

## Influencia de vitaminas y aminoácidos en el crecimiento y esporulación de *Mycena citricolor*, *Phoma costarricensis*, *Cercospora coffeicola* y *Ceratostomella fimbriata*

por

Ronald Echandi\* y Eddie Echandi\*

(Recibido para su publicación el 2 de julio de 1958)

Muy poco o nada se conoce acerca de los requerimientos nutritivos de los organismos que causan enfermedades de importancia económica en los cafetos. El Ojo de Gallo, La Quemá, La Chazparria y La Llaga Macana, causadas respectivamente por *Mycena citricolor* (Berk. y Curt.) Sacc., *Phoma costarricensis* Ech., *Cercospora coffeicola* Berk. y Curt. y *Ceratostomella fimbriata* (Ell. & Halst.) J. A. Elliot; pueden considerarse hoy día como las enfermedades de mayor importancia económica en Costa Rica.

El estudio del crecimiento y la esporulación de estos organismos en medios sintéticos da una idea de las necesidades nutritivas, de estos hongos y además en muchos casos ayuda a la comprensión de las relaciones entre el huésped y el parásito, tan importantes en los trabajos de control.

El presente trabajo ha sido llevado a cabo con el objeto de obtener información referente a los requerimientos vitamínicos y de nitrógeno en forma de aminoácidos de estos cuatro patógenos, y de este modo acumular indirectamente información que permita conocer mejor las relaciones existentes entre estos hongos y las diferentes partes de la planta de café atacadas por ellos.

### MATERIALES Y METODOS

Los cultivos usados fueron obtenidos de plantas de café mostrando síntomas típicos de cada una de las enfermedades. Una vez aislados los organismos en cultivo puro, se probó su patogenicidad y se les mantuvo para usarlos posteriormente en tubos de ensayo con agar papa dextrosa.

En el primer experimento con vitaminas se usaron cuatro cultivos de *Phoma*; WN<sup>o</sup>6, WN<sup>o</sup>6A, AWN<sup>o</sup>8 y BWN<sup>o</sup>8. El segundo y el cuarto se originaron del primero y tercero, siendo todos ellos bastante diferentes entre sí; del resto de los organismos solamente un cultivo fue usado.

El medio sintético básico usado en estos experimentos está formado por los siguientes compuestos: fuente de carbono 10 gm., glucosa se usó como fuente

---

\* Departamento de Fitopatología de la Universidad de Costa Rica.

de carbono para todos los organismos excepto para *P. costarricensis* que esporuló mejor en xilosa (1); asparagina 2 gm., en los experimentos con aminoácidos ésta fue sustituida por el aminoácido correspondiente fosfato dibásico de potasio 1 gm., sulfato de magnesio con 7 H<sub>2</sub>O, 0,5 gm.; cloruro férrico 0,01 gm.; cloruro de zinc 0,01 gm.; cloruro de manganeso 0,01 gm. y agar 20 gm., éste fue purificado por el método de ROBBINS (4). Agua destilada hasta completar 1000 ml.

En los experimentos con diferentes fuentes vitamínicas se usaron las siguientes: clorhidrato de tiamina 1,0 gm.; riboflavina 0,5 gm.; clorhidrato de piridoxina 0,5 gm.; pantotenato de calcio 2,0 gm.; ácido para-aminobenzoico 0,5 gm.; niacinamida 2,0 gm.; i-inositol 4,0 gm.; ácido pimélico 4,0 gm.; cloruro de colina 2,0 gm.; ácido nucléico 5,0 gm.; y biotina 0,005 gm. Estas concentraciones fueron las mismas usadas por LEWIS (3) y corresponden a gm. por 1000 ml.

En los experimentos con aminoácidos se usó: ácido L-glutámico; L-arginina; asparagina; clorhidrato de cisteína; L-cistina; DL-fenilalanina; glicina; leucina; DL-serina L-tirosina L-triptófano; L-valina y DL-norvalina. Todos estos aminoácidos fueron empleados a la concentración de 0,75 gm. por 1000 ml.

El pH del medio fue ajustado con ácido clorhídrico e hidróxido de sodio a 6,6 antes de la esterilización, mediante un potenciómetro Beckman. Todos los medios fueron esterilizados en el autoclave a 15 lb. de presión durante 15 minutos.

Los experimentos en medio líquido se llevaron a cabo en Erlenmeyers de 150 ml. de capacidad, lavados con mezcla sulfocrómica; en cada frasco se colocaron 20 ml. del medio, luego éstos fueron tapados con algodón forrado en papel encerado, con el objeto de impedir la caída de hebras de algodón al líquido.

Cuando se usó medio sólido, 10 ml. fueron vaciados en platos de petri de 9,0 cm. de diámetro, previamente lavados con mezcla sulfocrómica.

Para la siembra de los hongos se utilizaron pedazos uniformes de micelio raspados con una asa de la superficie de colonias jóvenes creciendo en agar papa dextrosa. Los frascos y los platos una vez sembrados fueron colocados en mesas largas de modo que estuvieran expuestos a luz y temperatura uniformes.

Una vez finalizados los experimentos se decantó el líquido sobrante, se lavó el micelio y se mantuvo en un horno durante 24 horas a 80° C., por último se tomó el peso seco del micelio. Los pesos promedios fueron obtenidos del micelio de cuatro frascos. En los experimentos en medio sólido el diámetro promedio se obtuvo midiendo cuatro colonias desarrolladas en platos de petri.

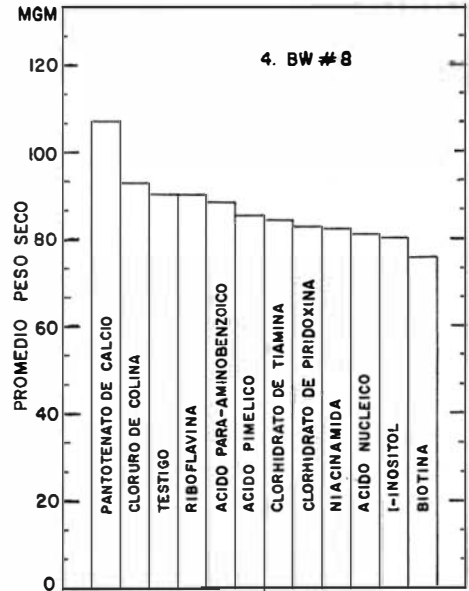
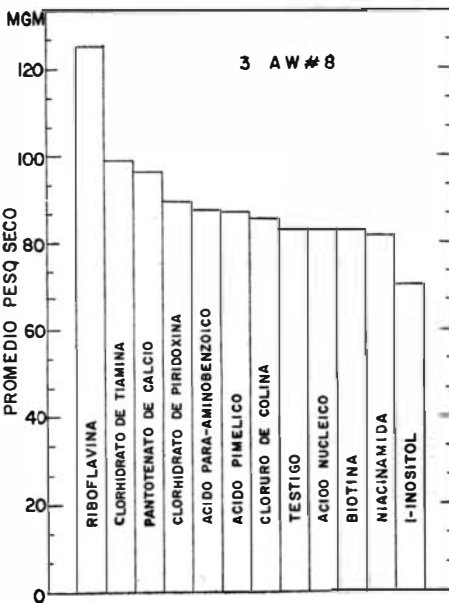
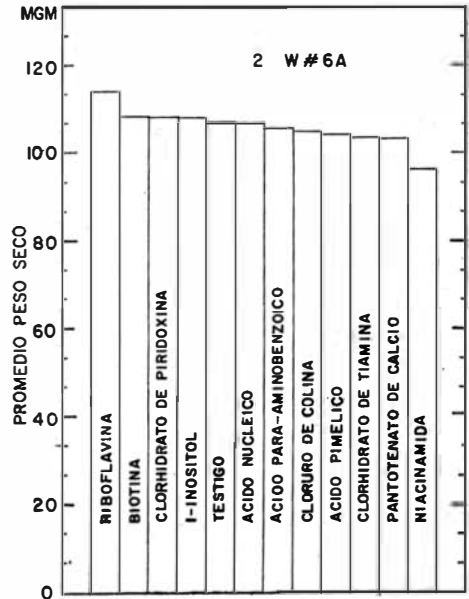
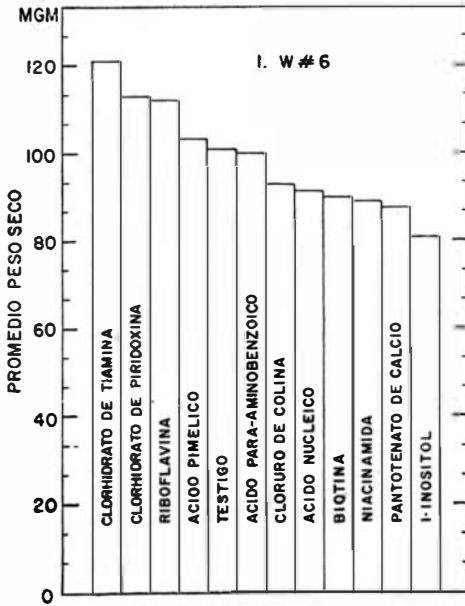
## RESULTADOS

### RESPUESTA A LAS DIFERENTES VITAMINAS

#### CRECIMIENTO:

En los experimentos con *Phoma* WN°6, WN°6A, AWN°8 y BWN°8; la adición de vitaminas al medio no mejoró significativamente el crecimiento

del hongo (gráficos 1, 2, 3 y 4). Esto indica que los cultivos no son deficientes en ninguna de las vitaminas usadas, se puede notar además que ninguna de las vitaminas inhibió el crecimiento del hongo.



Gráficos 1-4: Promedio de peso seco de cuatro cultivos de las cepas WN<sup>6</sup>A, AWN<sup>8</sup> y BWN<sup>8</sup> de *Phoma costarricensis* en medio líquido con diferentes vitaminas.

## ESPORULACIÓN:

Con el objeto de observar el efecto de las diferentes vitaminas en la esporulación de *M. citricolor*, *P. costarricensis*, *C. coffeicola* y *C. fimbriata*, éstos organismos fueron sembrados en medios sólidos. La incorporación al medio básico de las diferentes vitaminas no causó aumento apreciable en el crecimiento diametral de *M. citricolor*, *P. costarricensis* y *C. coffeicola* (gráficos 5, 6 y 8); sin embargo *C. fimbriata* sí fue favorecida por la adición de tiamina y ácido nucléico, como se observa en el gráfico 7; el crecimiento en las demás vitaminas no se diferenció significativamente del testigo.

De los cultivos de *Phoma* solamente el WN<sup>6</sup> esporuló; éste mostró variaciones apreciables en su esporulación como se puede notar en el cuadro 1.

CUADRO 1

*Esporulación de Phoma costarricensis en diferentes vitaminas*

Vitamina	Esporulación
Clorhidrato de tiamina	0
Riboflavina	0
Clorhidrato de piridoxina	0
Pantotenato de calcio	+
Acido para aminobenzoico	+
Niacinamida	++
i-Inocitol	++
Acido pimélico	++
Cloruro de colina	0
Acido nucleico	0
Biotina	0

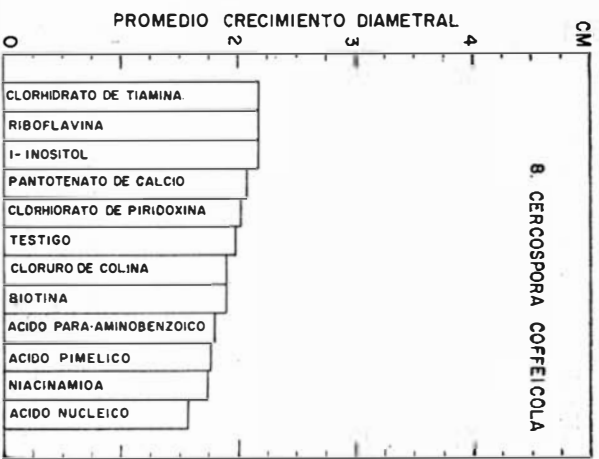
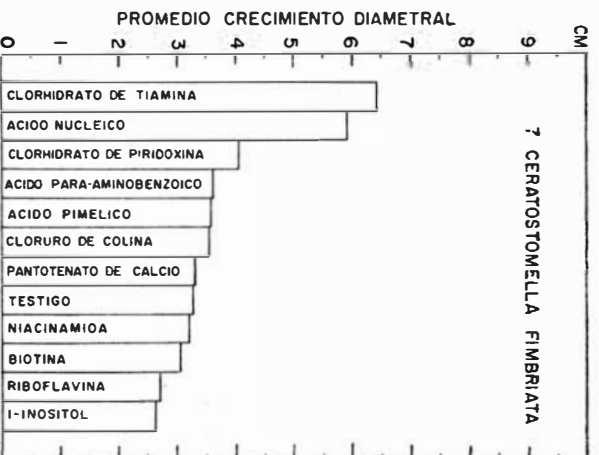
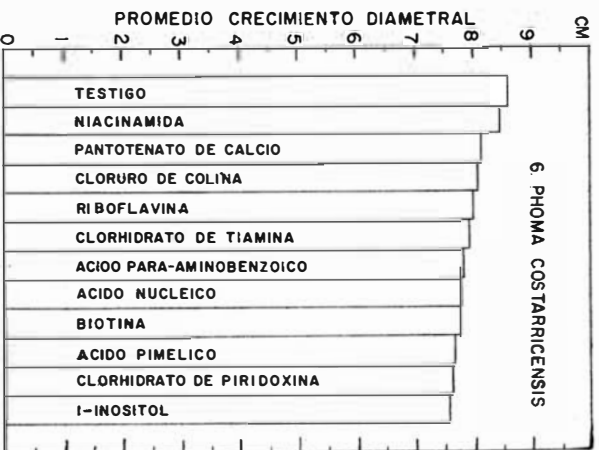
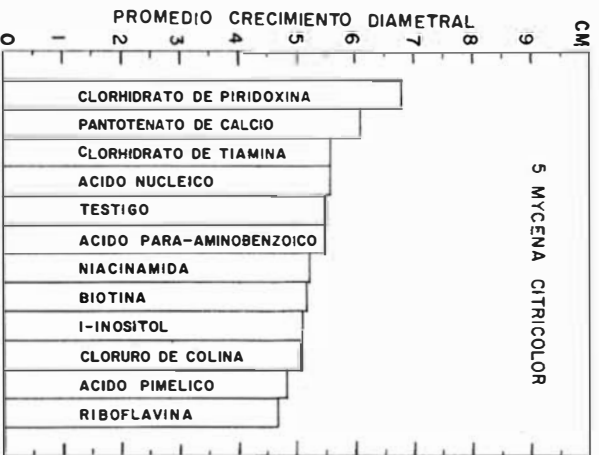
0 = no hay picnidios; + = muchos picnidios;

++ muchísimos picnidios.

Acido pimélico, i-inositol, niacinamida, ácido para-aminobenzoico y pantotenato de calcio fueron las que favorecieron la formación de picnidios.

*M. citricolor* y *C. fimbriata* esporularon solamente en clorhidrato de tiamina.

Los cuatro cultivos de *Phoma* mantenidos en cada una de las vitaminas fueron triturados separadamente y asperjados en hojas de café usando el método descrito por ECHANDI (1). Los tratamientos fueron calificados 8 días después y los datos obtenidos se analizaron estadísticamente. No hubo significación para ninguno de los tratamientos.



Gráficos 5-8: Promedio de crecimiento diametral de *Mycena citricolor*, *Phoma costarricensis*, *Ceratostomella fimbriata* y *Cercospora coffeicola* en medio sólido con diferentes vitaminas.

## RESPUESTA A LOS DIFERENTES AMINOACIDOS

## CRECIMIENTO:

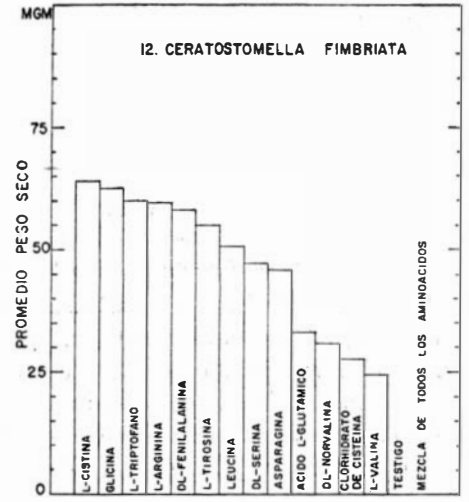
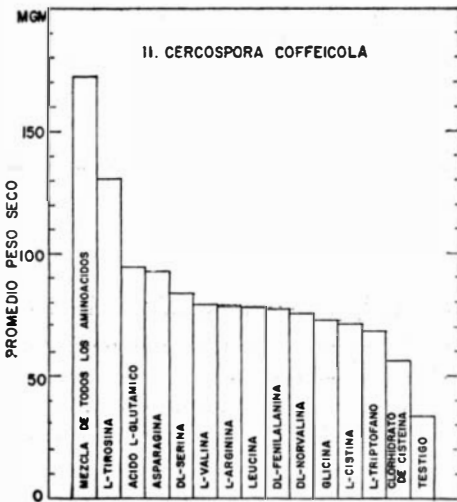
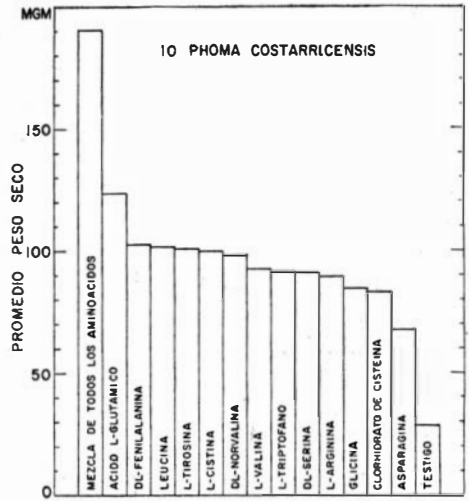
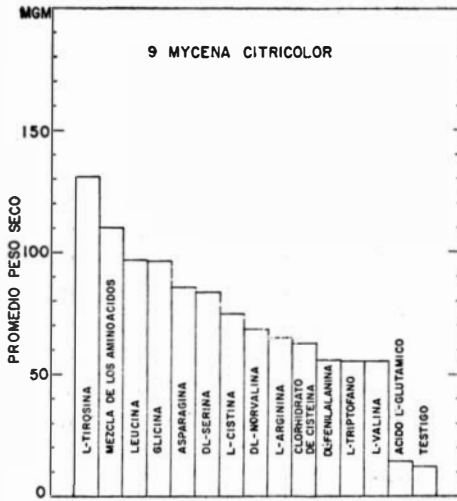
En el primer grupo de experimentos, 13 aminoácidos fueron incorporados al medio básico separadamente y en mezcla. Después de mantener los organismos por 18 días en condiciones similares de luz y temperatura, se filtró el contenido de los frascos. El micelio del hongo fue sacado a peso constante y luego pesado. Todos los organismos reaccionaron favorablemente a la presencia de aminoácidos. L-tirosina, la mezcla de todos los aminoácidos, leucina y glicina fueron los que más favorecieron el desarrollo de *M. citricolor*; el crecimiento en ácido glutámico fue casi igual al testigo (gráfico 9). El crecimiento de *P. costarricensis* fue altamente favorecido por la mezcla de todos los aminoácidos, todos ellos por separado también favorecieron el crecimiento (gráfico 10). *C. coffeicola* fue favorecida por todos los aminoácidos por separado, pero el mayor crecimiento se obtuvo con la mezcla de todos y L-tirosina (gráfico 11). *C. fimbriata* creció mejor cuando se le incorporó cualesquiera de los aminoácidos, ya que no creció del todo en la ausencia de ellos. La mezcla de aminoácidos inhibió el crecimiento del hongo (gráfico 12).

## ESPORULACIÓN:

Buena esporulación de *M. citricolor* fue obtenida mediante la incorporación de ácido L-glutámico, L-arginina, asparagina, glicina, DL-serina y la mezcla de todos los aminoácidos; L-tirosina, L-triptófano y L-cistina promovieron una esporulación menor. *P. costarricensis* esporuló mejor en DL-norvalina, L-triptófano y L-valina. Asparagina, DL-fenilalanina, DL-serina y L-cistina fueron menos efectivos. *C. fimbriata* esporuló mejor en glicina, L-triptófano la mezcla de los aminoácidos y leucina; menor esporulación fue obtenida con L-tirosina, ácido L-glutámico, asparagina, clorhidrato de cisteína, DL-norvalina y L-valina (cuadro 2). *C. coffeicola* no esporuló en ninguno de los aminoácidos. Glicina, DL-serina, asparagina y ácido L-glutámico, indujeron la formación de un pigmento color violeta en el medio.

## DISCUSION

Los resultados obtenidos con *M. citricolor*, *P. costarricensis* y *C. coffeicola* indican que ninguna de las vitaminas usadas favoreció significativamente el crecimiento de estos hongos. Sin embargo *C. fimbriata* produjo un crecimiento apreciablemente mayor en clorhidrato de tiamina y ácido nucleico. ROBBINS y MA (5), trabajando con varias especies de *Ceratostomella* incluyendo *C. fimbriata*, concluyeron que este hongo es parcialmente deficiente en tiamina y que un pequeño crecimiento fue obtenido en el medio que contenía solamente minerales. Esto indica que *C. fimbriata* procedente de café reacciona de una manera similar a otras especies por lo menos en lo referente a tiamina. El crecimiento relativamente grande de *C. fimbriata* en el tratamiento testigo en el presente trabajo se debió posiblemente a impurezas en los ingredientes del medio.



Gráficos 9-12: Promedio de peso seco de cuatro cultivos de *Mycena citricolor*, *Phoma costarricensis*, *Cercospora coffeicola* y *ceratostomella fimbriata* en medio líquido con diferentes aminoácidos.

## CUADRO 2

*Esporulación de M. citricolor, P. costarricensis, C. fimbriata y C. coffeicola en cada uno de los aminoácidos*

Aminoácidos	<i>M. citricolor</i>	<i>P. costarricensis</i>	<i>C. fimbriata</i>	<i>C. coffeicola</i>
Acido L-Glutámico	++++	0	+	0
L-Arginina	++++	0	0	0
Asparagina	++++	++	+	0
Clorhidrato de Cisteina	0	0	+	0
L-Cistina	+	+	0	0
DL-Fenilalanina	0	++	0	0
Glicina	++++	0	++++	0
Leucina	+++	0	+++	0
DL-Norvalina	0	++++	+	0
DL-Serina	++++	++	0	0
L-Tirosina	++	0	++	0
L-Triptófano	++	++++	++++	0
L-Valina	+++	+++	+	0
Mezcla de los aminoácidos	++++	0	++++	0
Testigo	0	0	0	0

0 = no hay cuerpos fructíferos; + = muy pocos cuerpos fructíferos;  
 ++ = pocos cuerpos fructíferos, +++ = muchos cuerpos fructíferos;  
 ++++ = muchísimos cuerpos fructíferos.

*M. citricolor* y *C. fimbriata* esporularon bastante en clorhidrato de tiamina, no se observó esporulación de estos organismos en otras vitaminas. *P. costarricensis* esporuló en cinco de las once vitaminas usadas.

No se observaron variaciones apreciables en la virulencia de los cultivos de *P. costarricensis* en diferentes vitaminas. Resultados similares fueron reportados por LEBEN y KEITT (2) con *Venturia inaequalis*.

Los cuatro organismos reaccionaron favorablemente a la presencia de aminoácidos en el medio. *M. citricolor*, *P. costarricensis* y *C. fimbriata* fueron altamente favorecidos en el crecimiento por la mezcla de aminoácidos; mientras que *C. fimbriata* no creció del todo en este medio. L-tirosina fue el aminoácido que indujo un mayor crecimiento de *M. citricolor* y *C. coffeicola*. L-triptófano, L-valina y asparagina fueron los únicos aminoácidos que indujeron esporulación en los tres hongos, *M. citricolor*, *P. costarricensis* y *C. fimbriata*.

Los aminoácidos que provocaron mayor crecimiento no fueron los que indujeron mayor esporulación.



## SUMARIO

Ninguna de las vitaminas usadas favoreció significativamente el crecimiento de *Mycena citricolor*, *Phoma costarricensis* y *Cercospora coffeicola*. *Ceratostomella fimbriata* creció apreciablemente en clorhidrato de tiamina y ácido nucleico. *Mycena citricolor* y *Ceratostomella fimbriata* esporularon solamente en clorhidrato de tiamina. *Phoma costarricensis* esporuló en cinco de las once vitaminas usadas. Los cuatro hongos reaccionaron favorablemente a la presencia de aminoácidos. L-triptófano, L-valina y asparagina, fueron los únicos aminoácidos que indujeron esporulación en los tres hongos, *Mycena citricolor*, *Phoma costarricensis* y *Ceratostomella fimbriata*. *Ceratostomella fimbriata* no creció en la mezcla de aminoácidos.

## SUMMARY

The four most important pathogens of coffee trees in Costa Rica, *Mycena citricolor*, *Phoma costarricensis*, *Cercospora coffeicola*, and *Ceratostomella fimbriata* were grown in liquid cultures and on agar plates to test their responses to eleven different vitamins and to thirteen aminoacids separately and combined, in terms of growth (expressed as oven dry weight and diametral growth on plates) and of sporulation.

None of the vitamins used improved growth significantly of *Mycena citricolor*, *Phoma costarricensis* or *Cercospora coffeicola*. *Ceratostomella fimbriata* grew best in thiamine and nucleic acid. *Mycena citricolor* and *Ceratostomella fimbriata* sporulated in thiamine only. *Phoma costarricensis* sporulated in five of the eleven vitamins used. The four organisms were favored in their growth by the presence of amino acids. L-tryptophane, L-valine and asparagin were the only amino acids that induced sporulation on the three fungi, *Mycena citricolor*, *Phoma costarricensis* and *Ceratostomella fimbriata*. *Ceratostomella fimbriata* did not grow in a mixture of amino acids.

## BIBLIOGRAFIA

1. ECHANDI, E.  
1957. La Quema de los cafetos causada por *Phoma costarricensis* n. sp. *Rev. Biol. Trop.* 5 (1):81-102.
2. LEBEN, C. & G. W. KEITT  
1948. *Venturia inaequalis* (Cke) Wint. V. The influence of carbon and nitrogen sources and vitamins in vitro. *Amer. Jour. Bot.* 35:337-343.
3. LEWIS, R. W.  
1952. The vitamin nutrition of *Alternaria solani*. *Phytopath.* 42:657-659.
4. ROBBINS, W. J.  
1939. Growth substances in agar. *Amer. Jour. Bot.* 26:772-778.
5. ROBBINS, W. J. & R. MA  
1942. Vitamin deficiencies of *Ceratostomella* and related fungi. *Amer. Jour. Bot.* 29:835-843.