

Efecto de la temperatura y el pH en el crecimiento superficial de *Botryodiplodia theobromae* RC1

Felipe Eng¹, Mariano Gutiérrez-Rojas² y Ernesto Favela-Torres²

¹Instituto Cubano de Investigaciones de los Derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA), Ciudad de la Habana, Cuba
²Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México DF, México

Resumen

El estudio del crecimiento superficial de un hongo es un método básico para definir su comportamiento frente a diferentes condiciones de cultivo. En este trabajo, con vistas a conocer las características del crecimiento superficial del hongo *Botryodiplodia theobromae* RC1, se estudió la influencia de la temperatura y el pH inicial en la velocidad radial y densidad de crecimiento. Los estudios revelaron que la temperatura no afectó de manera significativa la velocidad radial, excepto a 40 °C. Por otro lado, el medio de cultivo y la temperatura sí afectaron de forma significativa la densidad de crecimiento, mientras que el pH inicial del medio de cultivo no influyó de forma significativa en estas variables.

Palabras clave

Botryodiplodia theobromae, Densidad de crecimiento, Velocidad radial de crecimiento

A survey of temperature and pH effect on colonial growth of *Botryodiplodia theobromae* RC1

Summary

Study of fungal colonial growth is a basic method to examine their behaviour in different cultivation conditions. The influence of temperature and initial pH on growth radial velocity and growth density of *Botryodiplodia theobromae* RC1, was studied in order to show the growth characteristics of this fungus. Both temperature and culture medium influenced growth density, but radial velocity of growth was only affected by temperatures above 40 °C. In addition, initial pH of culture media did not affect either parameter.

Key words

Botryodiplodia theobromae, Growth density, Growth radial velocity

El crecimiento superficial en medios sólidos es uno de los métodos básicos para estudiar la fisiología de los microorganismos [1], debido a que el diámetro de las colonias y la velocidad radial de crecimiento son parámetros muy empleados en bioensayos y en investigaciones fisiológicas [2].

Resulta de mucho interés en el estudio de la fisiología de un microorganismo ensayar la utilización de diferentes medios de cultivos y, de forma simultánea, diferentes valores de temperatura dentro del intervalo óptimo establecido para el crecimiento. Se esperan velocidades de

crecimiento mayores con el aumento de la riqueza del medio empleado y la temperatura adecuada.

Botryodiplodia theobromae es un hongo fitopatógeno de zonas tropicales y subtropicales que causa la putrefacción de plantas y frutos [3], describiéndose como productor de reguladores de crecimiento de las plantas, como el ácido jasmónico y sus derivados (resultado de su metabolismo secundario), producidos a escala de laboratorio con rendimientos satisfactorios [4,5].

Los estudios de la fisiología de *B. theobromae* se han desarrollado, sobre todo, con vista a conocer sus características infectivas en las plantas y frutos. Se ha observado que en función del origen de la cepa, *B. theobromae* presenta variaciones en su temperatura óptima de crecimiento y las características de crecimiento [6]. También se ha podido apreciar que la complejidad del medio influye marcadamente sobre el crecimiento del micelio y, por tanto, en su velocidad de crecimiento y producción de biomasa [7-9]. Considerando las premisas anteriores se realizaron estudios, con diferentes medios de cultivo, del efecto de la temperatura y el pH inicial del medio sobre la velocidad radial y la densidad de crecimiento en el cultivo superficial de *B. theobromae* RC1 con el objetivo de conocer su fisiología en medio sólido y con vistas a iniciar los estudios de producción de ácido jasmónico por fermentación en estado sólido.

Dirección para correspondencia:

Dr. Felipe Eng Sánchez
 Instituto Cubano de Investigaciones de los derivados de la Caña de Azúcar (ICIDCA)
 Vía Blanca y Carretera Central #804
 PO Box 4026, CP 11000
 San Miguel de Padrón
 Ciudad de La Habana, CUBA
 Fax: +53 798 82 43
 E-mail: feng@icidca.edu.cu

Aceptado para publicación el 5 de septiembre de 2003

Materiales y métodos

Microorganismo. El presente trabajo se llevó a cabo con una cepa de *B. theobromae* identificada como RC1, procedente de la colección de cepas del Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales de Agricultura Tropical (INIFAT), La Habana, Cuba. La cepa fue aislada de residuos de naranja (*Citrus cinensis* Osbeck cv Valencia) y crecida en tubos inclinados con medio agar extracto de malta, EMA (Merck) durante tres días a 25 °C. La cepa se conservó en los tubos inclinados con EMA a una temperatura de 4 °C, sembrándose cada 4 semanas, y en las mismas condiciones, a lo largo de seis meses. Concluido este tiempo, se sembró en residuos de naranja para regenerar sus propiedades de patogenicidad y de producción de ácido jasmónico.

Inóculo. El inóculo se obtuvo de cultivos superficiales en cajas Petri de 100 mm de diámetro, conteniendo 25 ml de EMA, inoculadas por estría con micelio de *B. theobromae* RC1, incubando durante tres días a 30 °C (temperatura a la cual se favorece la producción de ácido jasmónico en cultivo sumergido [4]).

Medios de cultivo. Los experimentos llevados a cabo para los estudios de la fisiología de *B. theobromae* RC1 fueron realizados con los siguientes medios: Patata Dextrosa Agar, PDA (Bioxon), Czapek (Bioxon), EMA (Merck) y un medio sintético (MP), siendo su composición (en g/l): sacarosa, 50; NaNO₃, 0,2; KH₂PO₄, 0,2; MgSO₄·7H₂O, 0,2; FeSO₄·7H₂O, 0,2; KCl, 0,1; ZnSO₄·7H₂O, 0,01; MnSO₄·7H₂O, 0,001; CuSO₄·5H₂O, 0,001; Na₂MoO₄·2H₂O, 0,001; Agar Bacteriológico 10, (Bioxon); pH 5,5-5,6. El pH fue ajustado con NaOH 1 M. Los ensayos se hicieron en cajas Petri 100 x 15 mm. Las variables estudiadas para la cepa fueron: temperatura de incubación, medios de cultivo y pH inicial del medio de cultivo. Para el estudio de la temperatura de incubación se ensayaron diferentes valores (26, 30, 35, y 40 °C) dentro del intervalo óptimo de crecimiento de *B. theobromae* según se describe en la literatura [11-13], y para el pH los siguientes valores iniciales: 5; 5,6; 7; 8; 9 y 10.

Velocidad radial de crecimiento. Para determinar la velocidad radial de crecimiento de las cepas estudiadas se realizó la medición de la longitud del radio de la colonia cada 12 h hasta el momento en que las cepas invadieron toda la caja. Para calcular la velocidad radial de crecimiento se utilizó la ecuación enunciada por Trinci [2] y Pirt [1], en la cual el radio de la colonia es una función lineal del tiempo, y la pendiente se define como la velocidad radial de crecimiento. Los valores de las pendientes se calcularon en la fase de crecimiento constante, obteniendo de esta manera sus unidades de longitud por tiempo y en mm/día.

Densidad de crecimiento (ρ_x). La biomasa fue estimada al tiempo final de los experimentos y el procedimiento se llevó a cabo fundiendo el medio de agar con el hongo en agua destilada y filtrando el residuo sólido sobre papel Whatman 41 (seco y previamente pesado), con posterior secado en estufa a 60 °C durante 24 horas. La diferencia entre el peso final y el peso inicial, dividido por el área de la colonia corresponde a la densidad de crecimiento (ρ_x) expresada en mg/cm².

Análisis estadístico. Para determinar si existían diferencias significativas entre las diferentes variables, se realizó un análisis de la varianza con un nivel de signifi-

cación de 0,01 ($\alpha = 0,01$). Los datos fueron analizados con el uso de la prueba Tukey con un nivel de significación de 0,05 ($\alpha = 0,05$) [10]. Los análisis de varianza y regresión lineal se realizaron con el paquete estadístico Statgrafic Statistical Graphics System.

Resultados

Efecto de la temperatura y el medio de cultivo. En la tabla 1 se muestran los diferentes valores de velocidad de crecimiento radial y densidad de crecimiento en función de la temperatura y de los medios de cultivos ensayados. Puede apreciarse que a 40 °C *B. theobromae* RC1 no presentó crecimiento alguno en ninguno de los medios utilizados. Para las demás temperaturas, y en cada uno de los medios, no se observaron diferencias significativas en las velocidades de crecimiento radial, y sí en los valores de densidad de crecimiento. Éstos eran máximos a 30 °C en todos los medios, encontrándose también a 35 °C valores altos. Los medios más ricos para el crecimiento de *B. theobromae* RC1 fueron PDA y EMA, en este orden, obteniéndose la mayor densidad de crecimiento con el medio EMA (5,418 mg/cm²).

Tabla 1. Efecto de la temperatura y el medio de cultivo en las velocidades de crecimiento radial (VRC) y la densidad de crecimiento (ρ_x) de *Botryodiplodia theobromae* RC1.

| Medio | Temperatura (°C) | VRC (mm/día) | ρ_x (mg/cm ²) |
|-----------------|------------------|---------------------|--------------------------------|
| Czapek | 26 | 11.550 ^a | 1.243 ^c |
| | 30 | 14.048 ^a | 1.632 ^a |
| | 35 | 14.260 ^a | 1.291 ^b |
| | 40 | 0 ^b | 0 ^d |
| Czapek (pH=5.6) | 26 | 13.951 ^a | 1.314 ^b |
| | 30 | 14.273 ^a | 1.632 ^a |
| | 35 | 13.985 ^a | 1.291 ^b |
| | 40 | 0 ^b | 0 ^c |
| EMA | 26 | 13.680 ^a | 2.712 ^c |
| | 30 | 12.318 ^a | 5.418 ^a |
| | 35 | 12.218 ^a | 3.860 ^b |
| | 40 | 0 ^b | 0 ^d |
| MP | 26 | 13.835 ^a | 0.686 ^c |
| | 30 | 10.798 ^a | 1.735 ^a |
| | 35 | 11.974 ^a | 1.448 ^b |
| | 40 | 0 ^b | 0 ^d |
| PDA | 26 | 12.972 ^c | 1.850 ^c |
| | 30 | 12.317 ^a | 3.675 ^a |
| | 35 | 11.985 ^b | 3.072 ^b |
| | 40 | 0 ^b | 0 ^d |

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$)

Efecto del pH inicial. El pH del medio de cultivo es uno de los factores más importantes que influyen sobre el crecimiento de los microorganismos. Para determinar el efecto del pH sobre la velocidad de crecimiento radial y la densidad de crecimiento de la cepa en estudio se seleccionó el EMA como medio de cultivo y una temperatura de 30 °C, condiciones de cultivo óptimas determinadas previamente. El pH se evaluó en un rango de 5 a 10. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 2. Puede observarse que tanto la velocidad de crecimiento radial como la densidad de crecimiento no son significativamente diferentes en el rango de pH estudiado.

Tabla 2. Efecto del pH inicial del medio de cultivo en la velocidad radial de crecimiento (VRC) y la densidad de crecimiento (ρ_x) de *Botryodiplodia theobromae* RC1

| pH inicial | VRC (mm/día) | ρ_x (mg/cm ²) |
|------------|---------------------|--------------------------------|
| 5,0 | 13,032 ^a | 5,573 ^a |
| 5,6 | 13,048 ^a | 5,779 ^a |
| 7,0 | 13,075 ^a | 5,890 ^a |
| 8,0 | 13,062 ^a | 5,897 ^a |
| 9,0 | 13,065 ^a | 5,880 ^a |
| 10,0 | 13,102 ^a | 5,567 ^a |

* Medias con la misma letra no son significativamente diferentes de acuerdo con la prueba de Tukey ($\alpha=0,05$)

Discusión

Los valores de velocidad de crecimiento radial de *B. theobromae* RC1 expresados en la tabla 1, evidencian que estas velocidades son, en promedio, muy similares en el intervalo de 26 a 35 °C. Este comportamiento pudiera explicarse sobre la base de que posiblemente esta variable no provoca cambios fisiológicos en el crecimiento sobre la superficie de la caja, permitiendo un incremento similar en el radio de la colonia. Sin embargo, a temperaturas superiores a 35 °C se comienza a limitar el desarrollo del micelio hasta que se hace nulo a 40 °C.

La densidad de crecimiento de *B. theobromae* RC1 fue máxima a 30 °C en todos los casos, resultado que no coincide con lo encontrado por Verma y Singh [11], quienes describen un mayor crecimiento miceliar a 27 °C con una determinada cepa, y un rango de crecimiento entre los 18 y 39 °C. Sin embargo, Uduebo [12] describe el aislamiento de una cepa de este hongo, donde el crecimiento miceliar es más favorable a los 30 °C, siendo pobre a 20 y 35 °C. También, Nwufu y Mba [13] encontraron que la cepa aislada por ellos presentó un rango óptimo de crecimiento entre los 30 y 35 °C, pudiendo crecer entre los 10 y 40 °C.

Un análisis del efecto de la temperatura en cada medio en la velocidad de crecimiento radial y la densidad de crecimiento muestra que la velocidad a la que se expande la colonia es similar, en promedio, en todas las temperaturas ensayadas (excepto a 40 °C), mientras que para la densidad de crecimiento se alcanzó el valor máximo a 30 °C. Este comportamiento podría explicarse por una mayor ramificación de las hifas a dicha temperatura, permitiendo de esta forma la producción de más biomasa en la misma área de medio [14].

Las velocidades de crecimiento radial mostraron valores entre 10 y 14 mm/día, lo cual indica que es un hongo de crecimiento relativamente rápido si lo comparamos con microorganismos de crecimiento lento como, por ejemplo, los hongos micorrícicos. Volke [15] describe en un estudio con las cepas *Suillus granalatus* H13, *Amanita rubescens* H38 y *Pisolithus tinctorius* P3 velocidades de crecimiento radial entre 1,60 y 2,90 mm/día, siendo de 3,367 mm/día a 25 °C para *Gibberella fujikuroi*. Los valores de velocidad de crecimiento radial obtenidos para *B. theobromae* RC1 podrían resultar beneficiosos para la producción de ácido jasmónico por fermentación en estado sólido, permitiendo que no se produjeran contaminaciones con otros microorganismos.

Por otro lado, el crecimiento de *B. theobromae* RC1 no varió de manera apreciable por el pH del medio de cultivo para el rango de estudio, como se observa en la tabla 2. Los resultados anteriores concuerdan con los descritos por Yaguchi y Nakamura [16], donde el efecto del pH del medio en el crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* en PDA no fue significativo, mostrando un buen crecimiento en un rango de pH de 4 a 10. Sin embargo, Gabr y colaboradores [9] describen dos cepas de *B. theobromae* que crecieron en medio líquido Czapek con cloruro de amonio como fuente de nitrógeno y suplementado con extracto de levadura en un rango de pH de 3 a 9, observándose dos máximos de crecimiento a pH 4 y 8. Hewitt y colaboradores [17] observaron dos máximos de crecimiento en hongos de esta especie crecidos en PDA, el primero se presentó en un rango de pH entre 4,5 y 5, y el otro a 7,1. Con anterioridad, Tandon y Srivastava [18] habían encontrado que este hongo cultivado en un medio similar, pero con nitrato de sodio, crecía en un rango de 6 a 9 de pH, con un óptimo de 7,6.

Conclusiones

Las temperaturas ensayadas no afectan de manera significativa las velocidades de crecimiento radial de *B. theobromae* RC1. Para el medio de EMA y a una temperatura de 30 °C se obtiene la mayor densidad de crecimiento de *B. theobromae* con respecto a las demás condiciones experimentales ensayadas. El pH inicial del medio de EMA, a una temperatura de 30 °C, no influyó de forma significativa en la densidad de crecimiento o la velocidad de crecimiento radial de *B. theobromae* RC1.

Bibliografía

1. Pirt SJ. Principles of microbes and cell cultivation. London, Blackwell Scientific Publications Ltd. Oxford, 1975.
2. Trinci APJ. A kinetic study of the growth of *Aspergillus nidulans* and other fungi. J Gen Microbiol 1969; 57:11-24.
3. Husain A, Ahmad A, Agrawal PK. (-)-Jasmonic acid, a phytotoxic substance from *Botryodiplodia theobromae*: Characterization by NMR spectroscopic methods. J of Natural Products. 1993; 56: 2008-2011.
4. Eng F, Gutiérrez-Rojas M, Favela-Torres E. Culture conditions for jasmonic acid and biomass production by *Botryodiplodia theobromae* in submerged fermentation. Process Biochemistry 1998; 33: 715-720.
5. Almeida G, Klibansky M, Altuna B, Eng F, Legra S, Armenteros M. Some considerations about the using of carbon sources in the production of jasmonic acid. Rev Iberoam Micol 1999; 16: 166-169.
6. Goos RD, Cox EA, Stotzky G. *Botryodiplodia theobromae* and its association with *Musa* species. Mycology 1961; 53: 262-277.
7. Webster RK, Hewitt WE, Satour MM. Studies in *Diplodia* and *Diplodia*-like fungi. Effects of carbon:nitrogen ratio on growth, pycnidia and pycnidiospores formation. Hilgardia 1971; 4: 95-104.
8. Peterson GW. Disease of russian-olive caused by *Botryodiplodia theobromae*. Planta Disease Reporter 1976; 60: 490-494.
9. Gabr MR, Saleh OI, Nour AH, Shehata ZA. *Botryodiplodia* fruit rot of pear fruits, some physiological and pathological studies. Ann Agric Sci 1990; 35: 427-443.
10. Grepe N. Experimentos de un solo factor: análisis de varianza. En: Mongotmery DC (Ed.) Diseño y análisis de experimentos. México DF, Grupo Editorial Iberoamericana, SA de CV, 1991: 70-71.
11. Verma OP, Singh RD. Epidemiology of mango dieback caused by *Botryodiplodia theobromae* Pat Ind J Agric Sci 1969; 40: 813-818.
12. Uduebo AE. Effect of high temperature on the growth, sporulation and pigment production of *Botryodiplodia theobromae*. Can J Botany 1974; 52: 2631-2634.
13. Nwufo MI, Mba PC. Studies on the post-harvest rots of african breadfruit (*Treculia africana*) seeds in Nigeria. International Biodeterioration 1988; 24: 17-23.
14. Righelato RC. Growth kinetics of mycelial fungi. In: Smith JE, Berry DR (Eds.) The Filamentous Fungi. Volume 1: Industrial Mycology. London, Edwards Arnold Publishers Ltd, 1974.
15. Volke T. Fisiología de hongos productores de reguladores del crecimiento vegetal. En: Tesis de maestría en Biotecnología. Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, México DF, 1995.
16. Yaguchi Y, Nakamura S. Stem-end rot of papaya and its pathogens. Ann Phytopathol Soc Japan 1992; 58: 30-36.
17. Hewitt WB, Webster RK, Satour MM. Studies in *Diplodia* and *Diplodia*-like Fungi. Effect of pH, temperature, light and vitamins on certain taxonomic characters. Hilgardia 1971; 41: 81-94.
18. Tandon RN, Srivastava MP. Influence of hydrogen-ion concentrations on the utilization of sodium nitrite by *Diplodia typhina* sacc and *Botryodiplodia theobromae* Pat Current Science 1963; 1: 35-36.