

Efecto del pH en el crecimiento micelial, esporulación y germinación de esporas procedentes de varios aislamientos monospóricos de *Alternaria solani*

F. IZQUIERDO

*Dpto. Fitopatología, Centro Nacional de Investigaciones Científicas,
Ciudad de la Habana, Cuba*

Recibido: 6 de octubre de 1980

Recibido: 28 de abril de 1981

ABSTRACT. It is well known that a substrate excessively acid or alkaline generally inhibit the growth and the development of the fungus species in laboratory conditions. In this paper was determined the optimal, maximal and minimal pH in the mycelial growth, sporulation and the spore germination from different monosporic isolates of the phytopathogenic *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) Jones & Grout. The optimal pH in the mycelial growth corresponded between 3,0 — 9,0, in the sporulation it was between 2,5 — 6,2 and in the spore germination between 3,0 — 7,0, the maximal was always in all the cases at 9,5 and the minimal 2,0.

RESUMEN. Es conocido que un sustrato excesivamente ácido o alcalino, generalmente impide un desarrollo adecuado de la especie fungosa que se estudia en condiciones de laboratorio. Se determinó los pH óptimos, máximos y mínimos del crecimiento micelial, esporulación de las esporas procedentes de diferentes aislamientos monospóricos del fitopatógeno *Alternaria solani* (Ell. & Mart.) Jones & Grout en condiciones controladas. Se halló que el intervalo óptimo de pH en el crecimiento micelial correspondió entre 3,0 — 9,0; en la esporulación de 2,5 — 6,2 y en la germinación de las esporas de 3,0 — 7,0, siendo el máximo y el mínimo de 9,6 y 2,0. Se presentó variabilidad en el comportamiento de los distintos aislamientos monospóricos en las diferentes fases y dentro de cada fase del ciclo de vida al sufrir variaciones el pH del sustrato.

INTRODUCCION

Es de conocimiento que, aunque un sustrato contenga todos los nutrientes necesarios, una excesiva acidez o alcalinidad puede impedir que el hongo los incorpore a su cuerpo vegetativo. Muchos hongos fitopatógenos varían su comportamiento de acuerdo a las concentraciones del

ion Hidrógeno en el sustrato sobre el cual se desarrolla, variando la escala para la mayoría de ellos entre los pH 3,0 y 8,0; con una óptima que varía considerablemente con las especies, variedades y biotipos del patógeno e igualmente la máxima y la mínima.

En ocho razas de un patógeno de la frutilla (*Dendrophoma obscurans*) Kausar (1951) encontró que se desarrollaban bien en una escala de pH que oscilaba entre 3,1 y 9,1. El crecimiento óptimo se encontraba de 4,4 a 6,2 en una raza era de 4,7; para otras seis de 5,5 y en la restante 6,2.

Kraft y Erwin (1967) estudiaron el comportamiento del crecimiento micelial de dos especies de *Pythium* al ajustar el pH del sustrato a los valores de 5,9; 6,8 y 7,8 con tampón de fosfato de potasio a las concentraciones de 0,05 M; 0,1 M y 0,025 M obteniendo el mayor crecimiento a 0,05 M.

Entre las variaciones de pH, el mayor desarrollo micelial se presentó a los valores de 5,8 y 5,9.

Charlton (1953) obtuvo buen desarrollo vegetativo en aislamientos de *Alternaria solani* a pH entre 5,5-8,0.

En la reproducción también la concentración del ion Hidrógeno en el sustrato ejerce un papel importante. Un sustrato, con todas las fuentes adecuadas para la esporulación del hongo, a veces no es eficiente al no poseer un pH adecuado en esta fase de acuerdo con la especie.

Bonde (1929) encontró que variaciones del pH en el sustrato, no producen afectaciones en la esporulación del *Alternaria solani*, en cepas tanto cromógenas como no pigmentadas, observando además que la coloración del medio producido por las cepas cromógenas varía de color al cambiar el pH del sustrato.

Charlton (1953) ajustó el pH del medio entre 6,8 y 7,0 con NaOH y CLH 0,1 N, obteniendo buenos resultados en la esporulación de este fitopatógeno.

En la germinación de las esporas fungosas, el grado de acidez del sustrato, generalmente no resulta un factor limitante durante esta fase.

Se puede asegurar que las esporas pueden germinar dentro de un amplio intervalo de pH, favoreciéndose notablemente cuando es más bajo con relación al óptimo alcanzado en el crecimiento micelial y en la esporulación.

Doran (1922) en su revisión sobre el efecto del pH durante este proceso, no menciona que éste sea un factor limitante.

Pass y Griffin (1974) obtuvieron un 90% de germinación en *Aspergillus flavus* a pH entre 3,0 y 7,5 después de 12 horas.

Los objetivos propuestos en el presente trabajo son los siguientes: Determinar el pH óptimo en el crecimiento micelial, esporulación y en la germinación de las esporas procedentes de varios aislamientos monosporicos del fitopatógeno *Alternaria solani* en condiciones de in-vitro.

Determinar la existencia de variabilidad en el pH óptimo, máximo y mínimo entre las diferentes cepas de este patógeno en las fases por la que atraviesa durante su ciclo de vida.

MATERIALES Y METODOS

Se seleccionan del cepario existente en el laboratorio de Fitopatología las cepas To. No. 1, To. No. 4, To. No. 8, To. No. 16, To. No. 23, To. No. 25 y To. No. 31 de acuerdo a determinadas características morfológicas y fisiológicas (Izquierdo, 1980).

Un total de doce concentraciones de iones Hidrógeno (pH) se probaron en un medio basal sólido, constituido por las sales presentes en el medio Czapek (Alexopoulos, 1962) la cual se le añadió nitrato de sodio 2,0 g/l como fuente nitrogenada y sacarosa 15 g/l como carbonada, tanto en la fase de crecimiento vegetativo como en la esporulación. En la germinación de las esporas se empleó el medio basal líquido

La escala del pH probado en el crecimiento vegetativo fue el siguiente: 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 5,6; 5,8; 6,0; 6,2; 6,4; 7,0; 8,0 9,0.

Los pH probados para la esporulación se hallan comprendidos entre 4,0 y 7,0, mientras en la germinación de las esporas se utilizaron pH de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 6,0; 7,0 y 8,0 ajustándose con CLH o NaOH 0,1 N en un pHmetro.

Los medios sólidos con los diferentes pH se esterilizaron en autoclave a 15 lb de presión y 121°C durante 15 minutos.

Se sembraron discos miceliales de 2,00 mm de diámetro, procedentes de la periferia de los cultivos seleccionados de 10 a 12 días en P.D.A., en los centros de las placas Petri conteniendo el medio basal sólido con los di-

ferentes pH, incubándose los cultivos $28^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ durante 12 días consecutivos.

En la esporulación las placas se incubaron a $17^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, permaneciendo 10 días bajo la luz de una lámpara fluorescente, mientras en la germinación la temperatura fue de $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ en la cámara húmeda durante 24 horas.

La evaluación del crecimiento micelial se realizó midiendo el diámetro de la zona de crecimiento (mm) cada dos días. En la esporulación se efectuaron conteos de esporas a los 8 días en áreas circulares de $2,5 \text{ mm}^2$.

Se contaron esporas germinadas y no germinadas en el proceso de germinación a las 24 horas de permanencia en la cámara húmeda.

Los cultivos se orientaron en diseños experimentales "Bloques al azar" los cuales contaban con cinco réplicas y cada una de éstas de un cultivo, mientras en la germinación se corresponde con una gota portadora de esporas.

Los datos se procesaron estadísticamente mediante la aplicación de los modelos factoriales, una vez que sufrieron las transformaciones indicadas por las expresiones matemáticas de $\sqrt{X + 0,375}$ y de arcoseno $\sqrt{X\%}$ (Snedecor, 1966) para el caso del % de germinación de las esporas.

Las medias se compararon mediante la prueba de rango múltiple de Duncan (1960).

RESULTADOS

El efecto de los diferentes pH sobre el crecimiento micelial puede observarse en la Tabla I donde se señalan los mayores crecimientos miceliales entre los pH 3,0 - 9,0, el mínimo en 2,0 y el máximo superior a 9,0.

En la Fig. 1 se muestran las variaciones de coloración del pigmento de las cepas cromógenas al presentarse diferentes pH en el sustrato donde creció.

En la Fig. 2 se expone el efecto de las variaciones de pH en la producción de esporas en cepas de *Alternaria solani*. El pH óptimo como puede observarse se halla comprendido entre 4,0 y 6,2 en la mayoría de los aislamientos probados.

TABLA I

Efecto del pH en el crecimiento micelial de aislamientos monospóricos seleccionados del fitopatógeno Alternaria solani

pH	$\bar{X}$ Original	$\bar{X}$ Transformados
2,0	0,00	0,61 c
3,0	38,68	6,25 ab
4,0	31,66	5,66 b
5,0	42,26	6,53 a
5,6	41,35	6,46 ab
5,8	42,00	6,51 ab
6,0	40,32	6,38 ab
6,2	48,48	6,99 a
6,4	44,38	6,66 a
7,0	42,00	6,51 ab
8,0	40,32	6,38 ab
9,0	38,81	6,26 ab

Medias con letras no coincidentes difieren entre sí al $p < 0,05$ (Duncan's multiple range test) E.S. $\bar{X} = 0,263$

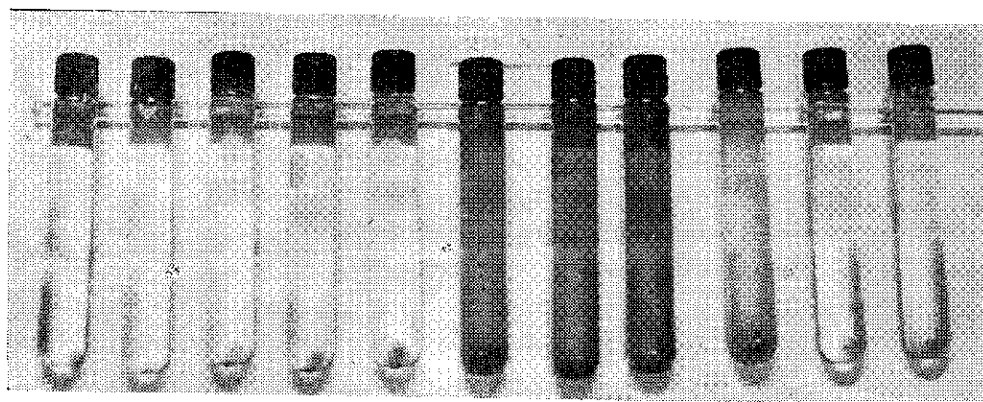


Fig. 1. En esta fig. puede observarse el cambio de coloración de las cepas cromógenas al variar el pH. De izquierda a derecha: pH 8,0; 7,0; 6,4; 6,2; 6,0; 5,8; 5,6; 5,0; 4,0; 3,0 y 2,0.

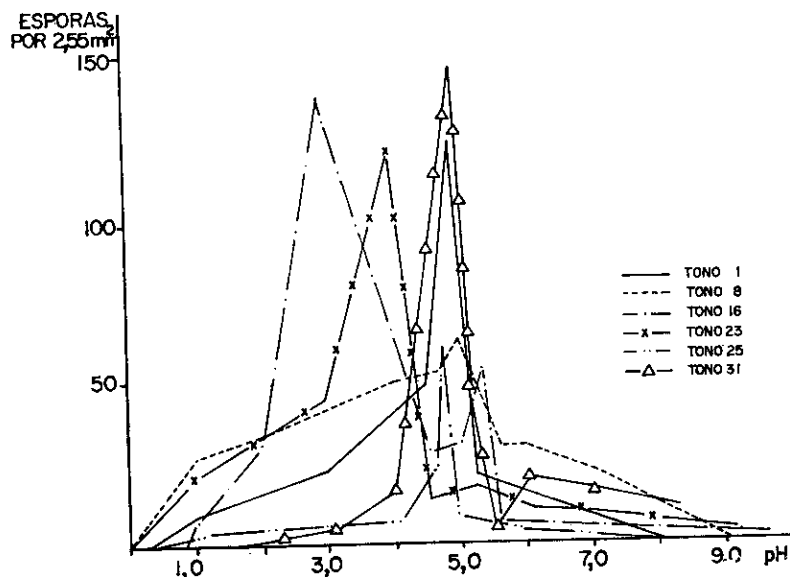


Fig. 2. Comportamiento de algunos aislamientos monospóricos de *Alternaria solani* en la esporulación al variar el pH.

Los aislamientos To. No. 8, To. No. 16, To. No. 23 y To. No. 31 alcanzaron el mayor número de esporas germinadas entre los pH 3,0 - 7,0 tal como se muestra en la Tabla II. La cepa To. No. 1 produjo mejor germinación a los pH de 5,0 a 6,0 y la To. No. 25 a pH 3,0.

DISCUSION

Como se puede observar el pH juega un importante papel en las diferentes fases por la que atraviesa este fitopatógeno.

El pH óptimo alcanzado por los aislamientos se mantuvo en el intervalo de 3,0 a 9,0, aunque Charlton (1953) informó haber obtenido un buen crecimiento vegetativo con un aislamiento de este patógeno entre 5,5-8,0, coincidiendo en parte con nuestro resultado.

Los filtrados de los aislamientos cromógenos, mostraron una notable variación de coloración cuando se modificaron los pH del sustrato donde

crecieron, concordando estas respuestas con la hipótesis emitida por Bonde (1929).

TABLA II

Comparaciones entre las medias (por ciento de esporas germ'nadas) de los aislamientos de A. Solani a distintos pH

pH	$\bar{X}$. Original	$\bar{X}$. Transformadas
2,0	4,55	12,44 a
3,0	18,80	25,70 a
4,0	17,20	24,49 a
5,0	18,05	25,14 a
6,0	14,70	22,55 ab
7,0	9,00	17,47 bc
8,0	5,90	14,03 cd
E.S. = 1,7		

Medias con letras no coincidentes difieren entre sí al $p \leq 0,05$ según dócima de rango múltiple de Duncan (1960).

El pH óptimo obtenido en la esporulación se halla comprendido entre 2,0 - 6,0, a pesar de que Charlton (1953) provocó buena esporulación a los pH de 6,8 - 7,0, no coincidiendo con nuestro resultado, estimándose la posible diferencia el de haber trabajado con un aislamiento distinto.

Los aislamientos monospóricos seleccionados presentaron variabilidad, en la esporulación de acuerdo al pH del sustrato, observándose en la Fig. 2 el pH óptimo de cada cepa. Estos resultados constituyen parte de la caracterización de los biotipos que integran los aislamientos de este fitopatógeno.

Se evidencia como el pH posee un menor efecto en la germinación de las esporas al cumplimentarse esta actividad dentro del intervalo de 3,0-7,0, lo cual resulta bastante amplio.

Es de señalar la coincidencia de los intervalos óptimos de pH para las distintas fases del ciclo de este fitopatógeno en todos los aislamientos seleccionados, hallándose sólo una ligera variación en los máximos que se extienden en el crecimiento micelial y se estrecha en la esporulación,

El crecimiento óptimo del aislamiento To. No. 16 se presentó a pH 6,0, su esporulación a 4,0 y la germinación de sus esporas entre 4,0 - 5,0 en otros aislamientos también se observaron semejantes variaciones, mostrándose con esto la posible diferenciación de cepas de este parásito con sólo cambiar el pH del sustrato en los distintos estadios de su ciclo.

CONCLUSIONES

El pH del sustrato es un factor de importancia en el desarrollo de las diferentes fases del ciclo del *A. Solani*.

Los aislamientos monospóricos de este fitopatógeno mostraron variabilidad en el crecimiento vegetativo y en la esporulación al variar el pH del sustrato donde se desarrollaron, constituyendo una forma de diferenciación entre ellos.

REFERENCIAS

- ALEXOPOULOS C. J. Introductory Mycology. Willy & Sons Ins. Copyright, 1962.
- BONDE R. Physiological strains *Alternaria solani*. *Phytopathology*, 19, 533, 1929.
- CHARLTON K. M. The sporulation of *Alternaria solani* in culture. *Brit. Mycol. Soc. Trans.* 36, 349, 1953.
- DORAN N. L. Effect of external and internal factors on the germination of fungus spores. *Bull. Torrey Bot. Club.*, 49, 313, 1922.
- DUNCAN D. R. A multiple range test. *Biometric*, 1960.
- KAUSAR A. G. Studies on the biology of *Dendrophoma obscurans* (Ellis and Everhart) Anderson D. Thesis, Univ. of Minnesota, Minneapolis, 1951.
- KRAFT J. M. AND ERWIN D. C. Effect of nitrogen sources on growth of *Pythium aphanidermatum* and *Pythium* sp. *Phytopathology*, 57, 374, 1967.
- IZQUIERDO F. Acción de diferentes carbohidratos en la esporulación de aislamientos monospóricos de *Alternaria solani* in-vitro. *Revista Cenic, Ciencias Biológicas*, 11, 1, 1980.
- PASS T. AND GRIFFIN G. J. Interaction of pH and temperature with exogenous carbon and nitrogen nutrition in conidial germination by *Aspergillus flavus*. *Phytopathology*, 64, 1151, 1974.
- SNEDECOR G. W. Y COCHRAN W. G. Métodos estadísticos aplicados a la investigación agrícola y biológica. Cía. Edit. Continental S. A., México, 2da. reimp. 5ta. ed. 626, 1966.