

## Cuantificación del crecimiento *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* mediante lecturas de absorbancia

Mileidy Cruz-Martín<sup>1\*</sup>, Mayra Acosta-Suárez<sup>1</sup>, Eilyn Mena<sup>1</sup>, Berkis Roque<sup>1</sup>, Michel Leiva-Mora<sup>1</sup>, Tatiana Pichardo<sup>1</sup>, Rosa del Pilar Castro<sup>1,2</sup>, Yelenys Alvarado-Capó<sup>1</sup>. \*Autora para correspondencia

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5.5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.  
e-mail: mileidy@ibp.co.cu

<sup>2</sup>Facultad de Recursos Naturales. Departamento de Fitopatología. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Panamericana Sur km 1 ½. Riobamba. Ecuador. CP 06-01-4703

### RESUMEN

El crecimiento lento de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet en medios de cultivo sintéticos y semi-sintéticos así como las características de sus colonias hacen que el uso de los métodos tradicionales de evaluación del crecimiento fúngico sean inadecuados y poco factibles. Por ello, se requiere de un método que permita cuantificar su crecimiento en volúmenes reducidos de sustancias y en cortos periodos de tiempo. El objetivo de este trabajo fue cuantificar el crecimiento de *M. fijiensis* a través lecturas de absorbancia, en el tiempo, de suspensiones miceliales obtenidas de cultivos en medio líquido. Se comparó la masa seca del micelio de este patógeno crecido en medio de cultivo líquido en frascos de 250 ml de capacidad y la absorbancia en placas de 96 pocillos. Similar procedimiento se empleó para evaluar el efecto de filtrados de cultivo bacterianos con actividad antifúngica *in vitro* frente a *M. fijiensis*. Se encontró una relación lineal entre la absorbancia a 595 nm del crecimiento fúngico en medio de cultivo líquido con respecto a la masa seca. Mediante lecturas de absorbancia en placas de 96 pocillos fue posible cuantificar el crecimiento de suspensiones miceliales *M. fijiensis* en medio de cultivo líquido. Además, pudo ser aplicado para evaluar la inhibición del crecimiento del patógeno por filtrados de cultivo bacterianos con resultados a las 48 h de incubación.

Palabras clave: actividad antifúngica, biomasa, DO<sub>595</sub>.

## Quantification of *Mycosphaerella fijiensis* *in vitro* growth by absorbance readings

### ABSTRACT

The slow growth of *Mycosphaerella fijiensis* Morelet in synthetic and semi-synthetic media as well as the characteristics of their colonies makes the use of traditional methods for evaluating the fungal growth are inadequate and impractical. Therefore, it requires a method to quantify growth in small volumes of substance and in short periods of time. The aim of this study was to quantify the *M. fijiensis* growth, through absorbance readings on the time, of mycelial suspensions obtained from cultures in liquid medium. Mycelial dry weight of the pathogen grown in liquid culture in flasks of 250 ml capacity and the absorbance in 96 well plates was compared. Similar procedure was used to evaluate the effect of bacterial culture filtrates with *in vitro* antifungal activity against *M. fijiensis*. A linear relationship between absorbance at 595 nm of fungal growth in liquid culture medium with respect to the dry mass was found. Absorbance readings using 96-well plates were possible to quantify the *M. fijiensis* mycelial suspensions growth in liquid culture. Also, there may be applied to assess the growth inhibition of the pathogen for bacterial culture filtrates with results at 48 h incubation.

Key words: antifungal activity assay, biomass, DO<sub>595</sub>.

### INTRODUCCIÓN

Como medida del crecimiento fúngico se han empleado diferentes método entre los que se destacan: medida del crecimiento radial de las colonias (Hernández-Castillo *et al.*, 2008), determinación de la masa seca del micelio y la

lectura de la turbidez mediante absorbancia (Broekaert *et al.*, 1990). Sin embargo, una de las características distintivas de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, principal patógeno foliar de plátanos y bananos (*Musa* spp.), es su crecimiento lento en medios de cultivo sintéticos y semi-sintéticos. Además, las

colonias son compactas, elevadas y pequeñas (Meredith y Lawrence, 1969; Manzo *et al.*, 2001) (Figura 1A). Esto implica una desventaja en los estudios de interacción planta patógeno donde se requiere de producción de inóculo del hongo o en ensayos relacionados con la actividad antifúngica ya sea de controles biológicos, nuevos productos químicos o de evaluación de la resistencia del patógeno. Esto ha llevado a la búsqueda de alternativas para el uso de estructuras de reproducción del patógeno y otros métodos para su cultivo.

Por ejemplo, se ha empleado la descarga de ascosporas de hojas con síntomas del patógeno y mediante la inhibición del crecimiento del tubo germinativo se puede monitorear la resistencia a fungicidas químicos (Chin *et al.*, 2001, Pérez *et al.*, 2009). Sin embargo, este método es laborioso, se contamina con otros microorganismos fácilmente, depende de la colecta adecuada de los síntomas y de su disponibilidad. Para este fin se han empleado también conidios (Essis *et al.*, 2010), pero la producción *in vitro* de estos depende de la cepa y de las condiciones de incubación. Igualmente, se ha utilizado la medición del diámetro de las colonias para evaluar la inhibición del crecimiento fúngico (Mosquera *et al.*, 2009) pero esto se dificulta por las características del crecimiento *in vitro* del patógeno descritas anteriormente y se requieren entre 15 y 20 días para mostrar los resultados. Por ello, contar con un método de evaluación del crecimiento de la biomasa de *M. fijiensis* que sea adecuado, ya sea para la caracterización de aislados (producción de biomasa) o la evaluación de nuevos fungicidas químicos o de naturaleza biológica y que permita mostrar resultados en menor tiempo y confiables, contribuiría al desarrollo de los estudios de interacción planta-patógeno y de nuevas estrategias de control.

Peláez *et al.* (2006) propusieron un método para determinar la sensibilidad de aislados de *M. fijiensis* frente a varios fungicidas a partir de la lectura de absorbancia a DO 595 nm. Estos autores utilizaron como inóculo fragmentos de micelio obtenidos de colonias de 12-15 días de crecidas en medio de cultivo Agar papa dextrosa, sin embargo, los resultados se obtenían a partir de los 12 días de cultivo. El utilizar colonias como inóculo y el tiempo que requiere para su evaluación

son aspectos que pudieran mejorarse para que pueda ser utilizado en diferentes aplicaciones.

Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado, este trabajo se propuso cuantificar el crecimiento de *M. fijiensis* a través lecturas de absorbancia en el tiempo de suspensiones miceliales obtenidas de cultivos en medio líquido.

Además, los resultados se compararon con el incremento de la masa seca de suspensiones miceliales crecidas en similar medio de cultivo y se comprobó la factibilidad del empleo de este método para la evacuación de la actividad antifúngica de filtrados de cultivo bacterianos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El aislado de *M. fijiensis* empleado fue el CCIBP-Pf-83 perteneciente a la Colección de Cultivos Microbianos del IBP. La suspensión micelial se obtuvo a partir de un cultivo del patógeno en Caldo Papa Dextrosa (PDB) (BioCen) incubado durante 15 días en agitación a 120 rpm y 28°C. Esta se homogeneizó en batidora (Ultraturrax T25), durante 1 min con medio de cultivo PDB y se filtró por tamiz de 40.0  $\mu$ m.

Se inocularon 250  $\mu$ l de una suspensión micelial de *M. fijiensis* (aprox.  $5.0 \times 10^5$  fragmentos de micelio  $\text{ml}^{-1}$ ) en placas estériles de 96 pocillos. Posteriormente, se incubaron a 28°C y oscuridad.

Las mediciones del crecimiento de *M. fijiensis* se realizaron a los tres, cinco, siete y diez días de incubación. Los valores de absorbancia a 595 nm del crecimiento de *M. fijiensis* en placas de 96 pocillos, fueron obtenidos mediante un espectrofotómetro.

Simultáneamente se inocularon Erlenmeyer (250 ml de volumen) con 100 ml medio de cultivo PDB, con una suspensión micelial de *M. fijiensis* a igual concentración. Los frascos se colocaron en zaranda orbital a 28°C y 120 rpm. A los tres, cinco, siete y diez días de incubación se determinó el incremento de la biomasa fúngica mediante la masa seca (g). Para ello, se eliminó el medio de cultivo por filtración y el micelio se secó en estufa a 60°C, hasta obtener masa constante.

Se realizaron tres repeticiones para cada método y se graficó el incremento de la biomasa fúngica en función del tiempo. Seguidamente, se determinó la correspondencia entre los resultados del incremento de la biomasa mediante ambos métodos a través de un análisis de regresión lineal según lo propuesto por Broekaert *et al.* (1990).

Finalmente, se aplicaron los resultados para la evaluación de la actividad antifúngica de un filtrado de cultivo bacteriano frente a *M. fijiensis*. El filtrado de cultivo se obtuvo a partir de la cepa CCIBP-C5 perteneciente a la Colección de Cultivos Microbianos del Instituto de Biotecnología de las Plantas (aislada de la filosfera de *Musa* y con actividad antifúngica *in vitro*), según lo descrito por Cruz-Martín *et al.* (2010). Se siguió similar procedimiento para ambos métodos de evaluación (lectura de absorbancia y masa seca) y se usó una dilución de 1:10 del filtrado bacteriano con respecto al medio de cultivo. Para el análisis estadístico de los resultados se realizó un análisis de varianza de un factor y se empleó el programa estadístico SPSS para Window versión 19.0 previa comprobación de los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianza.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se comprobó que el crecimiento de *M. fijiensis* en medio de cultivo PDB tuvo similares características tanto en frascos de cultivo de 250 ml de capacidad como en placas de 96 pocillos. En ambos la turbidez se incrementó en el tiempo (Figura 1 B,C) y esto se corroboró mediante los valores de absorbancia y masa seca (Figura 2).

Se encontró una relación lineal entre la absorbancia a 595 nm de suspensiones miceliales de *M. fijiensis* con respecto a la masa seca (g) (Figura 3) con  $R^2$  de 0.9993. Similares resultados fueron obtenidos por Broekaert *et al.* (1990) en curvas de crecimiento de *Phycomyces blakesleeanus*, *Fusarium culmorum*, *Trichoderma hamatum*, *Septoria nodorum* y *Rhizoctonia solani* obtenidas mediante el registro de la absorbancia a 595nm y la masa seca.

El incremento de la biomasa de *M. fijiensis* registrado mediante ambos métodos sugiere la posibilidad de evaluar el crecimiento *in vitro* de este patógeno en menores periodos de tiempo que los propuestos por Peláez *et al.* (2006).

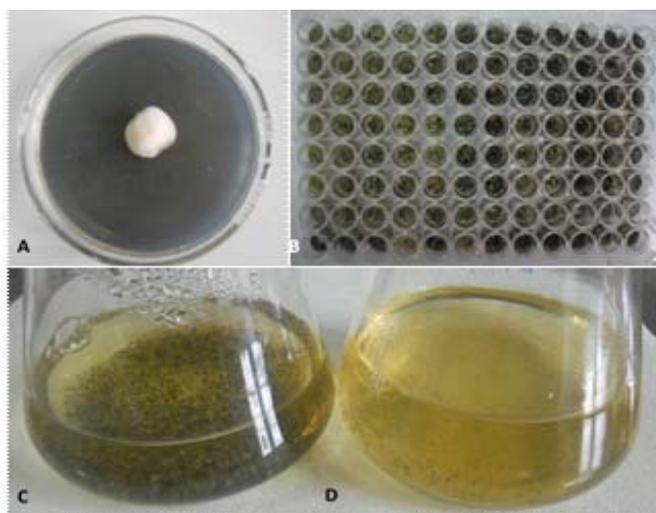


Figura 1. Crecimiento *in vitro* de *Mycosphaerella fijiensis* (A) colonia crecida en medio de cultivo Agar papa dextrosa durante 14 días. (B, C, D) Crecimiento de suspensiones miceliales en medio de cultivo Caldo papa dextrosa a las 48 horas en (B) placas de 96 pocillos (C) frascos de cultivo de 250 ml (D) frascos de cultivo de 250 ml y en presencia de filtrados de cultivo de la cepa CCIBP-C5.

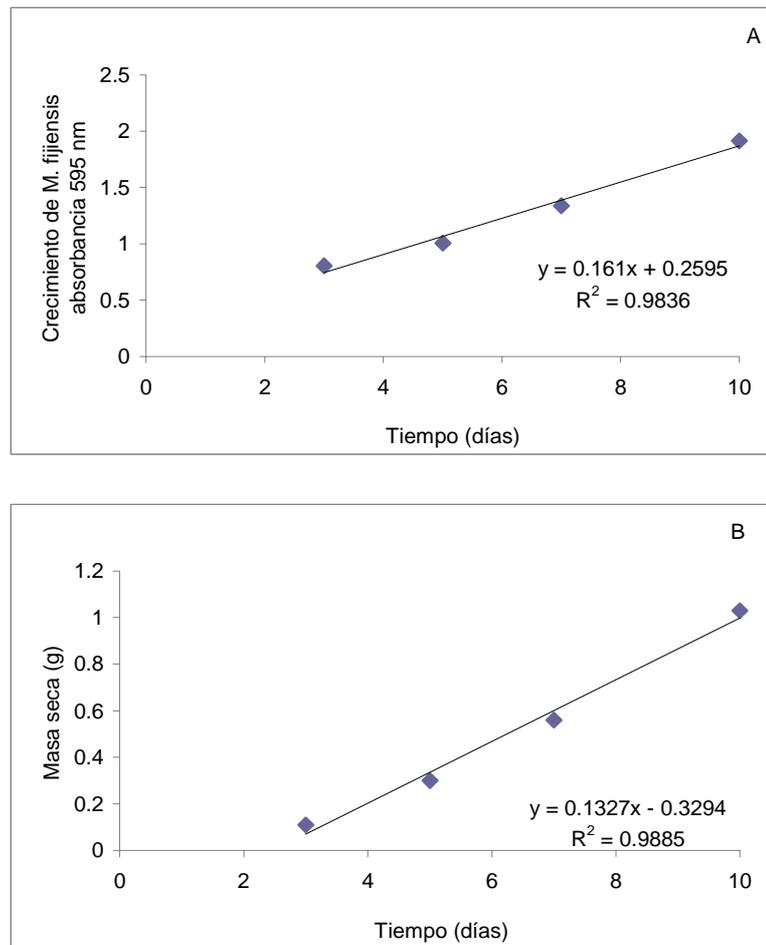


Figura 2. Crecimiento de *M. fijiensis* en medio de cultivo líquido A) por medida de la absorbancia a 595 nm. B) a partir de valores de masa seca (g). n=8.

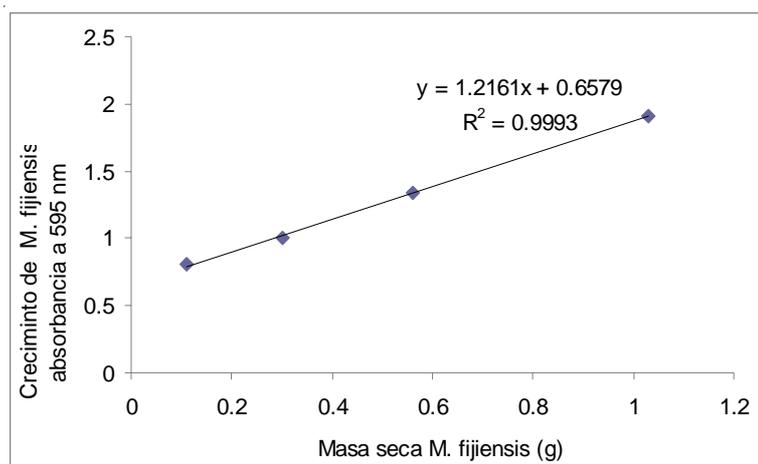


Figura 3. Regresión lineal entre absorbancia 595 nm frente a masa seca (g) de la curva de crecimiento de *M. fijiensis* en medio de cultivo líquido n=8.

Según Broekaert *et al.* (1990) si la absorbancia es un indicador de la biomasa del hongo en curvas de crecimiento normal, entonces las medidas de absorbancia pueden ser utilizadas como una herramienta para determinar las curvas de inhibición del crecimiento o hacer un monitoreo de la biomasa fúngica. Estos autores, plantearon que el uso de microplacas constituye una ventaja, ya que el ensayo puede montarse de forma fácil y rápida, se requieren pocas cantidades de muestra, la detección se hace por medio de un instrumento exacto y brinda la posibilidad de computarizar el procesamiento de los datos de forma directa.

Cuando se evaluó la actividad antifúngica del filtrado de cultivo bacteriano frente a *M. fijiensis* se observó similar comportamiento en cuanto a la relación entre la inhibición del crecimiento por medida de la masa seca y la absorbancia a 595 nm con un valor de  $R^2=0.9945$ .

Al comparar el crecimiento de la biomasa de *M. fijiensis* en presencia del filtrado con actividad antifúngica con respecto al control (Figura 1 C,D) se observaron diferencias significativas a las 48 horas de incubación, según análisis de varianza de un factor ( $p<0.05$ ), lo que permitió seleccionar este tiempo de cultivo para la evaluación de la actividad antifúngica.

En este estudio se comprobó por primera vez la relación lineal existente entre los valores de absorbancia a 595 nm y la masa seca (g) como medida del crecimiento de *M. fijiensis* en medio de cultivo líquido, para cuantificar la biomasa del patógeno. Se pueden emplear microplacas de 96 pocillos para la evaluación de la inhibición del crecimiento, lo cual es importante cuando se cuenta con pequeños volúmenes del agente antagonista así como la posibilidad de incorporar un gran número de réplicas al experimento. Este resultado posibilita minimizar los volúmenes finales requeridos en la cuantificación del crecimiento de *M. fijiensis* así como los tiempos de evaluación, variables imprescindibles en estudios de efectividad de compuestos purificados de naturaleza biológica frente a este patógeno.

## CONCLUSIONES

Mediante lecturas de absorbancia en placas de 96 pocillos fue posible cuantificar el crecimiento

de suspensiones miceliales *M. fijiensis* en medio de cultivo líquido. Además pudo ser aplicado para evaluar la inhibición del crecimiento del patógeno por filtrados de cultivo bacterianos con resultados a las 48 h de incubación. Como ventaja adicional se emplearon suspensiones miceliales del patógeno crecido en medio de cultivo líquido lo cual facilita su manipulación y ajuste de concentración.

## REFERENCIAS

- Broekaert WF, Terras F, Cammue B, Vanderleyden J (1990) An automated quantitative assay for fungal growth inhibition. *Microbiology Letters* 69: 55-60
- Chin K, Wirz M, Laird D (2001) Sensitivity of *Mycosphaerella fijiensis* from banana to trifloxystrobin. *Plant Dis.* 85: 1264-1270
- Cruz-Martín M, Alvarado-Capó Y, Acosta-Suárez, Roque B, Leiva-Mora M (2010) Efecto de filtrados cultivo bacterianos con actividad antifúngica *in vitro* en la interacción *Musa* spp.- *Mycosphaerella fijiensis* *Biotecnología Vegetal.* 10(2): 99-104
- Essis B, Kobenan K, Traoré S, Koné D, Yatty J (2010) Sensibilité au laboratoire de *Mycosphaerella fijiensis* responsable de la Cercosporiose noire des bananiers vis-à-vis de fongicides couramment utilisés dans les bananeraies ivoiriennes. *Journal of Animal & Plant Sciences* 7(2): 822- 833
- Hernández-Castillo F, Lira-Saldivar RH, Cruz-Chávez L, Gallegos-Morales G, Galindo-Cepeda M, Padrón-Corral E, Hernández-Suárez M (2008) Potencial antifúngico de cepas de *Bacillus* spp. y extracto de *Larrea tridentata* contra *Rhizoctonia solani* en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.) *ÖYTON* 77: 241-252
- Manzo G, Orozco M, Guzmán S (2001) Caracterización morfológica de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet de la región Pacífico-Centro de México y su desarrollo en medios de cultivo líquidos. *Revista Mexicana de Fitopatología.* 19: 66-71
- Meredith, D, Lawrence J (1969) Black leaf streak disease of bananas (*Mycosphaerella fijiensis*): symptoms of disease in Hawaii, and notes on the conidial state of the causal fungus. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 52 (3): 459-476
- Mosquera O, Echeverry L, Osorio J (2009) Evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Scientia Et Technica* XV(41): 232-236
- Peláez J, Vásquez LE, Díaz TJ, Castañeda DA, Rodríguez E, Arango RE (2006) Use of a micro title

plate dilution assay to measure activity of antifungal compounds against *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. Rev.Fac.Nal.Agr.Medellín. 59(2): 3425-3433

Pérez, L (2009) Fungicidas utilizados en el manejo de las enfermedades de los bananos y plátanos.

Resistencia a Fungicidas. Seminario de manejo de enfermedades de Musáceas. INISAV. Ciego de Ávila, Cuba

Recibido: 10-7-2013  
Aceptado: 16-9-2013