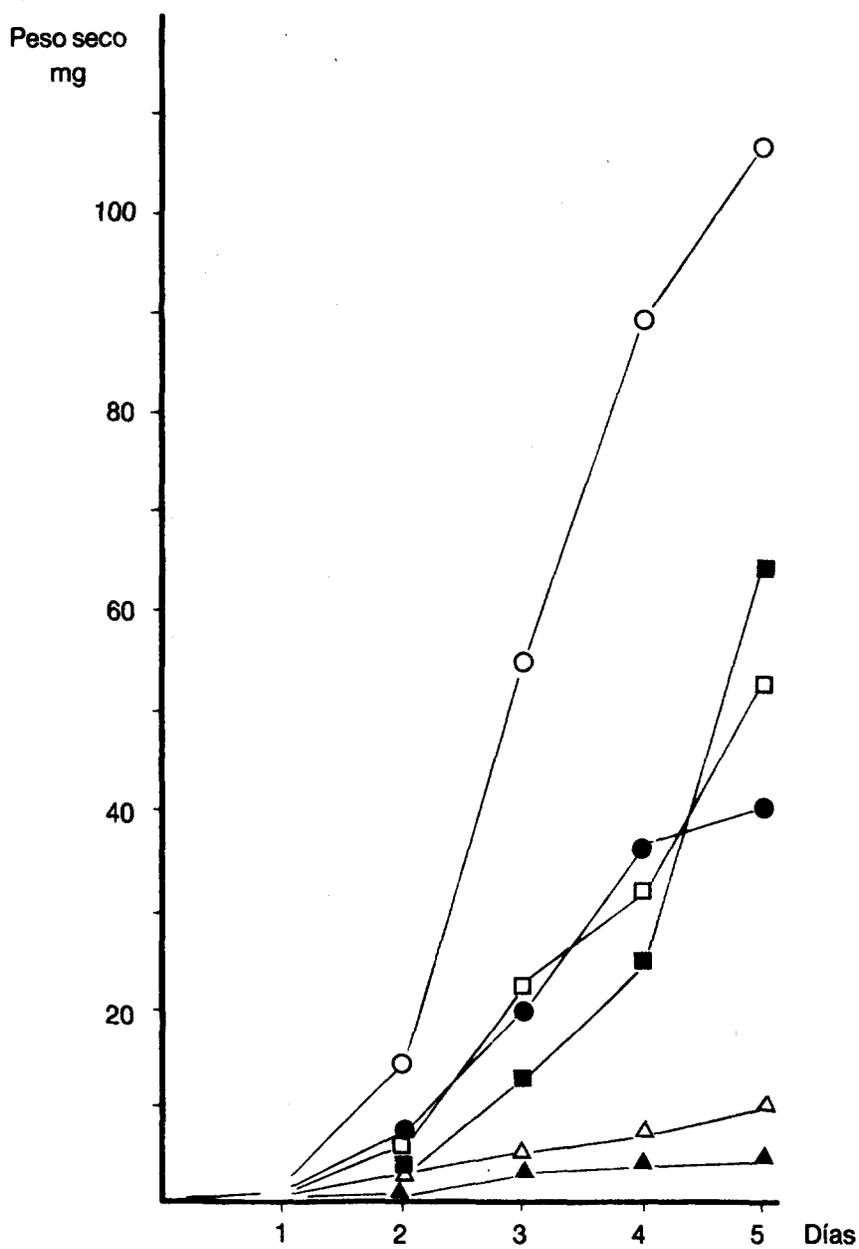


Fig. 2.—Crecimiento de *Diplodia mutila* (biomasa producida) a 28 °C. (▲: CMA; ●: LBA; ■: MEA; △: OMA; ○: PDA; □: YEA).

TABLA 2

RELACIÓN RADIO-BIOMASA PRODUCIDA DURANTE
EL CRECIMIENTO DE *D. MUTILA* A 28 °C (VER TEXTO)

	MEDIO	A	b
CMA	0,046	1,228
LBA	0,012	2,173
MEA	0,087	1,533
OMA	0,037	1,491
PDA	0,005	2,550
YEA	0,022	2,136

B, biomasa; R, radio; A y b, coeficientes. $B = AR^b$

TABLA 3

TASAS DE CRECIMIENTO RADIAL DE *DIPLODIA MUTILA* A DIFERENTES pH
(MM/DÍA EN EL PERÍODO 24-72 HORAS DE INCUBACIÓN), A 28 °C, EN PDA

pH	3,5	4,0	4,5	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0	7,5	8,0	8,5
Tasa	5,4	10,3	13,3	13,2	13,7	12,9	0,8	0,7	0,2	0,2	0,2

valores comprendidos entre 4,0 y 6,0, aunque las tasas máximas se centran en el intervalo 4,5-5,5. Es de destacar el cambio brusco que se da a partir de 6,5. La reducción es más suave en el extremo ácido de la escala. Las tasas de crecimiento lineal, en el intervalo favorable de pH, son ligeramente inferiores a aquellas ya dadas (14,5 mm/día). Ello podría deberse a un posible efecto inhibitorio de los iones PO_4^{3-} , Na^+ o Cl^- .

CONCLUSIONES

Según los resultados obtenidos se deduce que, de las condiciones de laboratorio ensayadas, la combinación óptima para el crecimiento de *D. mutila* se da en PDA, a pH entre 4,5 y 5,5 y entre 25 y 28 °C.

Observamos variaciones significativas de las respuestas del crecimiento de *D. mutila* según las condiciones de cultivo a las que se someta. La elección correcta de los medios, la temperatura y el pH nos puede llevar a un grado de optimización de los cultivos siempre deseable.

Se pone de manifiesto, asimismo, que en algunos casos el crecimiento fúngico no puede expresarse de un único modo. El método lineal de medida, aplicado comúnmente por su relativa sencillez y su carácter no destructivo, presenta el inconveniente de que no existe necesariamente una relación entre el crecimiento radial y la biomasa producida por el organismo (MANDELS, 1965). Una alternativa válida para la estimación del crecimiento, quizá la más fiable, es el cálculo de la

biomasa; pero esto suele traer consigo complicaciones en la metodología, sobre todo en el caso de los hongos miceliarios o filamentosos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GILTRAP, N. J. & D. H. LEWIS (1981). Inhibition of growth of ectomycorrhizal fungi in culture by phosphate. *New Phytol.* 87: 669-675.
- JEREBZOFF, S. (1965). Growth rhythms. In: G. C. Ainsworth & A. S. Sussman (Eds.), *The Fungi, an Advanced Treatise I*: 625-645. Academic Press, New York, London.
- LUQUE, J. & J. GIRBAL (1989). Dieback of cork oak (*Quercus suber*) in Catalonia (NE Spain) caused by *Botryosphaeria stevensii*. *Eur. J. Forest. Pathol.* 19: 7-13.
- MANDELS, G. R. (1965). Kinetics of fungal growth. In: G. C. Ainsworth & A. S. Sussman (Eds.), *The Fungi, an Advanced Treatise I*: 599-612. Academic Press, New York, London.
- NALLI, R. (1984). Un cancro del pero da *Diplodia mutila* (Fr.) Mont. nel Lazio. *Ann. Ist. Sperim. Patol. Veg.* 9: 107-111.
- RIKER, A. J. & R. S. RIKER (1936). *Introduction to research on plant diseases*. J. S. Swift Co., St. Louis.
- ROSSET, J. & F. BÄRLOCHER (1985). Aquatic hyphomycetes: influence of pH, Ca²⁺ and HCO₃⁻ on growth in vitro. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 84: 137-145.
- SHOEMAKER, R. A. (1964). Conidial states of some *Botryosphaeria* on *Vitis* and *Quercus*. *Canad. J. Bot.* 42: 1297-1301.
- SUTTON, B. C. (1980). *The Coelomycetes*. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- VAJNA, L. (1986). Branch canker and dieback of sessile oak *Quercus petraea* in Hungary caused by *Diplodia mutila*. *Eur. J. Forest. Pathol.* 16(4): 223-229.

Aceptado para publicación: 17-VI-1988