

## Cultivo *in vitro* de *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht. ex Fr.), efecto de diferentes fuentes de carbono sobre su desarrollo

B. ÁLVAREZ y J. A. TORÉS

Se describe el medio empleado en nuestro laboratorio para el cultivo *in vitro* de *S. fuliginea*, agente causante del oídio del melón, que es una simplificación de los utilizados por otros autores. Se han ensayado diferentes fuentes de carbono en el mismo, sin que se aprecien diferencias entre ellas, excepto la maltosa que mantiene verde el sustrato durante más tiempo y la sacarosa, que favorece el crecimiento del parásito y la formación de raíces.

B. ÁLVAREZ y J. A. TORÉS: Estación Experimental «La Mayora», C.S.I.C. Algarrobo-Costa, 29750 Málaga.

**Palabras clave:** *Sphaerotheca fuliginea*, cultivo *in vitro*, fuentes de carbono, supervivencia, hongos biotrofos.

### INTRODUCCIÓN

La técnica de cultivo de hongos biotrofos sobre material vegetal vivo mantenido en cultivo axénico no es nueva ni original; hay abundantes citas sobre el desarrollo de parásitos estrictos en hojas mantenidas en supervivencia. A final de los años 80, MOLOT *et al.* (1987) tomaron esta idea para el cultivo de oídio mediante el depósito de hojas de diferentes cucurbitáceas (especialmente melón y calabacín), en bocales de vidrio estériles con un medio nutritivo adecuado. Sobre estas hojas conservadas en condiciones de laboratorio se podían mantener las colonias de oídio que crecían sobre las mismas. El medio utilizado era una modificación del medio de Murashige y Skoog, con la adición de determinadas vitaminas para estimular la formación de raíces. La dificultad de preparación del medio, el trabajar con hojas adultas de tamaño considerable, y el hecho de necesitar hojas de cucurbitáceas completamente libres de oídio, hacían esta técnica bastante engorrosa.

BERTRAND (1988; 1991) simplificó enormemente este método mediante el empleo de cotiledones, que requieren menor espacio (se pueden mantener fácilmente en placas Petri de tamaño pequeño) y se obtienen más rápidamente, ya que los cotiledones se forman en cuatro-cinco días, mientras que las hojas adultas requieren más de diez días. Ésto no sólo nos permite obtener el material más rápidamente, sino también reducir las probabilidades de que lleguen al laboratorio ya infectadas con oídio. Además utilizó un medio de supervivencia más sencillo de preparar, formado por azúcares, antibióticos, fungicidas, benzimidazol y las soluciones de Knop, en medio con agar.

Cuanto más rico en nutrientes es un medio nutritivo, más fácilmente crecen en él microorganismos contaminantes, por lo que se hace necesario encontrar un medio lo suficientemente rico para que permita el mantenimiento de los cotiledones y el desarrollo del oídio, pero que al mismo tiempo, no se contamine fácilmente. En este mismo sentido, la desinfección del material vegetal debe

ser lo bastante enérgica para eliminar la flora indeseable, pero también lo suficientemente suave como para no dañar a los cotiledones, ya que las contaminaciones suelen ser frecuentes en el material que se ha desinfectado de un modo demasiado enérgico.

El objetivo de este trabajo es doble: en primer lugar, tratar de simplificar aún más el medio descrito por Bertrand, de modo que en lugar de añadir antibióticos y fungicidas, que podrían interferir en el desarrollo del hongo, se supriman nutrientes, para reducir en lo posible el crecimiento de la flora indeseable. En segundo lugar, comprobar el efecto de diferentes azúcares como fuentes de carbono sobre el mantenimiento de cotiledones de pepino *in vitro* y estudiar el efecto de estas fuentes de carbono sobre el crecimiento de *S. fuliginea* y sobre la flora saprofita en estas condiciones.

## MATERIAL Y MÉTODOS

El medio descrito y utilizado por F. Bertrand (1991) para el mantenimiento de cotiledones, fue simplificado hasta dejarlo del modo siguiente: azúcar, 40 g; agar-agar, 10 g; benzimidazol, 30 mg por litro de medio.

Las modificaciones más importantes fueron: suprimir las soluciones de Knop que favorecen la aparición de bacterias y otros microorganismos y no parecían estimular la emisión de raíces por el cotiledón. También se suprimieron los antibióticos (pimaricina y cloranfenicol) y los fungicidas porque podían alterar el desarrollo del hongo. En nuestros ensayos se probaron seis fuentes de carbono: tres disacáridos, (sacarosa, maltosa y galactosa), dos monosacáridos (fructosa y glucosa) y un polialcohol (manitol), todos a la misma concentración de 40 g/l.

Se pusieron a germinar semillas de pepino cv. «Mustang», a 25 °C y a la oscuridad durante 24 horas, con objeto de que el tamaño fuese lo más uniforme posible. Se sembraron sobre sustrato hortícola en una bandeja de semillero, cubierta con una estructura de madera forrada con plástico para impedir

que se infectasen de oídio (fig. 1). A los cinco días se cortaron los cotiledones que se desinfectaron durante dos minutos en una solución acuosa de  $\text{Cl}_2\text{Hg}$  al 0,1%, se lavaron dos veces en agua destilada estéril, se dejaron secar sobre papel de filtro estéril y se depositaron en placas de Petri con el medio correspondiente. Todo el proceso de desinfección, lavado, secado y puesta sobre el medio se realizó en condiciones estériles, en cabina de flujo laminar.

Se utilizaron cotiledones de pepino para el cultivo de oídio *in vitro*, por dos razones: una, su alta susceptibilidad al oídio y dos, porque toleran bien la desinfección y el mantenimiento en cultivo axénico (ÁLVAREZ, 1993).

Se inocularon los cotiledones con un aislado monospórico de *S. fuliginea* y se mantuvieron en una estufa a 26 °C, fotoperíodo de 12 horas de luz/12 de oscuridad y una intensidad luminosa de 25  $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$  (unos 2.000 lux), condiciones óptimas para el desarrollo de *S. fuliginea* (ÁLVAREZ, 1993). La inoculación se realizó depositando cuatro conidios en cada cotiledón mediante un pelo de pestaña con ayuda de una lupa binocular.

A los quince y treinta días de la inoculación, se midieron los siguientes parámetros:

1. Emisión de raíces. Una parte de los cotiledones depositados en el medio forman raíces, con lo que el cotiledón suele mantenerse vivo durante más tiempo.

2. Color del cotiledón. Los cotiledones amarillean en el medio y el oídio crece mal en estas condiciones. El grado de amarilleo fue medido de acuerdo con la siguiente escala: 0 (completamente verde); 1 (menos del 20% de la superficie amarilla); 2 (verde, con el 21-40 % amarillo); 3 (50% verde, 50% amarillo); 4 (60-80% amarillo); y 5 (completamente amarillo). Para atenuar las diferencias se hizo la transformación  $y = \log(x+1)$ , con la cual se establecieron las diferencias significativas, aunque en las tablas se expresa el tanto por ciento real de amarilleo.

3. Crecimiento del oídio. Se midió el porcentaje de la superficie del cotiledón cubierta por la colonia del hongo.



Fig. 1.—Semilleros utilizados para la obtención de cotiledones de cucurbitáceas. En segundo plano aparece la cubierta empleada para evitar la contaminación por oídio de las pántulas.



Fig. 2.—Cotiledones de pepino tras una semana de crecimiento en medio con maltosa, sin inocular. Nótese el color verde y la emisión de raíces.



Fig. 3.—Diferente intensidad de amarillo de cotiledones de pepino en medio con sacarosa.



Fig. 4.—Desarrollo de colonias de oídio sobre cotiledones de pepino en medio con sacarosa. Se depositaron cuatro conidios en cada cotiledón.

4. Contaminación del medio. En las placas de Petri, con una humedad relativa cercana al 100 %, bacterias y hongos saprofitos suelen crecer con rapidez. Se evaluó el número de placas de Petri contaminadas en cotiledones inoculados y sin inocular.

En los análisis de varianza se calculó el porcentaje de variación como  $pv = (SCF/SCT) \times 100$ , donde SCF es la suma de cuadrados del factor considerado y SCT es la suma de cuadrados total. Este pv indica el tanto por ciento de variabilidad atribuible a dicho fac-

tor. Cuando dicho porcentaje es significativo al 0,05 % se acompaña del signo \*.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el medio con manitol no se pudieron mantener los cotiledones; a los tres o cinco días después de depositarlos, éstos se ponían amarillos y se secaban irremediamente, sin que pudiese crecer el oídio; por esta razón no aparece en los cuadros. Bertrand (1991) lo utiliza mezclado con otra fuente hidrocarbónica, para aumentar la presión osmótica del medio y mantener vivo el cotiledón durante más tiempo.

### Emisión de raíces

El hecho de que los cotiledones emitan raíces en el medio, indica que se van a conservar mejor, y por lo tanto, un mejor crecimiento del oídio (fig. 2). Alrededor del 40% de los cotiledones emitieron raíces en el medio de cultivo a los quince días y del 60% a los treinta días (cuadro 1), resultados similares a los obtenidos cuando al medio se le añadían las soluciones de Knop (datos no publicados). Cuando el cotiledón estaba inoculado de oídio, el porcentaje no llegó al 10%, excepto para el medio con glucosa a los 30 días, donde el porcentaje de cotiledones con raíz difería significativamente del resto. En los cotiledones inoculados la emi-

sión de raíces fue muy irregular, a veces solamente uno de los dos cotiledones de cada placa de Petri las emitía. Como se observa en la tabla, el porcentaje de variación explicado por este factor es muy bajo, del 1-2%, excepto para los cotiledones sin inocular a los 30 días.

### Color del cotiledón

Es interesante destacar que los cotiledones no se pusieron amarillos en el medio con maltosa. En el resto de azúcares los cotiledones presentaban entre 20-40% de amarilleo a los quince días y sobre el 50% a los treinta. Por tanto, la maltosa es una fuente nutritiva muy adecuada para el mantenimiento de cotiledones y el cultivo *in vitro* de hongos biotrofos.

Aunque en nuestros ensayos todos los cotiledones eran de la misma edad y estaban sujetos a las mismas condiciones ambientales, hay otros factores que tienen influencia sobre el amarilleo de los mismos: a) la edad del cotiledón, cuanto más jóvenes, más verdes se mantienen y b) la intensidad luminosa, de manera que a mayor intensidad, más amarilleo.

### Crecimiento del oídio

El crecimiento del oídio fue más rápido sobre sacarosa, que a los 15 días presentaba

Cuadro 1.-Tratamientos

	Inoculados		No inoculados	
	15 días	30 días	15 días	30 días
Sacarosa	7% a	8% a	40% a	58% a
Maltosa	8% a	9% a	50% a	64% a
Galactosa	2 % a	2% a	42% a	61% a
Fructosa	1 % a	3% a	45% a	62% a
Glucosa	4 % a	15% b	40% a	54% a
	pv=2 %	pv=35 % *	pv=1%	pv=1%

\* Significativo al 0,05%.

diferencias significativas con respecto al crecimiento sobre los cotiledones mantenidos en otras fuente de carbono (cuadro 3). En el resto de medios con otros azúcares, el crecimiento fue algo más lento, pero al cabo de treinta días se igualaban todos, de modo que alrededor de 50 % de la superficie de los cotiledones estaba ocupada por el patógeno.

**Contaminación del medio**

El método de desinfección fue adecuado; ninguna placa Petri resultó contaminada durante este proceso, en las placas no inoculadas no se observó crecimiento y como hemos visto, los cotiledones se mantuvieron en buenas condiciones. Sin embargo, al ser inoculados, una buena parte de ellos presentaron algún tipo de crecimiento de microorganismos. Lógicamente, no se desinfectaron las esporas de oídio, aunque sí lo hayan hecho algunos autores (MOLOT *et al.*, 1987), pero el proceso es tan laborioso y delicado que no merece la pena efectuarlo. Por esta razón, un buen número de cultivos se contaminan, en estas condiciones no es raro encontrar bacterias y hongos de los géneros *Penicillium* y *Cephalosporium* sobre las colonias de *S. fuliginea* y también sobre el medio de cultivo. De igual modo, al volver a abrir la placa para inocular los cotiledones, se expone al ambiente y aumenta el riesgo de contaminación; el medio con sacarosa fue el que se contaminó más fácilmente.

**Cuadro 2.-Porcentaje de amarilleo de los cotiledones según la fuente de carbono.**

	15 días	30 días
Sacarosa	21-40 % a	50 % a
Maltosa	0 % b	0 % b
Galactosa	21-40 % a	50 % a
Fructosa	21-40 % a	21-40 % a
Glucosa	21-40 % a	50 % a
	pv = 7% *	pv = 27% *

\* significativo al 0,05%.

**Cuadro 3.-Superficie de los cotiledones cubiertos por oídio.**

	15 días	30 días
Sacarosa	35 % a	50 % a
Maltosa	16 % b	40 % a
Galactosa	19 % b	41 % a
Fructosa	21 % b	47 % a
Glucosa	21 % b	39 % a
	pv = 7 % *	pv = 0 %

\* significativo al 0,05%.

**CONCLUSIONES**

Estos medios tan simples permiten un buen desarrollo y mantenimiento de los cotiledones, que pueden permanecer en estas condiciones hasta seis u ocho semanas. En estas condiciones, se puede conseguir un buen crecimiento de hongos biotrofos, con las ventajas que conlleva de mantenimiento de cepas de interés y preparación de masas

**Cuadro 4.-Placas de Petri contaminadas por microorganismos**

	Placas inoculadas		Placas no inoculadas	
	15 días	30 días	15 días	30 días
Sacarosa	6/36	10/36	0/36	0/36
Maltosa	0/36	4/36	0/36	0/36
Galactosa	4/36	6/36	0/36	0/36
Fructosa	0/36	6/36	0/36	0/36
Glucosa	0/36	6/36	0/36	0/36

de inóculo. No se han observado grandes diferencias entre las distintas fuentes de carbono, tan sólo la maltosa ha sido la que mejor ha permitido el mantenimiento de los cotiledones, por lo que puede soportar un mejor crecimiento de los hongos biotrofos. En el caso concreto de *S. fuliginea*, necesita que la planta huésped esté verde y lozana, si

la hoja no está en perfectas condiciones el parásito no se desarrolla bien. También para *S. fuliginea*, nosotros utilizamos sacarosa, que aunque amarillea el cotiledón, el crecimiento es más rápido que con otros azúcares, lo que es muy útil para la multiplicación del hongo para las inoculaciones artificiales.

#### ABSTRACT

B. ALVAREZ y J. A. TORÉS, 1997: *In vitro* growth of *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht. ex Fr.). Effect of different carbon sources on its development. *Bol. San. Veg. Plagas*, **23**(2): 283-288.

Suitable culture media for *in vitro* growth of *S. fuliginea*, causal agent of cucurbits powdery mildew, are described. These are simplifications of other previously described media. No dramatic differences were found between several carbon sources, except that maltose keeps cotyledons green much longer, and that sucrose encourages the formation of roots in the cotyledons and growth of powdery mildew.

**Key words:** *Sphaerotheca fuliginea*, *in vitro* culture, carbon sources, cotyledon survival, biotrophic fungi.

#### REFERENCIAS

- ALVAREZ, B., 1993: Epidemiología de *Sphaerotheca fuliginea* (Schlecht. ex Fr.) Poll. en melón. Tesis Doctoral, Universidad de Málaga.
- BERTRAND, F., 1988: Culture and cloning methods for cucurbits powdery mildew (*Sphaerotheca fuliginea* [Schlecht. ex Fr.] Poll.) and *Erysiphe cichoracearum* DC ex Méral. *Eucarpia Cucurbitaceae* 88, Avignon (Francia), 1988: 75-76.
- BERTRAND, F., 1991: Les Oïdiums des Cucurbitacées. Maintien en culture pure, étude de leur variabilité et

- de la sensibilité chez le melon. Thèse de Doctorat, Université Paris-Sud-Orsay. N° d'ordre: 1821.
- MOLOT, P. M.; LEROUX, J. P. y FERRIÈRE, H., 1987: Les Oïdiums des Cucurbitacées. II. Mise au point d'une technique de conservation des souches en culture axénique. *Agronomie*, **7**(5): 339-343.

(Aceptado para su publicación: 28 febrero 1997).