

# Caracterización cultural y morfológica e identificación de 12 aislamientos fungosos de semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú

## Cultural and morphological characterization and identification of 12 fungal isolations in seeds of *Leucaena leucocephala* cv. Peru

J. C. Lezcano<sub>1</sub>, B. Martínez<sub>2</sub> y O. Alonso<sub>1</sub>

<sup>1</sup>Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey"  
Central España Republicana, CP 44280, Matanzas, Cuba  
E-mail: [juan.lezcano@indio.atenas.inf.cu](mailto:juan.lezcano@indio.atenas.inf.cu)

<sup>2</sup>Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, La Habana, Cuba

### Resumen

La presente investigación tuvo como objetivo identificar los agentes fungosos asociados a las semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú almacenadas al ambiente, a partir de la caracterización cultural y morfológica de 12 aislamientos puros; estos se obtuvieron de la siembra de las estructuras fúngicas (vegetativas y/o reproductivas), en placas Petri (9 cm de diámetro) que contenían Agar Papa Dextrosa (APD) y Agar Malta (AM). Las placas se incubaron durante 10 días a 25°C, con alternancia de 8 h luz/16 h oscuridad o a oscuridad constante, según los requerimientos de cada organismo. Se identificaron siete agentes fungosos asociados a las semillas, los cuales se clasificaron teniendo en cuenta los caracteres culturales y morfológicos, y se corroboraron con las claves taxonómicas. Ello permitió agrupar: *Penicillium expansum* Link, *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. ex Fr., *Cladosporium sphaerospermum* Penz., *Chaetomium indicum* Corda, *Alternaria alternata* (Fr) Keissl., *Pestalotia* sp. y *Trichoderma* sp. Dichos caracteres constituyen una herramienta importante para la identificación de los hongos hasta el nivel de especie, por lo que se recomienda realizar nuevos estudios con los aislamientos #9 y #11 con vista a completar la identificación hasta la especie en el caso de los géneros *Trichoderma* y *Pestalotia*; así como identificar las especies fungosas del resto de los aislamientos.

Palabras clave: Hongos, *Leucaena leucocephala* cv. Perú, semillas

### Abstract

The objective of this study was to identify the fungal agents associated to seeds of *Leucaena leucocephala* cv. Peru stored under ambient conditions, from the cultural and morphological characterization of 12 pure isolations; they were obtained from planting the fungal structures (vegetative and/or reproductive), in Petri dishes (9 cm diameter) which contained Potato Dextrose Agar (PDA) and Malt Agar (MA). The dishes were incubated for 10 days at 25°C, alternating 8 h light/16 h darkness or at constant darkness, according to the requirements of each organism. Seven fungal agents associated to the seeds were identified, which were classified taking into consideration the cultural and morphological characteristics, and they were corroborated with the taxonomic keys. This allowed to group: *Penicillium expansum* Link, *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. Ex Fr., *Cladosporium sphaerospermum* Penz., *Chaetomium indicum* Corda, *Alternaria alternata* (Fr) Keissl., *Pestalotia* sp. and *Trichoderma* sp. Such characteristics constitute an important tool for the identification of fungi to the species level, for which new studies with isolations #9 and #11 are recommended in order to complete the identification to species level in the case of genera *Trichoderma* and *Pestalotia*; as well as to identify the fungal species of the other isolations.

Key words: Fungi, *Leucaena leucocephala* cv. Peru, seeds

## Introducción

La sanidad de las semillas es un elemento a tener en cuenta en el proceso productivo de *Leucaena leucocephala* cv. Perú, pues de ella depende en gran medida el éxito de su propagación, comercialización y perpetuación en la naturaleza.

Sin embargo, en la literatura científica internacional no es común encontrar referencias que aborden el tema con profundidad y la mayoría se restringe a informes de la lista de microorganismos patógenos que afectan dicha planta forrajera en los diferentes países, como es el caso del informe realizado por Lenné y Boa (1994) sobre las enfermedades de los árboles leguminosos, donde resaltan la presencia de *Camptomeris leucaenae*, *Ganoderma ligidum* y *Fusarium oxysporum* entre los más importantes presentes en *L. leucocephala*.

En tal sentido, en Cuba en los últimos años se ha informado la presencia de numerosos microorganismos que no solo afectan la producción de semilla de esta leguminosa en condiciones de campo, sino que también causan considerables pérdidas que aceleran el deterioro de su calidad y pueden ocasionarle hasta su muerte en el almacén donde se depositan para su conservación (Lezcano *et al.*, 2007), lo cual se debe fundamentalmente a la decoloración, la alteración del olor y su aspecto (por pudrición) y la disminución del poder germinativo y su viabilidad, por solo citar algunos ejemplos.

Dentro de los agentes patógenos asociados a las semillas de *L. leucocephala* cv. Perú, los hongos constituyen el grupo más numeroso y uno de los de mayor importancia. Sin embargo, los estudios relacionados con la identificación de estos agentes en Cuba no han sido completados, pues en la literatura consultada solo se hace referencia a dos investigaciones preliminares realizadas por Delgado *et al.* (1989) y Alonso *et al.* (1996), quienes solamente clasificaron, hasta nivel genérico, los 18 hongos que encontraron en las semillas de este cultivar, entre los que se encuentran: *Trichoderma* sp., *Rhizopus* sp., *Phoma* sp., *Drechslera* sp., *Chaetomium* sp., *Gonatotryps* sp., *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Botrytis* sp., *Curvularia* sp., *Doratomyces* sp., *Helmisthosporium* sp., *Macrophomina* sp., *Nigrospora* sp. y *Rhizoctonia* sp.

Por tal motivo, es necesario la búsqueda de diversos métodos de diagnóstico, como la caracterización cultural y morfológica (Cruz *et al.*, 2004; Bernal *et al.*, 2005), que a través de la descripción *in vitro* de los caracteres más importantes de los agentes saprofitos o patógenos, posibiliten la identificación hasta el nivel de especie, conjuntamente con el empleo de las claves taxonómicas. Dicho aspecto constituyó el objetivo fundamental del presente trabajo, que por su importancia debe ser un elemento a considerar en los momentos actuales cuando la utilización de *L. leucocephala* cv. Perú se ha incrementado, máxime si se tiene en cuenta que su semilla botánica constituye una vía económica para la diseminación de esta arbórea en el país (Pérez *et al.*, 2000).

## Materiales y Métodos

*Material vegetal.* Semillas de *L. leucocephala* cv. Perú con seis y 18 meses de almacenamiento al ambiente, procedentes del almacén de la finca de semillas “La Rioja” perteneciente a la Empresa Pecuaria “José Martí” en la provincia de Matanzas, Cuba.

*Lugar donde se realizaron las investigaciones.* Laboratorio de Micología Vegetal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA) en La Habana, Cuba.

*Aislamiento de los hongos y obtención de cultivos puros.* Las diferentes estructuras fúngicas (vegetativas y/o reproductivas) halladas en las semillas cuando se sometieron al test de patología (Blotter Test) recomendado por el ISTA (1999), se observaron con un estereomicroscopio Zeiss SV-6, utilizando lentes oculares desde 10 hasta 100 x. Con el empleo de agujas previamente desinfectadas se sembraron en placas Petri de cristal, estériles, de 9 cm de diámetro, las cuales contenían medio Agar Papa Dextrosa (APD), y se

incubaron a 28°C por 7 días. Al finalizar este período, de los 32 cultivos se procedió al montaje de las preparaciones fijas en portaobjetos para su observación al microscopio óptico (Zeiss Estandar 25), y de acuerdo con las estructuras se agruparon, por género, los 12 aislamientos seleccionados.

Para la obtención de los cultivos puros, de cada placa Petri se extrajo un disco micelial de 7 mm de diámetro de los 12 aislamientos, que se transfirieron sobre cuñas de APD en tubos de cristal de 22 x 165 mm con vista a su conservación. Posteriormente se hizo una nueva siembra de cada aislamiento en placas Petri y a los 10-15 días de edad de los cultivos se extrajo un disco micelial de 7 mm de diámetro, que se colocó en el centro de tres placas (repeticiones) para realizar las mediciones.

Dichas placas se sellaron con papel parafinado (Parafilm) y se incubaron durante 10 días a 25°C, con alternancia de 8 h luz/16 h oscuridad o a oscuridad constante, según los requerimientos para cada organismo.

*Caracterización cultural.* Se tuvo en cuenta: el color de la colonia en el anverso y el reverso de la placa, la textura, el crecimiento lineal (expresado en cm/día) y el crecimiento aéreo. En el caso del crecimiento micelial lineal de cada aislamiento, se midió el diámetro de las colonias (dos mediciones diarias, a las 8:00 a.m. y 4:00 p.m. hasta el décimo día); mientras que la coloración de la colonia se determinó por la tabla de colores de Rayner (1970).

Los medios de cultivo (pertenecientes a la firma Merck) responden a los criterios de la literatura científica, reflejados en la primera, tercera, cuarta y séptima de las claves taxonómicas que se relacionan posteriormente, referentes a cada género fungoso, según la agrupación de acuerdo con sus estructuras vegetativas y reproductivas.

Los aislamientos #8, #11, #15, #16, #24 y #32 se cultivaron en Agar Papa Dextrosa (APD); el #1, #13 y #14 en Agar Czapek (AZ) y en Agar Malta el #1, #9, #12, #13, #14 y #23.

*Caracterización morfológica.* Se tuvo en cuenta el tamaño (en  $\mu\text{m}$ ), la forma y el color de las estructuras vegetativas y reproductivas en los cultivos de los 12 aislamientos. Por cada estructura se realizaron 50 mediciones, en un microscopio óptico Zeiss Estándar 25 (lentes oculares 10-100 x), con una escala micrométrica, con el objetivo de corroborar la clasificación de la especie fungosa, según las claves taxonómicas.

*Claves taxonómicas utilizadas para la identificación de los hongos.* Malone y Muskett (1964), Onions (1966), Rifai (1969), Ellis (1971), Lunn (1977), Sutton (1980), Barnett y Hunter (1999), Ho *et al.* (1999) y López *et al.* (1999).

## Resultados y Discusión

Como resultado de este estudio, a continuación se hace referencia a la caracterización cultural y morfológica de los 12 aislamientos analizados, con vista a la identificación de las especies fungosas.

Como resultado de este estudio, a continuación se hace referencia a la caracterización se hace referencia a la caracterización cultural y morfológica de los 12 aislamientos analizados, con visita a la identificación de las especies fungosas.

En el caso de los aislamientos #1, #13 y #14, culturalmente manifestaron un comportamiento similar en los medios donde se cultivaron (AZ y AM). En las placas con cultivos sobre AZ incubadas a 25°C, en el anverso produjeron colonias de crecimiento rápido (16 mm de diámetro al séptimo día de incubación) y de color verde grisáceo, a menudo, con una zona radial con bordes regulares de color blanco, los que llegaron a tornarse verde grisáceo con la producción de los conidios.

En el reverso las colonias generalmente se observaron incoloras, aunque también un aislamiento (el #13) presentó color pardo con tonalidades amarillas.

En medio AM las colonias de estos aislamientos incubadas a 25°C, en el anverso de las placas se observaron afieltradas y de color verde grisáceo, con igual zona radial blanca, polvosa, de crecimiento aéreo escaso y superficial moderadamente abundante (40 y 50 mm al séptimo y al décimotercer día de incubación, respectivamente), lo cual corrobora lo planteado por Onions (1966) cuando expresó que las colonias de este

hongo crecen con mayor rapidez en el medio AM que en el de AZ. Por el reverso las colonias no mostraron una distinción clara y tuvieron tendencia a ser incoloras, al igual que en el medio AZ.

Desde el punto de vista morfológico, las principales características de las estructuras, provenientes de los cultivos sobre AZ, fueron: la producción de cabezas conidiales asimétricas, ramificadas, alargadas y con largas cadenas de conidios. Por otra parte, presentaron conidióforos peniciliados con fialides, lisos, moderadamente largos de  $345\text{-}371 \times 3,02\text{-}3,16 \mu\text{m}$  (largo por ancho); ramas de  $13\text{-}21 \times 2,0\text{-}2,9 \mu\text{m}$  y fialides en grupos de cinco, que pueden llegar hasta nueve, con tamaño variable, de  $8\text{-}12 \times 2\text{-}2,5 \mu\text{m}$  y en ocasiones más largas. Los conidios se observaron lisos y elípticos, con un tamaño de  $3,68\text{-}4,09 \times 2,68\text{-}3,04 \mu\text{m}$ .

Por su parte, las estructuras procedentes de los cultivos en AM fueron similares a las descritas anteriormente, con la única diferencia de que las cabezas conidiales pueden poseer una o dos ramas.

Ambos grupos de características coinciden con lo expuesto por Onion (1966) y CABI (2003) para la especie *Penicillium expansum* Link; de ahí que exista correspondencia con la encontrada en este estudio (fig. 1).

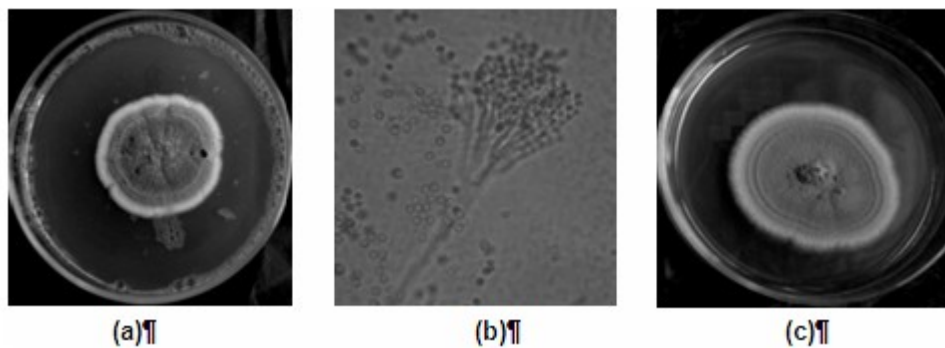


Fig. 1. Colonia (a), cabeza conidial y conidios (x 100) (b) de *P. expansum* en medio AZ evaluada al séptimo día de incubación, y colonia (c) en medio AM a los seis días de incubación (x 40).

Fig. 1. Colony (a), conidial head and conidia (x 100) (b) of *P. expansum* on ZA medium evaluated on the seventh day of incubation and colony (c) on MA medium on the sixth day of incubation (x 40).

A partir de los aislamientos #8, #15 y #16, que crecieron en APD y fueron incubados a  $25^{\circ}\text{C}$ , se obtuvieron colonias blancas algodonosas cuando jóvenes, las que se tornaron de color negro parduzco con la madurez, por la presencia de los esporangios. Un aspecto importante en todos los aislamientos fue la rápida diseminación que mostraron las colonias en los cultivos, al cubrir las placas Petri a las 24-48 h. Esta situación se debió a la presencia de estolones rastreros fijados a través de los rizoides en varios puntos del sustrato.

Como caracteres morfológicos de estos aislamientos se observaron esporangioforos de  $30\text{-}34 \mu\text{m}$  de ancho por  $900\text{-}3\ 100 \mu\text{m}$  de largo, de paredes lisas, no septados, de color pardo claro, simples, que a veces surgían en grupos de tres a cinco, a partir de estolones y rizoides opuestos. Los esporangios, de globosos a subglobosos, blancos al principio y negros después, median de  $100\text{-}350 \mu\text{m}$  de diámetro. Las columelas eran subglobosas a aplanadas, grises parduzcas, en forma de sombrillas cuando estaban hendidas, con una dimensión de  $60\text{-}198 \times 67\text{-}135 \mu\text{m}$ . Los rizoides y los estolones eran hialinos y en ocasiones aparentaron ser pardo oscuros. Las esporangiosporas presentaron diversas formas: alargadas, ovaladas y redondas, pero casi siempre irregulares y de tamaño variable ( $13\text{-}17 \mu\text{m}$ ).

Lo descrito con anterioridad coincide con lo informado por Malone y Muskett (1964) y Lunn (1977) acerca de la especie *Rhizopus stolonifer* (Ehremb. Ex Fr) Lind., por lo que también se clasificó así este agente fungoso (fig. 2).

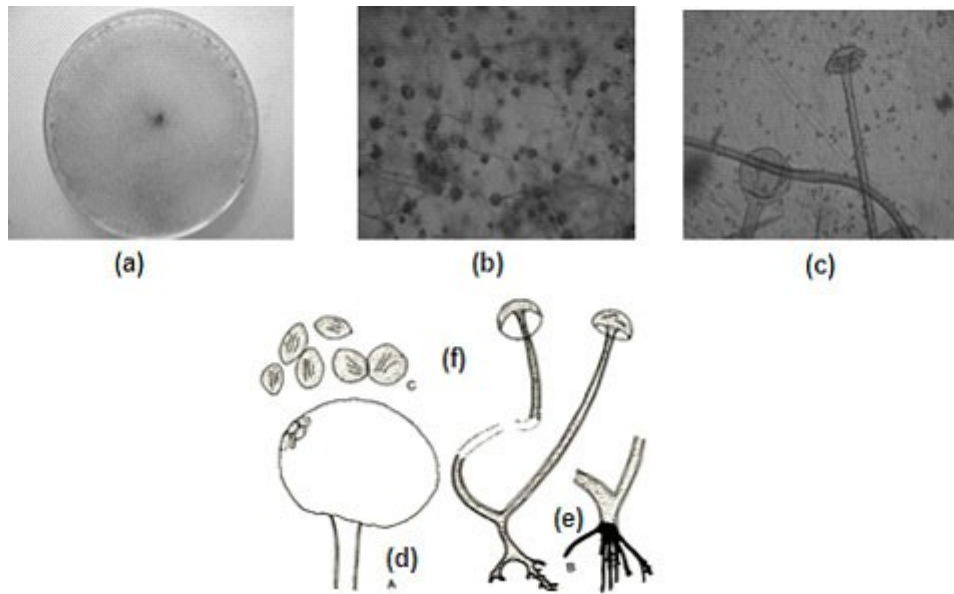


Fig. 2. (a) Colonia de *R. stolonifer*, (b) estolones rastreros, (c) columelas, (d) esporangio (x 100), (e) esporangioforo ramificado con rizoides (x 100) y (f) esporangiosporas con estrías longitudinales (x 200).

Fig. 2. (a) Colony of *R. stolonifer*, (b) creeping stolons, (c) columellae, (d) sporangium (x 100), (e) sporangiophore branched with rhizoids (x 100) and (f) sporangiospores with longitudinal striations (x 200).

Las colonias de los aislamientos #12 y #23 sobre medio AM e incubadas a 25°C, desde el punto de vista cultural al séptimo día se caracterizaron por mostrar en el anverso una coloración de olivácea gris pálido a olivácea gris oscura, polvosas, con un crecimiento superficial lento (27  $\mu\text{m}$ ); en el reverso presentaron una coloración negro olivácea. Los micelios se observaron hialinos, septados, lisos, de 3-4  $\mu\text{m}$  de ancho; las hifas mostraron igual coloración que los micelios, aunque posteriormente se tornaban oscuras a medida que avanzaba la edad de la colonia. Los conidióforos eran de color oliváceo claro a oliváceo, formados sobre las hifas, semimacronematosos, rectos y no ramificados, lisos y septados, con una dimensión de 135-140  $\mu\text{m}$  de largo, aunque en ocasiones se observaron de menor tamaño, de 40 hasta 55  $\mu\text{m}$  y con un ancho de 2,7 a 3,2  $\mu\text{m}$ .

En cuanto a los conidios, se caracterizaron por ser de color olivo claro, equinulados y globosos en su gran mayoría, los cuales aparecen en cadenas simples o ramificadas y pueden presentar hasta un septo, de tamaño variable (6,1-7,9 x 3,05-6,03  $\mu\text{m}$ ); ramoconidios subglobosos, de color olivo claro, septados (de dos a tres septos) y de 11,07-14,16  $\mu\text{m}$  de largo x 5,5-6,3  $\mu\text{m}$  de ancho.

De acuerdo con las características informadas con anterioridad acerca de estos aislamientos, es de destacar que coinciden con las expuestas por Malone y Muskett (1964) y Ho *et al.* (1999) para la especie *Cladosporium sphaerospermum* Penz, lo cual se muestra en la figura 3.

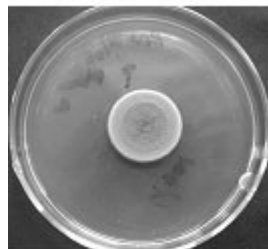


Fig. 3. Colonia de *C. sphaerospermum* (x 40).

Fig. 3. Colony of *C. sphaerospermum* (x 40).

Respecto a las colonias del aislamiento #32 cultivadas en APD, se caracterizaron culturalmente por presentar una coloración blanca, con bordes irregulares en el anverso; el crecimiento lineal fue lento (15 y 22 mm al octavo y décimotercer día de incubación a 25°C, respectivamente) y el crecimiento aéreo, escaso; se observó un micelio vegetativo sumergido, de apariencia granular, dado quizás por la producción de peritecios superficiales, los cuales reunían las siguientes características morfológicas: color negro, globosos, con un diámetro de 91 a 112  $\mu\text{m}$  y poseían pelos carmelitas con tonalidades casi negras; los pelos laterales eran rectos, más bien pardos, de aproximadamente 3,5 mm, de mayor grosor en la base y menor hacia el ápice hialino; mientras que los terminales tenían color pardo oscuro en su gran mayoría, no septados y se ramificaban de forma repetida. Las ascosporas eran hialinas cuando jóvenes y se tornaban carmelita al envejecer, presentaban forma ovalada u ovoide y medían de 4,30-5,73  $\mu\text{m}$  de largo x 4,0-4,78  $\mu\text{m}$  de ancho.

Acorde con las características descritas con anterioridad se pudo corroborar lo planteado por Malone y Muskett (1964) y Rodríguez (2003) para el género *Chaetomium* y en particular para la especie *Chaetomium indicum* Corda, y por consiguiente su identificación en las semillas en estudio (fig. 4).

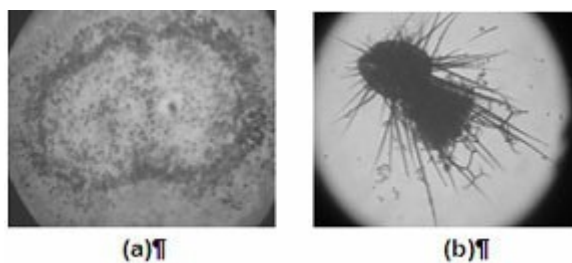


Fig. 4. Colonias (a) y peritecio (b) de *C. indicum*.

Fig. 4. Colonies (a) and perithecium (b) of *C. indicum*.

Con relación a la caracterización cultural del aislamiento #24 cultivado en APD, en el anverso de las placas se observaron colonias de color pardo grisáceo a gris, con bordes regulares, crecimiento aéreo escaso y lineal abundante (7 cm al séptimo día de incubación a 25°C).

Entre los caracteres morfológicos se observaron los siguientes: las hifas en algunas ocasiones se encontraron inmersas en el medio y, en otras, superficiales; eran más o menos cilíndricas, tabicadas, ramificadas en ángulos casi rectos y presentaron una coloración con tonalidades carmelitas. Los conidioforos a menudo surgen solitarios o en pequeños grupos, son ramificados, rectos o flexuosos, lisos, de color carmelita, con un tamaño de 3 a 6  $\mu\text{m}$  de ancho y con uno o varios conidios. Dichos conidios se forman en largas cadenas o a menudo en solitario, son obclavados, ovoides o elipsoidales, con un pico cilíndrico o cónico corto (de color pálido, de 2 a 4  $\mu\text{m}$  de ancho), lisos o verruculosos, de color carmelita con aproximadamente hasta ocho septos transversales y usualmente varios longitudinales, de 18-43 x 9-16  $\mu\text{m}$ .

Estos resultados del aislamiento #24 son similares a los obtenidos por Ellis (1971), López *et al.* (1999) y Cundóm y Cabrera (2002) para la especie *Alternaria alternata* (Fr) Keissler, lo que indica que es una de las especies presentes en las semillas de *L. leucocephala* cv. Perú (fig. 5).

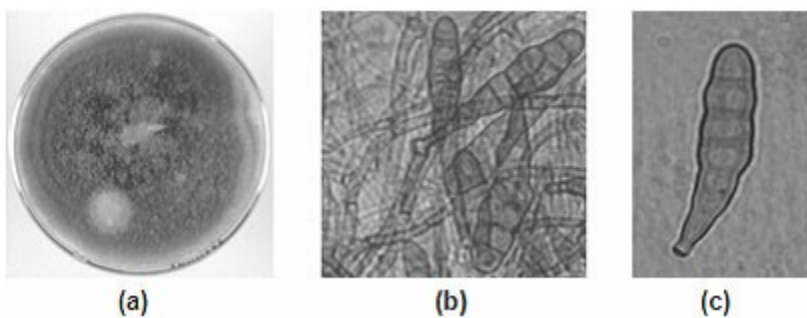


Fig. 5. Colonia (a), conidioforos (b) y (c) conidio de *A. alternata* (x 100).

Fig. 5. Colony (a), conidiophores (b) and (c) conidium of *A. alternata* (x 100).

En cuanto al aislamiento #11, su caracterización cultural se realizó en placas Petri en APD; en el anverso de estas se observaron colonias de color blanco cremoso, algodonosas, en forma de rosetas, de crecimiento superficial abundante (85 mm a los siete días de incubación a 25°C) y aéreo escaso, en cuyo centro se observó la presencia de acérvulos oscuros; mientras que en el reverso las colonias mostraron una coloración blanca con tonalidades amarillas.

Por otra parte, como características morfológicas se observaron: la presencia de conidioforos hialinos, irregularmente ramificados, septados, lisos y cortos; así como de conidios oscuros, rectos o ligeramente curvados, que poseían seis células (con la basal y la terminal hialina, y esta última puntiaguda con dos o más apéndices apicales hialinos, también elipsoidal o fusiforme).

Como resultado de esta caracterización se corroboró lo descrito por Sutton (1980), Barnett y Hunter (1999) y Montiel y Avelar (2001) para el género *Pestalotia*, por lo que se identificó el agente fungoso correspondiente al aislamiento #11 como *Pestalotia* sp. (fig. 6).

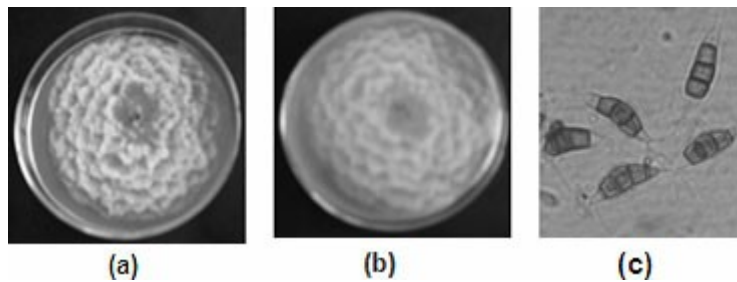


Fig. 6. Anverso (a) y reverso (b) de la colonia de *Pestalotia* sp. (x 40) y sus conidios (c) (x 100).

Fig. 6. Obverse (a) and back (b) of the *Pestalotia* sp. colony (x 40) and its conidia (c) (x 100).

El aislamiento #9 sembrado en placas Petri con AM, se caracterizó por producir colonias algodonosas de color blanco en el anverso al inicio, las que se tornaron verde rápidamente a medida que transcurría el período de incubación y presentaban bordes regulares de crecimiento radial uniforme (aproximadamente 6 cm al cuarto día de incubación); mientras que el reverso de la colonia permaneció incoloro.

En cuanto a su caracterización morfológica se observó que el micelio estaba compuesto por hifas hialinas, septadas, ramificadas, de paredes lisas y de 4,6-5,13  $\mu\text{m}$  de diámetro. Se observaron clamidosporas intercalares, principalmente globosas, de paredes lisas, incoloras y de 6-12  $\mu\text{m}$  de diámetro. Los conidioforos se encontraron ramificados y no terminaban en punta de micelio, sino en fialides, las cuales tenían forma de botella. Los conidios se corresponden con fialosporas ovoides a subglobosas, de color verde pálido, aparentemente lisas, que se producen solas y sucesivamente se acumulan en el extremo de cada fialide para formar una cabeza conidial globosa; miden de 2,8-3,2 x 2,3-2,8  $\mu\text{m}$ , con un promedio de 2,94 x 2,67  $\mu\text{m}$ .

Teniendo en cuenta las características observadas del aislamiento #9, se puede plantear que se corresponden con las citadas por Rifai (1969), Samuel *et al.* (1998) y Barnett y Hunter (1999) para las especies del género *Trichoderma*, por lo que este agente fungoso se clasifica como *Trichoderma* sp. (fig. 7).

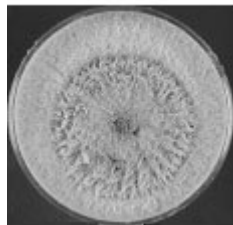


Fig. 7. Colonia de *Trichoderma* sp. (x 40).

Fig. 7. Colony of *Trichoderma* sp. (x 40).

Después de realizar la identificación de las especies fungosas se comprobó que *P. expansum*, *C. sphaerospermum* y *C. indicum* son informados por primera vez para la especie forrajera *L. leucocephala*; mientras que *A. alternata*, conjuntamente con las anteriores, también lo son para el cultivar Perú en Cuba, ya que según la revisión bibliográfica de los principales trabajos publicados en el país (Delgado *et al.*, 1989; Pazos, 1989; Alonso *et al.*, 1996; Pupo y Heredia, 1998; González *et al.*, 2006), no se citan con anterioridad.

### Conclusión

De acuerdo con la caracterización cultural y morfológica de los 12 aislamientos, se identificaron siete especies fungosas presentes en las semillas almacenadas de *L. leucocephala* cv. Perú: *Penicillium expansum* Link, *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. ex Fr., *Cladosporium sphaerospermum* Penz., *Chaetomium indicum* Corda, *Alternaria alternata* (Fr) Keissl., *Pestalotia* sp. y *Trichoderma* sp., lo que ratifica que dichos caracteres constituyen una herramienta importante para la identificación hasta la categoría de especie cuando se comparan con lo descrito en las claves taxonómicas. Además, es válido destacar que la primera, tercera, cuarta y quinta especies fungosas constituyen nuevos informes para esta leguminosa forrajera en el país.

### Recomendaciones

Continuar los estudios de los aislamientos #9 y #11, con vista a completar la identificación hasta la categoría de especie en los géneros *Trichoderma* y *Pestalotia*.

Identificar las especies fungosas correspondientes al resto de los aislamientos.

### Referencias bibliográficas

- Alonso, O. *et al.* 1996. Hongos asociados a las semillas de una leguminosa tropical (*Leucaena leucocephala* cv. Perú). *Pastos y Forrajes*. 19 (2):161
- Barnett, H.L. & Hunter, B.B. 1999. Illustrated genera of imperfect fungi (fourth edition). The American Phytopathological Society. Pilot Knob Rodal, St Paul, Minnesota, USA. 216 p.
- Bernal, A. *et al.* 2005. Caracterización cultural de tres aislamientos de *Cladosporium fulvum* Cooke. *Centro Agrícola*. 32 (3):93
- CABI. 2003. Seed-borne disease. In: Crop protection compendium. (cd-rom). CAB International, UK
- Cruz, Mileydi *et al.* 2004. Caracterización de aislados de *Pseudocercospora fijiensis* Morelet para su utilización en programas de mejoramiento de *Musa* sp. Memorias. Seminario Científico Internacional de Sanidad Vegetal. 44 Reunión Anual de la Sociedad Americana de Fitopatología. División Caribe. La Habana, Cuba. [cd-rom]
- Cundóm, M.A. & Cabrera. M.G. 2002. Nota corta: Tizón foliar de *Celosia argentea* en el nordeste de Argentina. *Invest. Agr.: Prod. Prot. Veg.* 17 (3):463
- Delgado, A. *et al.* 1989. Estudio de la gomosis bacteriana en legumbres de *Leucaena leucocephala* (Lam) de Wit. *Pastos y Forrajes*. 12:127
- Ellis, M.B. 1971. Demateaceous Hyphomycetes. Commonwealth Micological Institute. Kew, Surrey, England
- González, Gloria *et al.* 2006. Fitopatógenos en los cultivos de pastos y forrajes en Cuba. *Fitosanidad*. 10 (1):11
- Ho, M.H.M. *et al.* 1999. *Cladosporium sphaerospermum*. In: *Cladosporium and Cladophialophora in culture: descriptions and an expanded key. Mycotaxon*. 72:115
- ISTA. 1999. International rules for seed testing. *Seed Science and Technology*. Supplement. 27. 302 p.
- Lenné, Jilliam M. & Boa, E.R. 1994. Diseases of tree legumes. In: Forage tree legumes in tropical agriculture. (Eds. Gutteridge, R.C. & Shelton, H. M.). CAB International, UK. p. 292
- Lezcano, J.C. *et al.* 2007. Determinación de la calidad de las semillas de *Leucaena leucocephala* cv. Perú almacenadas al ambiente. *Pastos y Forrajes*. 30 (1):107
- López, María O. *et al.* 1999. Manual para la identificación de los hongos fitopatógenos de la caña de azúcar en Cuba. *Acta Botánica Cubana*. 124:75



- Lunn, J. 1977. *Rhizopus stolonifer*. In: Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Commonwealth Mycological Institute (CAB) (Set 53). Kew, Surrey, England. # 524. s/p
- Malone, J.P. & Muskett, A.E. 1964. Seed-borne fungus description of 77 fungus species. In: Proceedings of the International Seed Testing Association. Edité par l'Association Internationale d'Essais de Semences. Wageningen, Holand. Vol. 29, No. 2, 383 p.
- Montiel, Rosaura D. & Avelar, J.J. 2001. Etiología de la enfermedad "clavo del guayabo". Trabajo presentado en la 5<sup>ta</sup> Jornada de Investigación, 25 al 29 de junio. Universidad Autónoma de Zacatecas, México. 11 p.
- Onions, A.H.S. 1966. *Penicillium expansum*. In: Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Commonwealth Mycological Institute (CAB) (Set 10). Kew, Surrey, England. # 97. s/p
- Pazos, R. 1989. Plagas, enfermedades y malezas en pastos. Documento de campo. Proyecto PNUD/FAO-CUB/86/005. Instituto de Investigaciones de Pastos y Forrajes-MINAG. La Habana, Cuba. 41 p.
- Pérez, A. *et al.* 2000. Tecnología para la producción de semillas de gramíneas y leguminosas. En: Tecnología para la producción de semillas de pastos tropicales. Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey". Matanzas, Cuba. p. 17
- Pupo, Elsie & Heredia, Irma. 1989. Lista de hongos asociados a las semillas de *Leucaena leucocephala*. Boletín técnico. No. 1. Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, Cuba. p. 26
- Rayner, R.W. 1970. A mycological colour chart. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. s/p
- Rifai, M.A. 1969. A revision of the genus *Trichoderma*. *Micological Paper*. No. 116, p. 1
- Rodríguez, Kendra. 2003. Estudio taxonómico (morfológico y molecular) de especies del género *Chaetomium* y géneros afines. Tesis presentada en opción al grado de Doctor en Ciencias Agrícolas. Universitat Rovira i Virgili. Facultat de Medicina i Ciències de la Salut. Departament de Ciències Mèdiques. Unitat de Biologia. España. 173 p.
- Samuel, G.J. *et al.* 1998. The *Hypocrea schweinitzii* complex and *Trichoderma* sect. *Longibrachiatum*. *Studies in Mycology*. 41. Centraalbureau voor schimmelcultuur, Baarn/delft. The Netherlands Academy of Arts and Science. 53 p.
- Sutton, B. 1980. *Pestalotia* de Not. In: The coelomycetes fungi imperfecti with picnidia acervuli and stromata. Commonwealth Mycological Institute (CAB) (Set 10). Kew, Surrey, England. p. 263

Recibido el 8 de junio del 2009

Aceptado el 20 de noviembre del 2009

## Cultural and morphological characterization and identification of 12 fungal isolations in seeds of *Leucaena leucocephala* cv. Peru

### Abstract

The objective of this study was to identify the fungal agents associated to seeds of *Leucaena leucocephala* cv. Peru stored under ambient conditions, from the cultural and morphological characterization of 12 pure isolations; they were obtained from planting the fungal structures (vegetative and/or reproductive), in Petri dishes (9 cm diameter) which contained Potato Dextrose Agar (PDA) and Malt Agar (MA). The dishes were incubated for 10 days at 25°C, alternating 8 h light/16 h darkness or at constant darkness, according to the requirements of each organism. Seven fungal agents associated to the seeds were identified, which were classified taking into consideration the cultural and morphological characteristics, and they were corroborated with the taxonomic keys. This allowed to group: *Penicillium expansum* Link, *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. Ex Fr., *Cladosporium sphaerospermum* Penz., *Chaetomium indicum* Corda, *Alternaria alternata* (Fr) Keissl., *Pestalotia* sp. and *Trichoderma* sp. Such characteristics constitute an important tool for the identification of fungi to the species level, for which new studies with isolations #9 and #11 are recommended in order to complete the identification to species level in the case of genera *Trichoderma* and *Pestalotia*; as well as to identify the fungal species of the other isolations.

*Key words:* Fungi, *Leucaena leucocephala* cv. Peru, seeds

### Introduction

Seed health is an element to be considered in the productive process of *Leucaena leucocephala* cv. Peru, because the success of this plant's propagation, commercialization and perpetuation in nature depends largely on it.

However, in the international scientific literature it is not common to find references that approach the topic thoroughly and most of it is restricted to reports of the list of pathogen organisms that affect such forage plant in different countries, as in the case of the report made by Lenné and Boa (1994) about the diseases of leguminous trees, where they emphasize the presence of *Camptomeris leucaneae*, *Ganoderma licidium* and *Fusarium oxysporum*, among the most important ones present in *L. leucocephala*.

In such sense, in Cuba the presence of numerous microorganisms has been recently reported, affecting not only the seed production of this legume under field conditions, but also bringing about considerable losses that accelerate quality deterioration and can even cause their death in the storehouse where they are placed for their conservation (Lezcano *et al.*, 2007), which is mainly due to the discoloration, color and aspect alteration (because of rotting) and the decrease of germinative capacity and viability, among other examples.

Among the pathogen agents associated to the seeds of *L. leucocephala* cv. Peru, fungi constitute the most numerous group and one of the most important ones. Yet, the research related to the identification of these agents in Cuba have not been completed, because in the reviewed literature reference is made to only two preliminary studies conducted by Delgado *et al.* (1989) and Alonso *et al.* (1996), who classified only, to generic level, the 18 fungi they found in the seeds of this cultivar, including: *Trichoderma* sp., *Rhizopus* sp., *Phoma* sp., *Drechslera* sp., *Chaetomium* sp., *Gonatobotrys* sp., *Alternaria* sp., *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Botrytis* sp., *Curvularia* sp., *Doratomyces* sp., *Helmisthosporium* sp., *Macrophomina* sp., *Nigrospora* sp. and *Rhizoctonia* sp.

For such reason, the search for diverse diagnosis methods is necessary, such as cultural and morphological characterization (Cruz *et al.*, 2004; Bernal *et al.*, 2005), which through the *in vitro* description of the most

important characteristics of saprophyte or pathogen agents, allow identification until the species level, together with the use of taxonomic keys. Such aspect constituted the main objective of this work, which due to its importance should be an element to be considered at present, when the utilization of *L. leucocephala* cv. Peru has increased, especially if it is taken into account that its botanical seed constitutes an economical way for the dissemination of this tree in the country (Pérez *et al.*, 2000).

### Materials and Methods

*Plant material.* Seeds of *L. leucocephala* cv. Peru, with six and 18 months of storage under ambient conditions, from the storehouse of the seed farm “La Rioja”, belonging to the “José Martí” Livestock Production Firm, in Matanzas province, Cuba.

*Site where the research was conducted.* Laboratory of Plant Mycology of the National Center of Agricultural Health (CENSA) in Havana, Cuba.

*Fungi isolation and pure culture obtaining.* The different fungal structures (vegetative and/or reproductive) found in the seeds when subject to the Blotter test, recommended by ISTA (1999), were observed with a stereomicroscope Zeiss SV-6, using ocular lens from 10 to 100 x. With the use of previously disinfected needles they were sown in glass Petri dishes, 9 cm diameter, which contained Potato Dextrose Agar (PDA) medium, and were incubated at 28°C for 7 days. At the end of this period, from the 32 cultures fixed preparations were set on microscope slides for their observation under the optical microscope (Zeiss Standard 25), and according to the structures the 12 selected isolations were grouped, by genera.

For obtaining the pure crops, from each Petri dish a 7-mm mycelial disc was extracted of the 12 isolations, which were transferred on PDA wedges in 22 x 165-mm glass tubes aiming at their conservation. Afterward, each isolation was sown in Petri dishes and when the cultures were 10-15 days old, a 7-mm mycelial disc was extracted and placed on the center of the dishes (replicas) to perform the measurements.

Such dishes were sealed with paraffin paper (Parafilm) and were incubated for 10 days at 25°C, alternating 8 h light/16 h darkness or at constant darkness, according to the requirements for each organism.

*Cultural characterization.* The following aspects were taken into consideration: color of the colony on the obverse and back of the dish, texture, lineal growth (expressed in cm/day) and aerial growth. In the case of the lineal mycelial growth of each isolation, the colony diameter was measured (two daily measurements, at 8:00 a.m. and 4:00 p.m. until the tenth day); while the coloring of the colony was determined by means of Rayner's color chart (1970).

The culture media (belonging to the Merck firm) respond to the criteria of the scientific literature, reflected on the first, third, fourth and seventh of the taxonomic keys that are included below, referring to each fungal genus, according to the grouping in relation to its vegetative and reproductive structures.

Isolations #8, #11, #15, #16, #24 and #32 were cultivated on Potato Dextrose Agar (PDA); #1, #13 and #14 on Czapek Agar (ZA) and #1, #9, #12, #13, #14 and #23 on Malt Agar.

*Morphological characterization.* The size (in  $\mu\text{m}$ ), shape and color of the vegetative and reproductive structures in the cultures of the 12 isolations were taken into consideration. For each structure 50 measurements were made, in an optical microscope Zeiss Standard 25 (ocular lens 10-100 x), with a micrometric scale, in order to corroborate the classification of the fungal species, according to the taxonomic keys.

*Taxonomic keys used for fungi identification.* Malone and Muskett (1964), Onions (1966), Rifai (1969), Ellis (1971), Lunn (1977), Sutton (1980), Barnett and Hunter (1999), Ho *et al.* (1999) and López *et al.* (1999).

### Results and Discussion

As a result of this study, reference is made below to the cultural and morphological characterization of the 12 analyzed isolations, aiming at the identification of the fungal species.

In the case of isolations #1, #13 and #14, they culturally showed a similar performance in the media where they were cultivated (ZA and MA). In the dishes with cultures on ZA incubated at 25°C, they produced on the obverse fast growth (16 mm diameter on the seventh day of incubation), grayish green colonies, often with a radial zone with irregular white edges, which became grayish green with the production of conidia.

On the back the colonies were generally colorless, although an isolation (#13) also showed brown color with yellow shades.

On MA medium the colonies of these isolations incubated at 25°C, on the obverse of the dishes they appeared felt-like and grayish green in color, with equal powdery white radial zone, with scarce aerial growth and moderately abundant surface growth (40 and 50 mm seven and 13 days after the beginning of incubation, respectively), which corroborates the results obtained by Onions (1966) who expressed that the colonies of this fungus grow more rapidly on MA than on ZA medium. On the back the colonies did not show a clear distinction and tended to be colorless, like on ZA medium.

From the morphological point of view, the main characteristics of the structures, from the cultures on ZA, were: the production of conidial asymmetrical heads, branched, enlarged and with long conidia chains. On the other hand, they showed penicilliate conidiophores with phialides, smooth, moderately long, 345-371 x 3,02-3,16 µm (length x width); 13-21 x 2,0-2,9 µm branches and phialides in groups of five, which can reach nine, with variable size, 8-12 x 2-2,5 µm and sometimes longer. The conidia were observed to be smooth and elliptical and with a size of 3,68-4,09 x 2,68-3,04 µm.

On the other hand, the structures from the cultures on MA were similar to the above-described ones, with the only difference in the fact that the conidial heads may have one or two branches.

Both groups of characteristics coincide with the reports by Onion (1966) and CABI (2003) for the species *Penicillium expansum* Link; hence there is correspondence with the one found in this study (fig. 1).

From isolations #8, #15 and #16, which grew on PDA and were incubated at 25°C, white colonies were obtained, cottony when young, and which turned brownish black in color with maturity, due to the presence of sporangia. An important aspect in all the isolations was the fast dissemination shown by the colonies in the cultures, covering the Petri dishes after 24-48 h. This situation occurred due to the presence of creeping stolons fixed through rhizoids to several points of the substratum.

As morphological characters of these isolations, sporangiophores were observed, 30-34 µm wide and 90-3 100 µm long, with smooth walls, not septate, light brown in color, simple, which sometimes arose in groups of 3-5, from stolons and opposite rhizoids. The sporangia, from globose to subglobose, white at first and then black, they measured 100-350 µm of diameter. The columellae were subglobose to flattened, brownish grey, umbrella-shaped when dehisced, measuring 60-198 x 67-135 µm. The rhizoids and stolons were hyaline and sometimes appeared to be dark brown. The sporangiospores showed different shapes: elongated, oval and round, but almost always irregular and variable in shape (13-17 µm).

The previous description coincides with the reports made by Malone and Muskett (1964) and Lunn (1977) about the species *Rhizopus stolonifer* (Ehremb. Ex Fr) Lind., for which this fungal agent was also thus classified (fig. 2).

The colonies of isolations #12 and #23 on MA and incubated at 25°C, from the cultural point of view, on the seventh day showed on the obverse a light olivaceous grey color to dark olivaceous grey, powdery, with slow surface growth (27 mm); on the back they showed olivaceous black color. The mycelia were observed to be hyaline, septate, smooth, 3-4 µm wide; the hyphae showed equal color as the mycelia, although they turned dark later as the age of the colony advanced. The conidiophores were light olive green to olive green in color, formed on the hyphae, semi-macronematose, straight and not branched, smooth and septate, 135-140 µm long, although they were sometimes observed in smaller size, from 40 to 55 µm and 2,7-3,2 µm wide.

Regarding the conidia, they were light olive green in color, mostly equinulated and globose, appearing in simple or branched chains and can have up to a septum, variable size (6,1-7,9 x 3,05-6,03 µm); subglobose ramoconidia, light olive green in color, septate (from two to three septa) and 11,07-14,16 µm long x 5,5-6,3 µm long.

According to the above-reported characteristics about these isolations, it should be emphasized that they coincide with the ones registered by Malone and Muskett (1964) and Ho *et al.* (1999) for the species *Cladosporium sphaerospermum*, which is shown in figure 3.

Regarding the colonies of isolation #32 cultivated on DPA, they showed white color, with irregular edges on the obverse; the lineal growth was slow (15 and 22 mm on the eighth and thirteenth day of incubation at 25°C, respectively) and the aerial growth was scarce; a submerged vegetative mycelium, of granular appearance, was observed, maybe due to the production of surface perithecia, which had the following morphological characteristics: black color, globose, 91-112 µm diameter and showed brown hairs with almost black shades; the lateral hairs were straight, rather brown, of about 3,5 µm, thicker at the base and tapering towards the hyaline tip; while the terminal hairs were mostly dark brown in color, not septate and repeatedly branched. The ascospores were hyaline when young, turned brown when older, oval or ovoid in shape and measured 4,30-5,73 µm long x 4,0-4,78 µm wide.

According to the above-described characteristics, the descriptions made by Malone and Muskett (1964) and Rodríguez (2003) for the *Chaetomium* genus and particularly for the species *Chaetomium indicum* Corda could be corroborated, and hence it could be identified in the studied seeds (fig. 4).

With regards to the cultural characterization of isolation #24 cultivated on PDA, on the obverse of the dishes colonies were observed grayish brown to grey in color, with regular edges, scarce aerial growth and abundant lineal growth (7 cm on the seventh day of incubation at 25°C).

Among the morphological characteristics the following were observed: the hyphae were found sometimes immersed in the medium and, on other occasions, on the surface; they were more or less cylindrical, partitioned, branched in almost right angles and their color had brown shades. The conidiophores often emerge alone or in small groups, they are branched, straight or flexuose, smooth, brown in color, with a size from 3 to 6 µm wide and with one or several conidia. Such conidia are formed in long chains or often alone, they are obclavate, ovoid or ellipsoidal, with a cylindrical or short conical beak (pale, 2-4 µm wide), smooth or verruculose, brown in color with up to about eight transverse septa and usually several longitudinal ones, 18-43 x 9-16 µm.

These results of isolation #24 are similar to the ones obtained by Ellis (1971), López *et al.* (1999) and Cundóm and Cabrera (2002) for the species *Alternaria alternata* (Fr) Keissler, which indicates that it is one of the species present in the seeds of *L. leucocephala* cv. Peru (fig. 5).

Regarding isolation #11, its cultural characterization was made in Petri dishes on PDA; on their obverse the colonies were creamy white, cottony, rosette-shaped, of abundant surface growth (85 mm after seven days of incubation at 25°C) and scarce aerial growth, in which center the presence of dark acervuli was observed; while on the back the colonies showed white color with yellow shades.

On the other hand, the following morphological characteristics were observed: presence of hyaline conidiophores, irregularly branched, septate, smooth and short; as well as dark, straight or slightly curved conidia, which had six cells (with the basal and end cells hyaline, and the latter pointed, with two or more hyaline apical appendages, also ellipsoidal or fusiform).

As a result of this characterization, the description made by Sutton (1980), Barnett and Hunter (1999) and Montiel and Aelar (2001) for the *Pestalotia* genus was corroborated, for which the fungal agent corresponding to isolation #11 was identified as *Pestalotia* sp. (fig. 6).

Isolation #9, sown in Petri dishes with MA, produced cottony white colonies on the obverse at the beginning, which turned green rapidly as the incubation period advanced and showed regular edges of uniform radial growth (approximately 6 cm on the fourth day of incubation); while the back of the colony remained colorless.

Regarding their morphological characterization, the mycelium was observed to be composed by hyaline hyphae, septate, branched, smooth-walled and 4,6-5,13  $\mu\text{m}$  in diameter. The conidiophores were branched and did not end in mycelium tip, but in phialides, which were bottle-shaped. The conidia correspond to ovoid to subglobose, pale green, apparently smooth phialospores, which are produced alone and are successively accumulated on the tip of each phialide to form a globose conidial head, they measured 2,8-3,2 x 2,3-2,8  $\mu\text{m}$  with an average of 2,94 x 2,67  $\mu\text{m}$ .

Taking into consideration the observed characteristics of isolation #9, it can be stated that they correspond to the ones cited by Rifai (1969), Samuel *et al.* (1998) and Barnett and Hunter (1999) for the species of the *Trichoderma* genus, for which this fungal agent is classified as *Trichoderma* sp. (fig. 7).

After making the identification of the fungal species, it was observed that *P. expansum*, *C. sphaerospermum* and *C. indicum* are reported for the first time in the forage species *L. leucocephala*; while *A. alternata*, together with the above-mentioned ones, is also mentioned for the first time for cultivar Peru in Cuba, because according to the bibliographical review, taking into consideration the main works published in the country (Delgado *et al.*, 1989; Pazos, 1989; Alonso *et al.*, 1996; Pupo and Heredia, 1998 and González *et al.*, 2006), they had not been previously cited.

### Conclusion

According to the cultural and morphological characterization of the 12 isolations, seven fungal species present in the stored seeds of *L. leucocephala* cv. Peru were identified: *Penicillium expansum* Link, *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. Ex Fr., *Cladosporium sphaerospermum* Penz., *Chaetomium indicum* Corda, *Alternaria alternata* (Fr) Keissl., *Pestalotia* sp. and *Trichoderma* sp., which corroborates that such characteristics constitute an important tool for the identification to the species category when they are compared to the descriptions in the taxonomic keys. In addition, it is valid to emphasize that the first, third, fourth and fifth fungal species constitute new reports for this forage legume plant in the country.

### Recommendations

To continue the studies of isolations #9 and #11, in order to complete the identification to the species category in genera *Trichoderma* and *Pestalotia*.

To identify the fungal species which correspond to the other isolations.