

EFECTO DE LA NUTRICION SOBRE EL DESARROLLO VEGETATIVO Y REPRODUCTIVO DEL AGENTE DE LA MALFORMACION FLORAL Y VEGETATIVA DEL MANGO

(Effect of nutrition on the vegetative and reproductive growth of the agent of floral and vegetative malformation of mango tree)

Daniel Terao¹, Sônia M.A. Oliveira², Selma C.C. de H. Tavares³ y Delson Laranjeira²

Área de Fitossanidade, Departamento de Agronomia, Universidade Federal Rural de Pernambuco, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil

Palabras clave: *Mangifera indica*, *Fusarium subglutinans*, fisiología, nutrición.

Key word: *Mangifera indica*, *Fusarium subglutinans*, fungal physiology, nutrition.

RESUMEN

Los aspectos fisiológicos del agente causal (*Fusarium subglutinans*) de la malformación floral y vegetativa del mango (*Mangifera indica* L.) referentes a la optimización de pruebas de patogenicidad, estudios epidemiológicos y de control, permite obtener datos consistentes en ambientes controlados. Debido a que entre los aspectos fisiológicos, el factor nutricional se señala como uno de los más influyentes en el crecimiento vegetativo y reproductivo de los hongos, el presente trabajo tiene como objetivo, evaluar la influencia de seis diferentes medios de cultivo sólidos y líquidos (PDA, Avena, V-8, Armstrong, Czapeck y Extracto de mango), en el crecimiento micelial, esporulación y peso seco de dos aislamientos de *F.subglutinans* (Iso-GV de la gema vegetativa e Iso-GF de la gema floral).

Los medios que favorecieron mayores pesos secos para las 2 cepas, fueron Avena y V-8. En el medio de Avena sólido, a pesar de haberse inducido un mayor crecimiento vegetativo para Iso-GV y buen crecimiento para Iso-GF, presentó baja esporulación en ambas cepas. El medio Armstrong, sólido y líquido, favoreció la mayor esporulación. El efecto de diferentes combinaciones de fuentes de carbono (amida, fructosa, maltosa, sacarosa) y nitrógeno (asparagina, peptona, nitrato de potasio, ni-

trato de sodio) sobre el comportamiento del fitopatógeno, demostró de manera general, que ambas cepas crecieron bien vegetativamente en todas las combinaciones de carbono y nitrógeno utilizadas, siendo superior en la combinación amida-nitrato de sodio. En cuanto a la esporulación, fructosa - asparagina fue la que más estimuló la producción de conidios para GV, mientras que para GF, fue maltosa - nitrato de sodio.

SUMMARY

Physiological aspects of the causing agent (*Fusarium subglutinans*) of the floral and vegetative malformation of mango tree (*Mangifera indica* L.) related to the optimization of pathogenicity tests, epidemic and control studies, make it possible to get thorough information in controlled environments. Considering that nutrition is, among the physiological aspects, one of the most important in the vegetative and reproductive growth of fungi, the present paper aims to evaluate the influence of 6 different solid and liquid culture media (PDA, Oat-agar, V-8 juice, Armstrong, Czapeck, Mango Extract) on the micelial growth, sporulation and dry weight of 2 *F.subglutinans* isolates (Iso-GV, from the vegetative bud and the Iso-GF, from the floral buds).

Media that promoted the highest dry weights for the 2 strains were avena and V8. The solid avena medium showed a low sporulation in both strains, in spite of the fact that a greater vegetative growth for the Iso-GV and a suitable growth for Iso-GF was induced. The Armstrong medium, both solid and liquid promoted the highest sporulation. The effects of different combinations

¹ Magister de la UFRPE/DEPA/Fitosanidad, 52171-900, Recife, PE. ² Profesores de la UFRPE/DEPA/Fitosanidad, 52171-900, Recife, PE. ³ Investigadora de la EMBRAPA/SEMI-ÁRIDO, Petrolina, PE

of carbon (starch, fructose, maltose, sucrose) and nitrogen (asparagin, pepton, potassium nitrate, sodium nitrate) sources on the behaviour of the phytopathogeneous revealed in a general way that both strains had a satisfactory growth in every carbon and nitrogen

combination used, reaching their highest degree in the amida-sodium nitrate combination. As regards sporulation, fructose-asparagine was responsible for the increased production of conidia for GV, while maltosa-sodium nitrate was responsible for GF.

INTRODUCCION

La malformación floral y vegetativa del mango, es una de las enfermedades más importantes de esta planta, presentándose en la mayoría de los países productores de mango del mundo (Kumar *et al.*, 1993; Noriega-Cantú *et al.*, 1999). Por la gravedad del problema, debe destacarse su importancia económica, una situación que puede llevar a la pérdida total de la producción. La continua presencia de estas malformaciones, preocupa a los manguicultores, debido a la rápida diseminación de la enfermedad mediante el retiro de materiales de propagación vegetativa de las plantas infectadas, que no siempre presentan síntomas (Tavares, 1995). Un levantamiento realizado por la EMBRAPA/Semi-Árido (Empresa Brasileira de Investigações Agropecuárias del Semi-Árido Tropical), sobre el comportamiento de esta anomalía en la región del Submedio São Francisco, revela su presencia hasta en un 100% en algunos sectores productivos (Tavares & Lima, 1997). Según Poetz (1999), se han registrado pérdidas de producción del orden del 80% en la India y superiores al 90% en Egipto.

Apesar de haber sido señalada por primera vez, en la India, hace más de un siglo (Kumar *et al.*, 1993), ciertos aspectos fisiológicos del agente etiológico, *Fusarium subglutinans* son todavía bastante escasos.

En la fisiología fúngica, la nutrición desempeña un importante papel, por su utilidad en los estudios ligados a su metabolismo (Hawker, 1968), permitiendo realizar ensayos de selección de plantas resistentes, donde es esencial un inóculo homogéneo en alta concentración y bien distribuido sobre la superficie foliar (Mussi & Kurozana, 1996). Además, en la realización de pruebas de patogenicidad, se necesitan estudios epidemiológicos y de control, para una adecuada estandarización de la cantidad de inóculo a utilizar, situación importante en estudios genéticos-citológicos (Camargo & Kimati, 1991). Las deficiencias en la inoculación, por baja concentración de inóculo, se señalan como la principal causa de variabilidad de los datos obtenidos en experimentos bajo condiciones de ambiente controlado (Ribeiro, 1991).

Para un buen crecimiento vegetativo y reproductivo de los hongos, se deben controlar los factores nutricionales y ambientales requeridos (Cochrane, 1958). Hawker (1957), considera la nutrición aisladamente, como un factor vital en el crecimiento y reproducción de los

hongos, debido a que las exigencias nutricionales varían considerablemente entre las diferentes especies, así como entre los diferentes tipos de esporulación dentro de la misma especie.

Generalmente, la condición nutricional óptima para el crecimiento vegetativo no es necesariamente la mejor para la producción de esporas y frecuentemente inhibe la reproducción (Francelli & Kimati, 1990). En este sentido, Hawker (1968), afirma que el rango de concentración ideal de sustancias nutritivas adecuadas a la esporulación, es mucho más estrecha que para el crecimiento micelial.

Dentro de los constituyentes nutritivos, se destacan el carbono y el nitrógeno (Hawker, 1968) y según Cochrane (1958), la concentración de nitrógeno y la deficiencia o exceso de determinados minerales pueden reducir o inhibir la esporulación. De modo general, la alta concentración de nitrógeno, reprime la esporulación y está directamente ligada a la concentración de carbono. No obstante, no existen condiciones universales para el crecimiento y la reproducción de fitopatógenos (Pria *et al.*, 1997).

Considerando la escasa bibliografía sobre el asunto, el presente trabajo tiene como objetivo estudiar la influencia de diferentes medios de cultivo y la combinación de fuentes de carbono y nitrógeno, sobre el crecimiento vegetativo y la producción de conidios del agente etiológico de la malformación floral y vegetativa del mango, *F. subglutinans*.

MATERIALES Y METODOS

1) Crecimiento micelial y esporulación de *Fusarium subglutinans* sometido a diferentes medios de cultivo

Para el estudio de la influencia de diferentes medios de cultivo, líquidos y sólidos, sobre el crecimiento micelial y esporulación de *F. subglutinans*, se utilizaron dos aislamientos (Iso-GV e Iso-GF), provenientes de plantas con síntomas típicos de malformación vegetativa y foliar respectivamente.

Se usaron los siguientes medios sólidos (17g de agar/L) y líquidos: **PDA** (200g de papa; 20g de dextrosa; 1000ml de agua destilada), **Avena** (75g de avena en escamas; 20g de dextrosa; 1000 ml de agua destilada), **V-8** (200 ml de "V-8 jugo"; 3g de CaCO₃; 15g de dextrosa; 800 ml de agua destilada), **Armstrong** (20g de sacarosa;

0,4g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,6g de KCl; 1,1g de KH_2PO_4 ; 5,9g de $Ca(NO_3)_2$; 2ml de micronutrientes; 1000 ml de agua destilada), **Czapeck** (30g de sacarosa; 1g de K_2HPO_4 ; 2g de $NaNO_3$; 0,5g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,5g de KCl; 0,01g de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ y 1000 ml de agua destilada), según Menezes & Silva-Hanlin (1997) y **Extracto de mango** (200g de inflorescencia; 10g de dextrosa; 1000 ml de agua destilada).

Discos de 5mm de diámetro retirados de los bordes de las colonias del fitopatógeno con 7 días de incubación sobre PDA, fueron distribuidos asépticamente, en el centro de 5 placas de Petri, por cada cultivo ensayado en medio sólido y en 5 Erlenmeyers con capacidad de 125 ml por tratamiento, conteniendo 50 ml de medio líquido, previamente esterilizados, sometidos a agitación manual dos veces por día.

Todos los ensayos fueron incubados a temperatura de $25 \pm 2^\circ C$, bajo régimen de luz continua, evaluándose diariamente el crecimiento micelial, mientras que el peso seco micelial y la esporulación, se midió después de 10 días de incubación.

La evaluación del crecimiento micelial, consistió en la medición diaria del diámetro de la colonia en dos sentidos opuestos (con regla milimetrada). El peso seco del micelio fue obtenido pesando la masa micelial filtrada en tejido de nylon y secada en estufa a $80^\circ C$, durante 24 horas. Se evaluó la esporulación, adicionando 10 ml de agua destilada a las placas de Petri, removiendo el crecimiento fúngico con la ayuda de un cepillo de cerdas suaves, utilizando una lámina de Neubauer para la lectura de la concentración de esporas/ml (Menezes & Silva-Hanlin, 1997).

El delineamiento experimental utilizado fue enteramente al azar, en arreglo factorial 6×2 , seis medios de cultivo \times dos aislamientos de *F. subglutinans*, con 5 repeticiones por ensayo. Las medias fueron comparadas por medio del test de Tukey al 5% de probabilidad y los datos de esporulación transformados en $\sqrt{x+5}$.

2) Crecimiento micelial y producción de conidios de *Fusarium subglutinans* en combinaciones de fuentes de carbono y nitrógeno

Se combinó al medio basal (Lilly & Barnet, 1951), conteniendo 0,5g de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 1,0g de KH_2PO_4 ; 17g de agar y 1000 ml de agua destilada, 4 diferentes fuentes de carbono (amida, fructosa, maltosa y sacarosa) y 4 fuentes de nitrógeno, 2 orgánicas (asparagina y peptona) y 2 inorgánicas (nitrato de potasio- KNO_3 y nitrato de sodio- $NaNO_3$), manteniendo la proporción de 10:1 (diez partes de C para una parte de N), conforme al peso molecular de cada sustancia.

Al séptimo día del cultivo del fitopatógeno en

PDA, discos de 5mm de diámetro fueron retirados del cultivo y replicados en 5 placas de Petri, con las diferentes combinaciones C \times N, que fueron incubadas bajo régimen de luz continua, a una temperatura de $25 \pm 2^\circ C$, durante 10 días.

Se siguió la metodología anteriormente descrita, para evaluar el crecimiento micelial y la esporulación, utilizándose el delineamiento experimental enteramente al azar, en arreglo factorial $2 \times 4 \times 4$, considerándose dos aislamientos, 4 fuentes de carbono y 4 fuentes de nitrógeno. Las medias fueron comparadas por el test de Tukey al 5% de nivel de probabilidad y los datos de esporulación fueron transformados en $\sqrt{x+1}$.

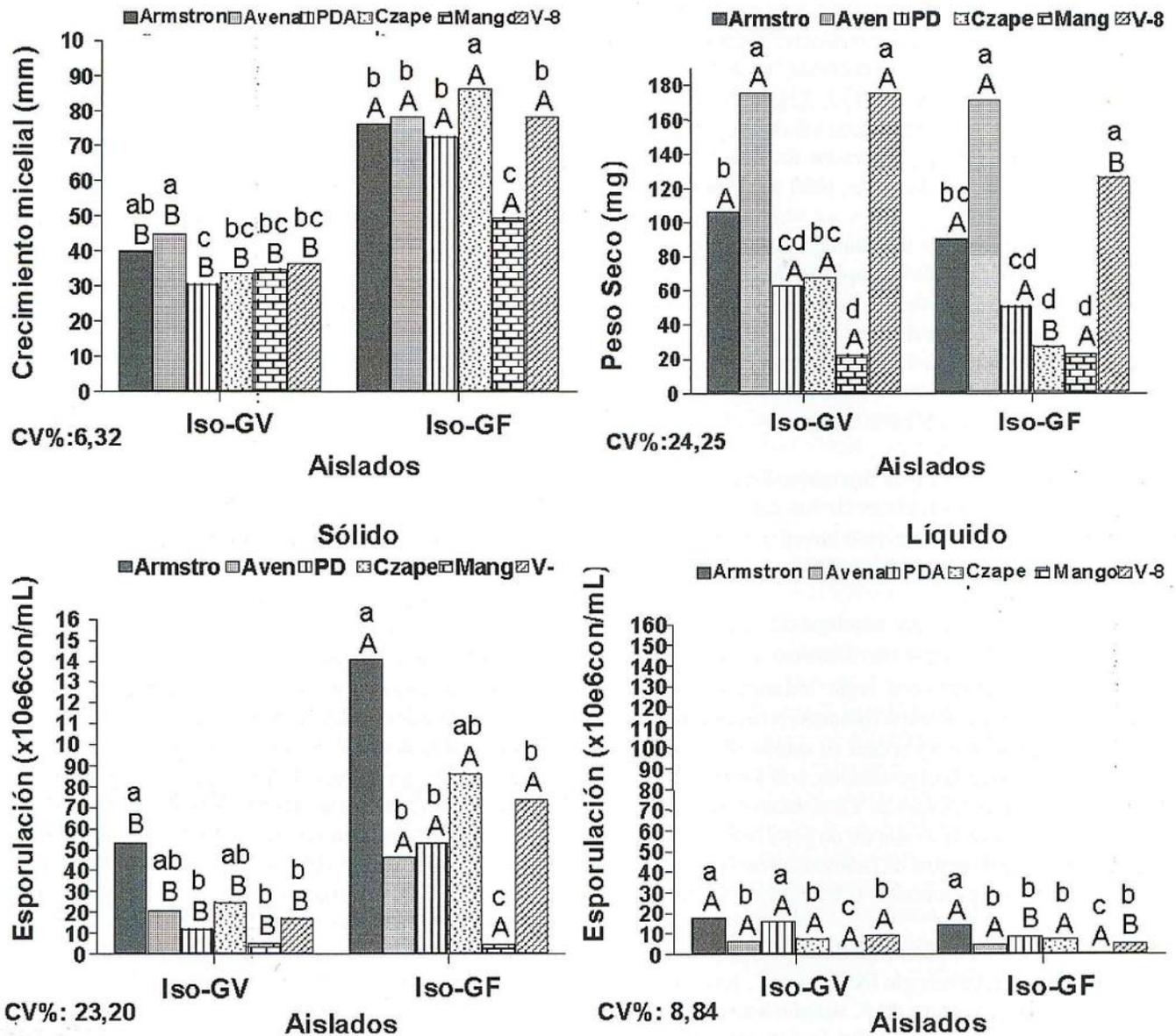
RESULTADOS Y DISCUSION

1) Crecimiento micelial y esporulación de *Fusarium subglutinans* sometido a diferentes medios de cultivo

Se observó que los medios de cultivo influían notoriamente en el crecimiento micelial y en la esporulación de *F. subglutinans*. El mayor peso seco del micelio, se obtuvo en el medio Avena y V-8 (Figura 1), difiriendo significativamente de los demás. La esporulación en estos medios líquidos, fue una de las menores, confirmando lo establecido por Henry & Anderson (1948) y Griffin (1994), que un exuberante desarrollo micelial, no siempre va acompañado por una buena producción de conidios.

El medio de cultivo más adecuado para el fitopatógeno, según Hawker (1968), sería aquel que más se asemejase al substrato natural. Los medios naturales, de acuerdo con el autor, contienen un complejo de carbohidratos que favorecen la producción de conidios. En cambio, el medio de cultivo preparado a partir del extracto de inflorescencia de mango, a pesar de presentar un crecimiento micelial razonable, en medio sólido presentó baja producción de conidios, difiriendo significativamente de los demás medios, tanto en este medio ($5,07 \times 10^6$ con/ml para GV y $4,38 \times 10^6$ con/ml para GF) como en el medio líquido ($0,51 \times 10^6$ con/ml para GV y $0,26 \times 10^6$ con/ml para GF). Es posible que alguna sustancia existente en el extracto pueda haber inhibido la esporulación del hongo (Menten & Marques, 1979).

El medio más adecuado para la esporulación fue el medio de Armstrong agarizado para GV ($54,04 \times 10^6$ con./ml) y GF ($140,84 \times 10^6$ con./ml). A pesar que el medio de Armstrong fue formulado originalmente en forma líquida (recomendado para el incremento del inóculo (Booth, 1977)), la adición de agar favoreció significativamente la producción de conidios (Figura 1). En general, los aislamientos esporularon significativamente mejor en los medios sólidos, que en los líquidos. Hawker (1968), afirma que el me-



Datos transformados en $\sqrt{x+5}$

Medias seguidas por la misma letra, mayúscula entre categorías y minúscula dentro de la categoría, no se diferencian significativamente por medio del test de Tukey al 5% de probabilidad.

Figura 1. Crecimiento micelial, peso seco y esporulación de aislados de *Fusarium subglutinans*, sometidos a diferentes medios de cultivo, a los 10 días de incubación.

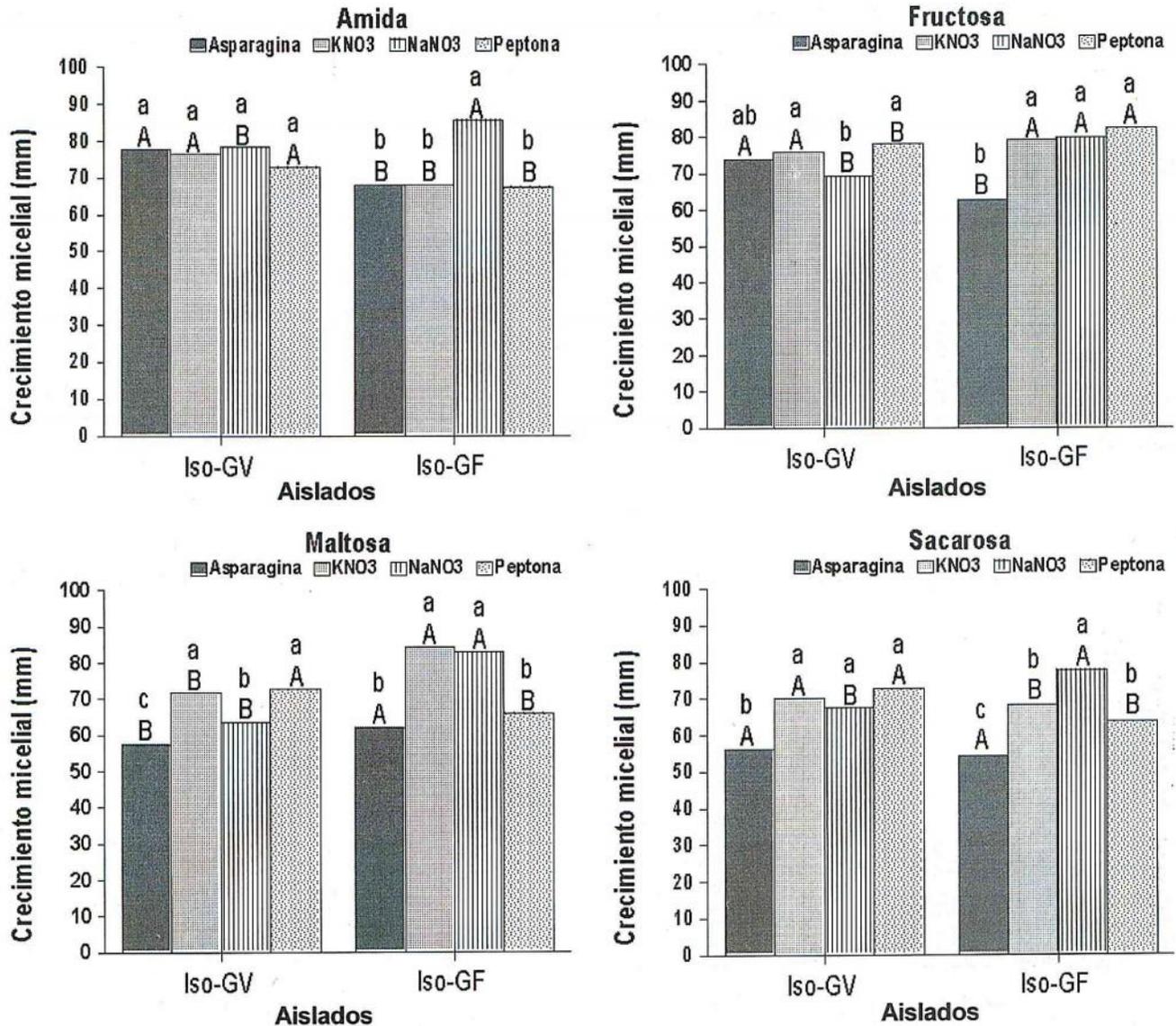
dio líquido, además de la aireación pobre, propicia la acumulación de dióxido de carbono y otros metabolitos tóxicos, que inhiben el desarrollo de los hongos, especialmente la esporulación. Dentro de los medios líquidos, el medio de Armstrong fue también, el que indujo la mayor esporulación (17,58 y 14,34x10⁶con./ml, para GV y GF, respectivamente). La mejor tasa de crecimiento micelial ocurrió en el medio Avena para GV y Czapek para GF.

Los dos aislamientos presentaron variabilidad en cuanto al crecimiento micelial y esporulación en los dife-

rentes medios, mientras Iso-GF presentó en medios sólidos un desarrollo significativamente mayor tanto vegetativo como reproductivo en comparación con Iso-GV.

2) Crecimiento micelial y producción de conidios de *F. subglutinans* en combinaciones de fuentes de carbono y nitrógeno

Las 2 cepas de *F. subglutinans* presentaron, en general, buen crecimiento micelial en todas las combina-



CV(%)=4,74

Medias seguidas por la misma letra, mayúscula entre categorías y minúscula dentro de la categoría, no se diferencia significativamente por medio del test de Tukey al 5% de probabilidad.

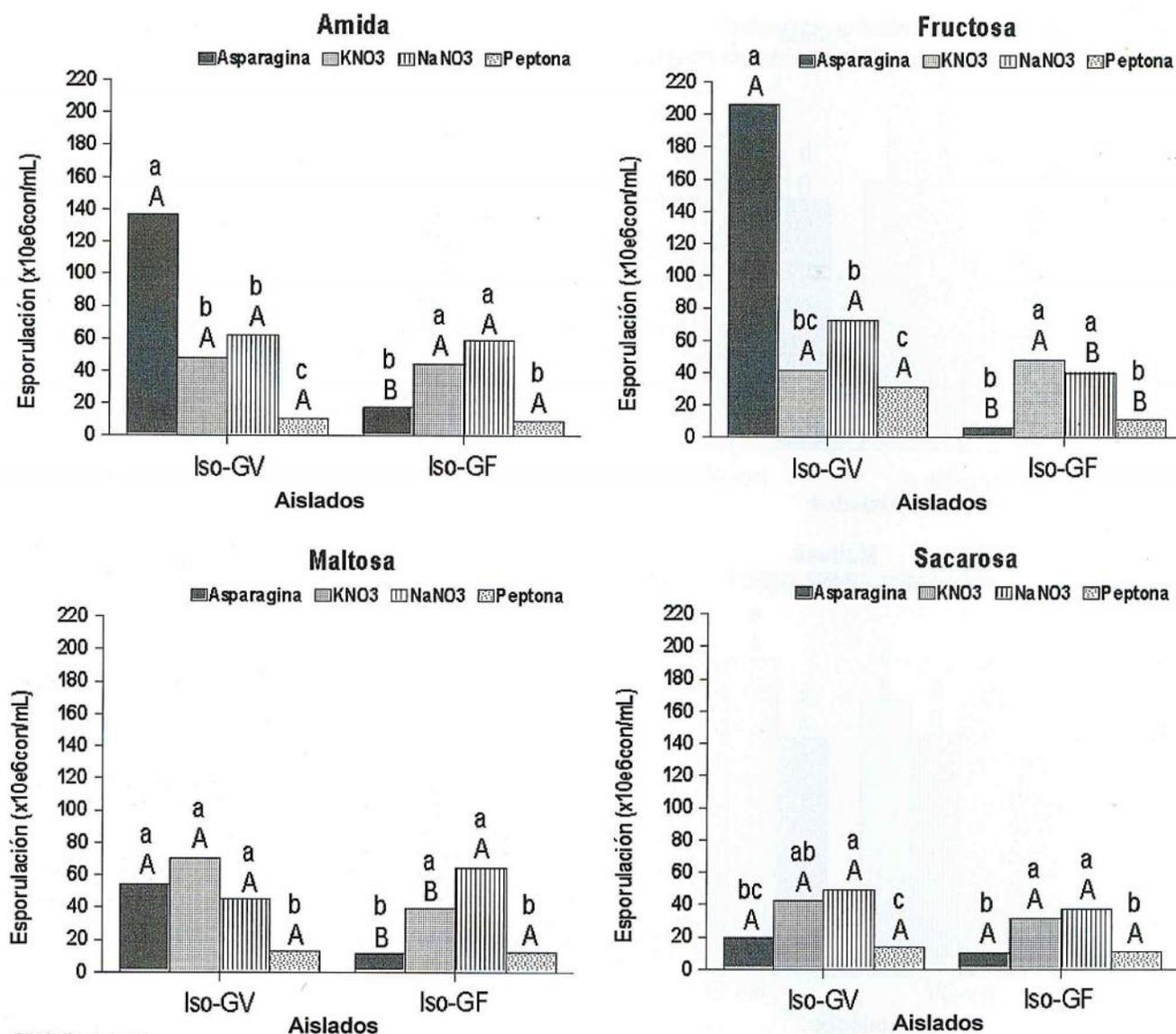
Figura 2. Crecimiento micelial de aislados de *Fusarium subglutinans* en diferentes combinaciones de fuentes de carbono y nitrógeno, después de 10 días de incubación.

ciones de C y N utilizadas, observándose que la combinación amida-nitrato de sodio produjeron mejor crecimiento micelial para Iso-GF, mientras la con menor crecimiento fue con asparagina (Figura 2).

Según Hawker (1957), la mayoría de los hongos utilizan glucosa y fructosa como principal fuente de carbono y aunque los carbohidratos complejos son menos adecuados como sustrato para la producción de estructuras vegetativas, pueden estimular la producción de esporas. La mayor producción de conidios ocurrió en el Iso-GV en la combinación fructosa-asparagina (206×10^6 con./

ml) y amida x asparagina ($136,88 \times 10^6$ con./ml). Curiosamente, estas mismas combinaciones fueron mas desfavorables a la esporulación del Iso-GF ($6,17 \times 10^6$ con./ml y $18,06 \times 10^6$ con./ml), demostrando que cada aislamiento es específico en sus requerimientos de C y N para realizar la esporulación. GF esporuló mejor cuando en las combinaciones había fuentes de carbono con nitrato de sodio (Figura 3).

Los oligosacáridos, maltosa y sacarosa propiciaron desempeños semejantes en la esporulación y crecimiento micelial a los 2 aislamientos, en las diferentes com-



CV(%)=22,86

Datos transformados en $\sqrt{x+1}$

Medias seguidas por la misma letra, mayúscula entre categorías y minúscula dentro de la categoría, no se diferencia significativamente por medio del test de Tukey al 5% de probabilidad.

Figura 3. Esporulación de aislados de *Fusarium subglutinans*, sometidos a diferentes combinaciones de fuentes de carbono y nitrógeno, después de 10 días de incubación

binaciones con fuentes de nitrógeno.

Las fuentes de nitrógeno actuaron de manera bastante específica para cada aislamiento. La asparagina fue bastante favorable para Iso-GV, contrastando su efecto desfavorable con Iso-GF en la producción de conidios en todas las combinaciones de fuentes de carbono. Por su parte, la peptona proporcionó baja esporulación para ambos especímenes en todas las combinaciones con las diferentes fuentes de carbono. Las fuentes de nitrógeno inorgánicas, nitratos de potasio y sodio, a pesar de no

presentar los mejores resultados en la esporulación, influyeron de manera general, positivamente en todas las interacciones con fuentes de carbono.

Tousson *et al.* (1960), al estudiar la influencia de la nutrición en la patogenicidad de *F. solani* f. sp. *phaseoli*, observaron que la nutrición nitrogenada incrementó el desarrollo de la enfermedad. La penetración ocurrió justo después de la formación del talo, disminuyendo el período saprofítico, mientras que la presencia de glucosa, favoreció la germinación de conidios y el desarrollo del

micelio, aunque atrasó el inicio de la patogénesis.

El medio de cultivo más adecuado para la producción de conidios en abundancia y consecuentemente de un inóculo homogéneo, fue el medio sólido de Armstrong.

Se verificó, que un crecimiento vegetativo vigoroso del hongo no produce una buena esporulación, aunque se cumplieran las exigencias nutricionales específicas para cada aislamiento.

REFERENCIAS

- Booth, C.** (1977). *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute, Kew.
- Camargo, M. & Kimati, H.** (1991). Influência de meio de cultura, luminosidade e sobreposição de papel de filtro na reprodução de *Pyrenochaeta terrestris*. Summa Phytopathologica 17:201-206
- Cochrane, V. W.** (1958). Physiology of fungi. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Fancelli, M.I. & Kimati, H.** (1990). Influência de meio de cultura e de luz fluorescente na esporulação e *Alternaria dauci*. Summa Phytopathologica 16:248-252
- Griffin, D.H.** (1994). Fungal physiology. 2. ed. John Wiley & Sons., New York.
- Hawker, L. E.** (1968). Physiology of fungi. University of London Press, London.
- Hawker, L.E.** (1957). The physiology of reproduction in fungi. Cambridge University Press, New York.
- Henry, B.W. & Anderson, A.L.** (1948). Sporulation by *Pyricularia oryzae*. Phytopathology 38:265-278
- Kumar, J.; Singh, U.S. & Beniwal, S.P.S.** (1993). Mango malformation: one hundred years of research. Annual Review of Phytopatology 31:217-232
- Lilly, V.G. & Barnett, H.L.** (1951). Physiology of the fungi. New York: McGraw-Hill.
- Menezes, M. & Silva-Hanlin, D.M.W.** (1997). Guia prático para fungos fitopatogênicos. UFRPE, Recife.
- Menten, J.O.M. & Marques, L.A.P.** (1979). Influência do inóculo, meio de cultura e regime de luz no desenvolvimento micelial e esporulação de *Mycosphaerella fragariae* (Tul.) Lind. (*Ramularia tulasnei* Sacc). Fitopatologia Brasileira 4:63-71
- Mussi, L. & Kurozawa, C.** (1996). Meios de cultura e regimes de iluminação na esporulação de *Stemphylium solani*. Summa Phytopathologica 22:19-22
- Noriega-Cantú, D.H.; Téliz, D.; Mora-Aguilera, G.; Rodríguez-Alcazar, J.; Zavaleta-Mejía, E.; Otero-Colinas, G.; Campbell, C.L.** (1999). Epidemiology of mango malformation in Guerrero, México, with traditional and integrated management. Plant Disease 83:223-228
- Pria, M.D.; Bergamin Filho, A. & Amorim, L.** (1997). Avaliação de diferentes meios de cultura na esporulação de *Colletotrichum lindemuthianum*, *Phaseoisariopsis griseola* e *Alternaria* sp. Summa Phytopathologica 23:181-183
- Ribeiro, M.J.** (1991). Caracteres morfológicos de *Isariopsis griseola* e fontes de resistência em feijoeiro. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife (Dissertação de Mestrado)
- Toussoun, T.A.; Nash, S.M. & Snyder, W.C.** (1960). The effect of nitrogen sources and glucose on the pathogenesis of *Fusarium solani* f.sp. *phaseoli*. Phytopathology 50:137-140