

Evaluación de dos métodos de conservación de hongos filamentosos patógenos de palma de aceite Evaluation of two conservation methods of filamentous fungal oil palm pathogens

Oscar Eduardo Ladino Rey¹, José David Rubio², Christian Andrei Chacin Zambrano¹

¹Universidad de Santander. Facultad de Ciencias exactas, Físicas y Naturales. Lagos del cacique, Bucaramanga, Colombia. CP 680001.

²Departamento Investigación y Desarrollo Agronómico, Indupalma Ltda. Km 10 vía Al mar, San Alberto, Cesar, Colombia. CP 205070.

E-mail: oscarladino92@hotmail.com; josed.rubio@gmail.com; cchacin@udes.edu.co

RESUMEN. La investigación sobre hongos filamentosos patógenos de palma de aceite es esencial para el mantenimiento y sostenibilidad del cultivo, así mismo lo es la conservación de los mismos una vez identificados, ya que permiten el uso para estudios posteriores o como guía para la identificación a lo largo del tiempo. La finalidad del presente trabajo fue evaluar dos métodos de conservación, uno en agua destilada tres veces esterilizada (ADTE) y el otro en glicerol 10 % en ADTE durante cuatro meses, con una revisión mensual a partir de hongos aislados de tejido vegetal de palma de aceite afectado por los géneros *Aspergillus* sp., *Chrysosporium* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. y *Rhizopus* sp. Se logró recuperar satisfactoriamente seis de las siete cepas conservadas con glicerol 10 % mientras que cinco de las siete cepas evaluadas con ADTE fueron recuperadas en los cuatro meses de evaluación de este estudio.

Palabras clave: conservación en agua destilada, *Elaeis guineensis* Jacq, *Elaeis oleifera* Bailey, hongos fitopatógenos, palma de aceite.

ABSTRACT. Research about filamentous fungal oil palm pathogens is as essential for the maintenance and the sustainability of the crop as the conservation of these identified fungi itself because it allows its uses for former researches or as a guide for identify fungi through time. The purpose of this study was to evaluate two methods of conservation, one of them in three times sterilized distilled water (ADTE) and with Glicerol 10 %. By four months, with a monthly review of fungi isolated from plant tissue palm oil affected by *Aspergillus* sp., *Chrysosporium* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. and *Rhizopus* sp. Six of the seven fungi strains conserved were successfully recovered from the Treatment with Glicerol 10 %, while five of the seven strains conserved ADTE were recovered after the four evaluation months of this study.

Keywords: water distilled conservation, *Elaeis guineensis* Jacq, *Elaeis oleifera* Bailey, Phythopathogenic fungi, oil palm tree.

INTRODUCCIÓN

La investigación sobre microorganismos requiere conservar y almacenar el material microbiano de interés, puro y debidamente identificado, por ello se hace indispensable el uso de métodos de conservación. Esta colección de microorganismos da lugar a bancos de cepas o ceparios que pueden constituir la base de futuras investigaciones (Pinzón-Gutiérrez *et al.*, 2009). Existen varios métodos de conservación de

microorganismos, los cuales pueden clasificarse de acuerdo con tiempo de conservación, en largo, mediano o corto plazo (Parra *et al.*, 2006; Pinzón-Gutiérrez *et al.*, 2009).

Para la conservación a largo plazo existen métodos como la criopreservación y liofilización, los cuales detienen el crecimiento de células sin causar pérdida de viabilidad, limitan la aparición de generaciones sucesivas y la actividad celular durante años (Pinzón-Gutiérrez *et al.*, 2009;

Trappe *et al.*, 2009). Los métodos a mediano plazo, requieren la cepa activa y uno de ellos consiste en la desecación en suelo o inmersión en agua destilada (también llamada método Castellani) que permite mantener la viabilidad hasta por 20 años (Capriles y Middelveen, 1989), este método puede estar acompañado de compuestos crioprotectores, como el glicerol, que recubre las células e impide la lisis o cambios osmóticos debido a la disminución de la temperatura en la suspensión (Ángel-Alarcón, 2006; Borman *et al.*, 2006; Fernández *et al.*, 2012). Además, es una alternativa de uso en laboratorios con recursos limitados. Por último, los métodos de conservación a corto plazo consisten en resembrar los microorganismos cada cierto tiempo en un medio de cultivo adecuado, este método tiene la limitante de incrementar el riesgo de contaminación, o de permitir el crecimiento del microorganismo, que puede cambiar espontáneamente sus características (Parra *et al.*, 2006).

El método de inmersión en agua destilada usado en esta investigación ha sido utilizado satisfactoriamente para preservar oomicetos, basidiomicetos, ascomicetos aeróbicos y algunos microorganismos conocidos por ser patógenos de humanos (Nakasone, 2004; Fernández *et al.*, 2012). Los ascomicetos sobrevivieron por más de 10 años al ser cultivados a 20 °C y muchos basidiomicetos permanecieron viables por al menos 2 años a 5 °C (Nakasone, 2004).

Estos métodos son esenciales en una empresa dedicada a la agroindustria, ya que permiten tener un historial, o punto de referencia para investigaciones posteriores, o facilitar la identificación de microorganismos. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue evaluar dos métodos de conservación de hongos filamentosos patógenos de palma de aceite.

MATERIALES Y MÉTODOS

El experimento se desarrolló en el laboratorio agronómico del departamento de Investigación y Desarrollo Agronómico de la empresa Indupalma ltda, en el km 10, vía al mar, San Alberto, Cesar, Colombia. Se usaron cepas de hongos filamentosos tomadas del banco de cepas del laboratorio. Esas cepas fueron aisladas e identificadas en estudios previos a partir de semillas de palma híbrida interespecífica O_xG (*Elaeis oleifera* Bailey x *Elaeis guineensis* Jacq) (Ladino-Rey, 2015), inflorescencias masculinas

de palma africana (*E. guineensis*) y suelo de palma americana (*E. oleifera*) que forman parte de la colección de microorganismos del laboratorio agronómico de la empresa Indupalma ltda. Las cepas empleadas para la evaluación de conservación pertenecían a las especies: *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Chrysosporium* sp., *Curvularia* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. y *Rhizopus* sp.

Para su reactivación, se sembraron en Agar Papa Dextrosa (PDA) y se dejó crecer durante 10 días a 30 °C. Posteriormente se tomó micelio con asa micológica y se transfirió a las suspensiones, se ajustó la turbidez en la escala 5 de McFarland, que corresponde a 1,5x10⁹ UFC ml⁻¹ por triplicado. Se usaron dos tipos de suspensiones en tubos de ensayo, la primera con agua destilada, tres veces esterilizada (ADTE) y la segunda, Glicerol 10 % v/v preparado en agua destilada tres veces esterilizada. Se usaron dos ensayos para cada hongo en cada tratamiento. La conservación se realizó en nevera a 4 °C. Los tiempos de evaluación se realizaron a las 24 horas, primero, segundo, tercer y cuarto mes después de iniciado el proceso.

De los tubos de ensayo conservados se tomó 0,1 ml de cada uno y con un escobillón estéril se sembró de forma masiva en PDA. Se incubó a 25°C durante 7 días o el tiempo requerido para cada cepa. Esto se realizó por triplicado para cada método. A partir de ello, se determinó la viabilidad mediante la cantidad de colonias recuperadas y las contaminadas tomando como cantidad inicial, la obtenida en la evaluación realizada a las 24 horas.

Se determinaron los porcentajes de recuperación de los hongos mediante el método de conservación con ADTE y Glicerol 10 % v/v, de los microorganismos para cada tiempo de evaluación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ensayos con agua destilada permitieron recuperar todas las cepas conservadas (figura 1), aunque dos de ellas, *Fusarium* sp y *Curvularia* sp., se recuperaron en un 20 % en el último mes evaluado, hecho similar refirió Ángel-Alarcón (2006) quien evidenció la recuperación de 16 de 18 cepas conservadas en agua destilada y Capriles (1989) quien logró recuperar el 73,5 % de las cepas conservadas. En cuanto al aislamiento de *Curvularia* sp. presentó contaminación desde el segundo mes de la evaluación (figura 2) que

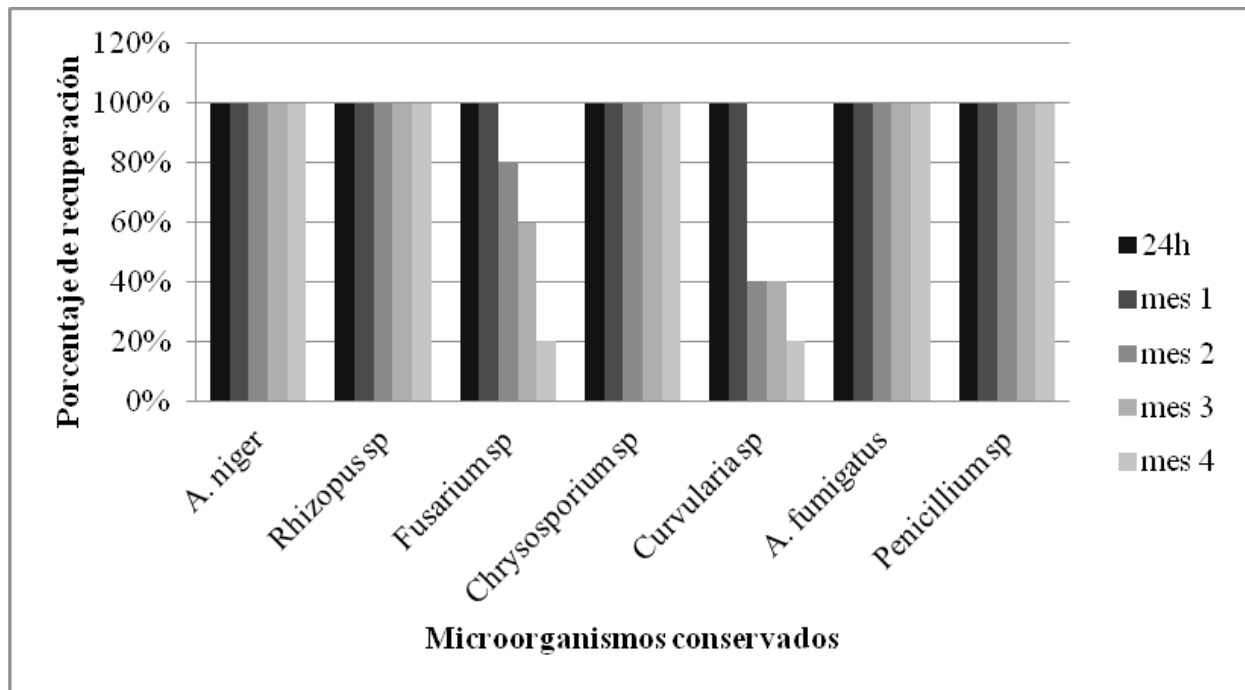


Figura 1. Recuperación de microorganismos conservados en Agua destilada durante los tiempos establecidos de la evaluación

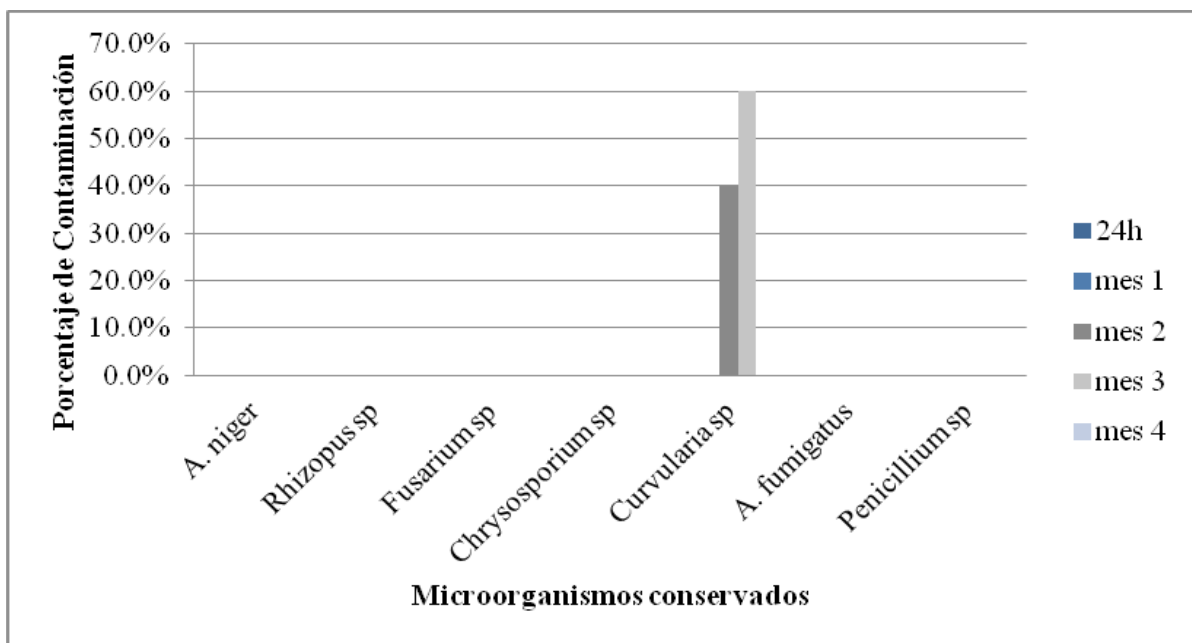


Figura 2. Contaminación microbiana presentada en las evaluaciones de los microorganismos conservados en ADTE

comparado con la literatura donde también se presentó contaminación en un 22,8 % de las cepas (Capriles, 1989), como ocurrido a Fernández *et al.* (2012), la cual se debió posiblemente a la hermeticidad de algunos tubos, y en este experimento, que junto a la temperatura de conservación, se generó condensación que pudo desencadenar la contaminación en algunas cepas.

Los ensayos con Glicerol 10 % permitieron recuperar todas las cepas conservadas (figura 3), aunque una de ellas, *Curvularia sp.*, se recuperó en un 20 % en el último mes. Las cepas de *Chrysosporium sp.* y *Rizhopus sp.* presentaron contaminación esporádica en algunas de las evaluaciones (figura 4), hecho ya discutido anteriormente, pero no se observó en muestras posteriores, tal como lo evidenció Ángel-Alarcón (2006), quien registró contaminación en algunas de sus muestras. Este método también garantizó la recuperación de los hongos filamentosos, corroborando los estudios realizados por algunos autores, los cuales recomiendan el método de preservación de hongos filamentosos como un método que es seguro, simple, capaz de garantizar la estabilidad y supervivencia de los diferentes cultivos fúngicos por largos periodos de tiempo.

Este mismo autor evaluó varios crioprotectores, sin embargo, no evaluó glicerol. En sus estudios observó que se recuperaban 16 hongos de los 18 evaluados al utilizar los crioprotectores, mientras que, Pinzón, *et al.* (2006) evidenciaron que el uso de glicerol, al igual que la leche descremada, permite la conservación de hongos durante un periodo largo de tiempo.

El uso de la conservación de hongos filamentosos mediante la inmersión en agua destilada está bien documentado en la literatura (Fernández *et al.*, 2012), ya que garantiza porcentajes de viabilidad, pureza y estabilidad de las cepas, lo que se une a su bajo costo y sencillez, usando el mismo frasco hasta que se acabe el líquido. Este método es una herramienta útil para laboratorios con recursos limitados, hecho evidenciado en este experimento, donde no se necesitó gran cantidad de material o equipos especializados.

CONCLUSIONES

1. Los métodos usados para la conservación de hongos filamentosos permitieron recuperar

efectivamente las cepas evaluadas, cinco de las siete cepas conservadas con agua destilada y seis de las siete conservadas en glicerol 10 %, hasta los cuatro meses evaluados en este estudio.

2. La cepa de *Curvularia sp.* presentó disminución de la viabilidad después del segundo mes de conservación en los dos métodos evaluados.

AGRADECIMIENTOS

A la empresa Indupalma Ltda. A los Ingenieros José David Rubio Gómez y Gabriel Arturo Chaves Betancourt.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ángel-Alarcón, D.I.: Evaluación de técnicas de conservación para hongos filamentosos y levaduriformes en el cepario de la pontificia Universidad Javeriana. Tesis de Grado. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. 2006, 80 p.
2. Borman, A.M.; A. Szekely; C.K. Campbell; E.M. Johnson: Evaluation of the viability of pathogenic filamentous fungi after prolonged storage in sterile water and review of recent published studies on storage methods. *Mycopathologia*, 161 (6): 361-8, 2006.
3. Capriles C.; S. Mata; M. Middelveen: Preservation of fungi in water (Castellani): 20 years. *Mycopathologia*, 106 (2):73-9, 1989.
4. Fernández, C.M.; L.A. Díaz; M.T. Illnait; C. Aragonés; G. Martínez; M.R. Perurena: Conservación de cultivos fúngicos de alto riesgo de *Histoplasma* y *Cryptococcus*. *Rev Cubana de Medicina Tropical*, 64 (1): 49-54, 2012.
5. Ladino-Rey, O.: Evaluación de cuatro cepas de *Trichoderma sp.* sobre hongos contaminantes de semillas de palma híbrida interespecífica *OxG (Elaeis guineensis x Elaeis oleífera)*. Tesis de Grado. Universidad de Santander, Bucaramanga, Colombia. 2015.
6. Nakasone, K.K.; S.W. Peterson; J. Shung-Chang: Preservation and distribution of fungal cultures. *Biodiversity of fungi: inventory and monitoring methods*. Amsterdam: Elsevier Academic Press. 2004, pp. 37-47.

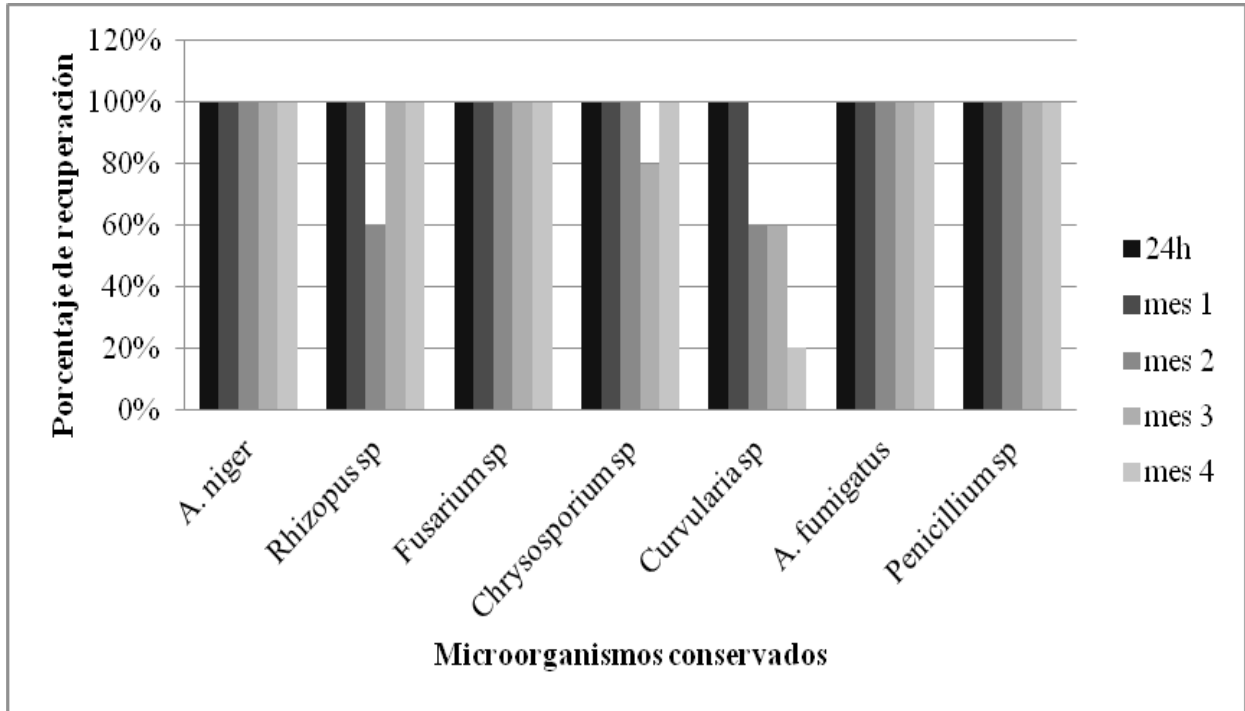


Figura 3. Recuperación de microorganismos conservados en Glicerol 10 % v/v en los tiempos establecidos para la evaluación

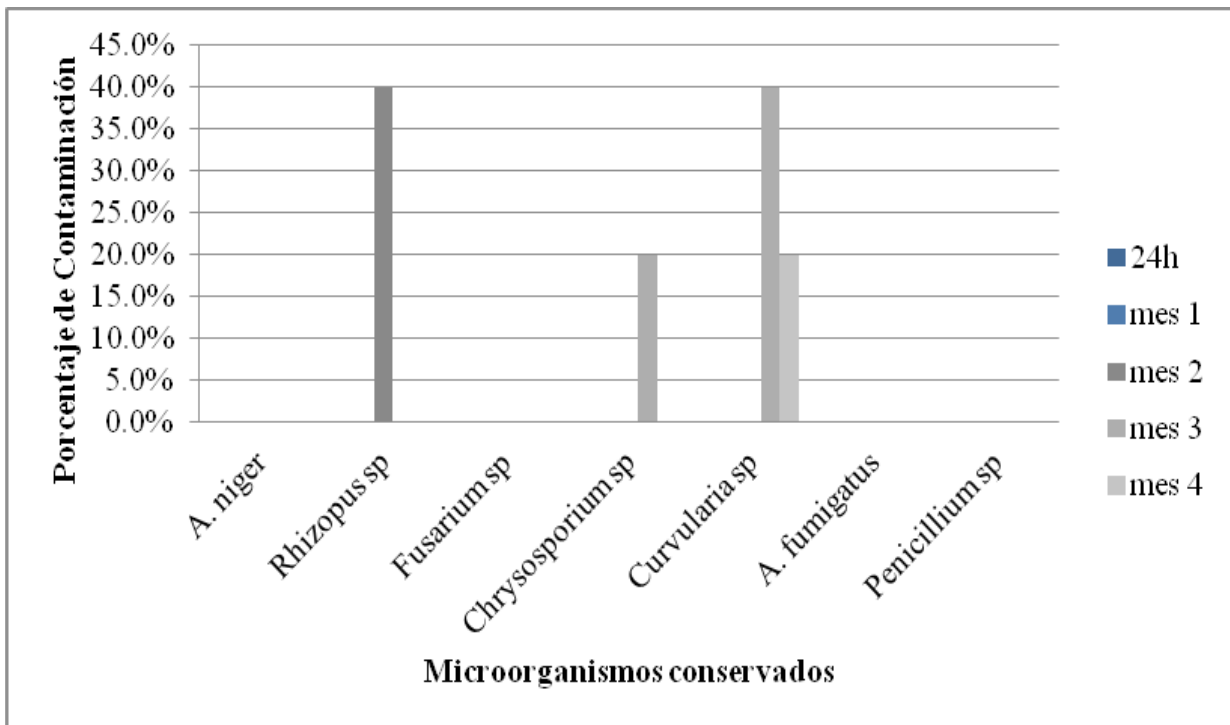


Figura 4. Contaminación microbiana presentada en las evaluaciones de los microorganismos conservados en Glicerol 10 %

7. Parra, S.; M. Pérez; M. Bernal; Z. Suarez y D. Montoya: Implementación y evaluación de dos métodos de conservación y generación de la base de datos del banco de cepas y genes del instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia. *NOVA*, 4 (5): 1-116, 2006.
8. Pinzón-Gutiérrez, Y.; S.L. Bustamante y G. Buitrago: Evaluación de métodos para la conservación de hongos fitopatógenos del ñame (*Dioscorea* sp.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, XI (2): 8-18, 2009.
9. Trappe, J.; R. Molina; D. Louma; E. Cazares; D. Pilz; J. Smith; M.A. Castellano; S. Miller; M. Trappe: Diversity, Ecology, and conservation of Truffle fungi in forest of the Pacific Northwest. 2009. En sitio web: www.fs.fed.us/pnw/pubs/pnw_gtr772.pdf Consultado en Mayo 2015.

Recibido el 1 de julio de 2015 y aceptado el 9 de febrero de 2016