
**CONTRIBUCION AL CONOCIMIENTO DE LA
BIOLOGIA Y TAXONOMIA DE UN HONGO DEL
GENERO *PYTHIUM* AISLADO DEL "ALISO "
ALNUS ACUMINATA HBK**

MARINA CORREA DE RESTREPO
ORLANDO CABRERA
ESPERANZA RODRIGUEZ

Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Biología. Apartado Aereo
23227. Bogotá, Colombia.

RESUMEN

Se estudió la biología de un hongo aislado de la parte externa de nódulos de raíces de aliso (*Alnus acuminata* HBK), el cual presentó un alto poder de germinación a bajas temperaturas (entre 0°C y 4°C), condición que le confiere gran agresividad para colonizar el suelo, de tal forma que se constituye en un factor importante en la ecofisiología de las poblaciones de aliso que crecen en los bosques secundarios del sub-páramo. A partir de cultivos puros se hicieron estudios para su identificación.

Revisada la literatura pertinente se lo ubicó dentro del género *Pythium*, pero no dentro de ninguna especie descrita, por lo cual suponemos que se trate de una nueva especie. A la técnica común de un microcultivo se le introdujo una modificación que permitió que dicha técnica fuera más sencilla y segura, con lo cual hicimos observaciones directas del crecimiento y desarrollo del hongo en condiciones óptimas para las descripciones morfológicas. Por ahora lo nombramos *Pythium* cerca a *mammillatum* Meurs.

SUMMARY

Some biological aspects of an isolated fungus of *Alnus acuminata* roots were studied. It has been found that between 0°C and 4°C the fungus grows fast. This condition can result in an important factor in the ecophysiology of "Aliso" populations, that grows in secondary forests at sub-páramo.

After a review of the taxonomic literature, we placed it in the *Phytium* genus, but not in a particular described species. We assume that it is a new species.

We modified the microculture technique that was simpler and safer and then we made direct observations about the fungus growth and development.

As for now it is nominated as *Phytium* near *Mammillatum* Meurs.

Palabras Claves: *Phytium*, hongos, *Alnus acuminata* HBK., "Aliso".

INTRODUCCION

El estudio de la biología de los microorganismos constituye la base misma de la eficiencia con la cual el hombre pueda manejarlos. A este manejo racional y científico se le ha dado el nombre de biotecnología.

Dentro de la familia Pythiaceae existen grupos de hongos de habitat acuático, anfibio y terrestre; muchos de estos últimos son causantes de enfermedades en plantas de interés económico.

Investigamos la biología de este hongo que se aisló de la parte externa de nódulos de raíces de *Alnus acuminata* HBK (aliso), árbol de importancia económica utilizado con buenos resultados en reforestación, ya que una de sus características es que el actinomicete que entra en simbiosis con su raíz y que induce la formación de los nódulos, le permite fijar nitrógeno.

La clasificación e identificación de esta clase de microorganismo es importante ya que relaciona las características biológicas y el papel específico que cumplen en un habitat determinado.

METODOLOGIA

1) El hongo se aisló de la parte externa de nódulos de raíces de *Alnus acuminata* coleccionadas en una zona adyacente a la represa del Neusa (Cundinamarca).

Las raíces se desinfectaron con una solución de hipoclorito de sodio al 1%, se seccionaron y sembraron en PDA y se obtuvieron cultivos iniciales.

TABLA 1 - "Condiciones de temperatura en los cuales se estudiaron los cultivos del hongo"

Temperatura	0° - 2°C	15 - 20°C	30 - 32°C
Oscuridad	PDA NAv NAv-st	PDA NAv NAv-st	PDA NAv NAv-st
			Cajas de Petrí
	mNAv mNAv-st	mNAv mNAv-st	mNAv mNAv-st
			Micro-cultivos
Luz Día		PDA NAv NAv-st	Caja de Petrí
		mNAv mNAv-st	Microcultivos
Luz Incandescente		PDA NAv NAv-st	Caja de Petrí
		mNAv mNAv-st	Microcultivos

PDA : Dextrosa , Agar , papa

NAv : Nitrato Aceite vegetal con tiamina

NAv-st : Nitrato Aceite vegetal sin tiamina

mNAv, mNAv-st : Medios en microcultivo

) A partir de estos aislamientos iniciales, el hongo se sembró en diferentes medios de cultivo: a) NAV con tiamina; b) NAV sin tiamina (NAV - st), medio específico para el desarrollo y crecimiento de *Phytophthora* spp y de *Pythium* spp; y c) papa dextrosa agar (PDA). Como se muestra en la tabla 1, los cultivos se mantuvieron en diferentes condiciones de temperatura y de iluminación.

3) Se mejoró la técnica de microcultivo, impregnando las láminas porta-objeto con el medio, sembrando el hongo y dejándolo crecer por tiempos determinados y diferentes. Las distintas muestras se colocaron en azul de lactofenol y se sellaron, lo cual permitió hacer observaciones directamente "in situ".

TABLA - 2 . "Crecimiento del hongo entre 15 y 20°C en diferentes condiciones de luz y medios de cultivo "

	Medio	3° Día	5 Día
Oscuridad	PDA	1.5 cm	
	NAv	2.5 ± 0	3.23 ± 0.35
	NAv - st	2.5 ± 0.71	
Luz Día	PDA	1.53 ± 0.05	2.4 ± 0.12
	NAv	2.3 ± 0.75	3.77 ± 0.75
	NAv - st	2.7 ± 0.15	4.3 ± 0.26
Luz incandescente	PDA	3.75 ± 0.35	4.75 ± 0.35
	NAv	2.0 ± 0.7	4.75 ± 0.21
	NAv - st	1.75 ± 1.0	3.83 ± 0.42

4) Para la identificación a nivel de género se utilizaron las descripciones de Domsch K. *et. al* (1980) y de Sparrow (1959). Las claves de este último autor se consultaron para establecer la identidad a nivel de especie.

5) El cultivo inicial fué obtenido por la profesora Emira de Granada

RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados que se presentan en la Tabla 2 y en las figuras 1 y 2 muestran el crecimiento del hongo en cms. en el tercero y quinto día, en los diferentes tratamientos.

EN DPA, a temperatura ambiente, en cajas de petri, al cabo de dos semanas, el hongo cuyas hifas son blanquecinas y delgadas, muestra un notable crecimiento hacia arriba, en forma arborescente, que parte del estrato basal o vegetativo y tiende a formar hacia arriba una estructura tridimensional, semejante a una esfera; en conjunto presenta un aspecto algodonoso formando los típicos pilares que caracterizan su apariencia macroscópica.

En NAV, a temperatura ambiente, en caja de petri, el crecimiento es menos vigoroso que en PDA, pues el efecto descrito anteriormente sólo se observa a partir de la tercera semana. En ambos casos las hifas conservan el aspecto algodonoso y la coloración blanca.

Tabla 3 - Diametro en micrones de los oogonios en NAV a 0° C y 20° C y en PDA a 20° C , además las medidas de las equinulaciones de su pared .

ESTRUCTURA	TEMP	DIAMETRO		EQUINULACIONES			
		X	n	X	n	X	n
OOGONIOS	(NAV) 0° C	11.2	1.93	25	1.95	0.65	25
OOGONIOS	(NAV) 20° C	11.03	2.06	50	1.64	0.77	50
OOGONIOS	(PDA) 20° C	13.75	1.2	25	1.69	0.41	25

Tabla 4 - Medidas de los anteridios y las zoosporas en micrones.

ESTRUCTURA	LARGO			ANCHO		
	X	n	X	n	X	n
ANTERIDIOS	13.1	3.22	50	10	2.72	50
ZOOSPORAS	9.5	2.10	5	6	1.37	5

Otros resultados no tabulados, debido a que no hubo crecimiento ponderado, muestran que en NAV - st., a 32°C y a los 6 días, se observaron pequeñas colonias de 1 mm. de diámetro; en las mismas condiciones en PDA se observaron colonias de 3 mm. de diámetro.

En NAV, a 4°C a los 6 días se observó germinación de los oogonios, los cuales se mantuvieron sin sufrir cambios durante 10 días.

Los resultados que se muestran a continuación, se refieren a lo planteado en la tabla 1:

En los tratamientos con NAV, oscuridad y en condiciones de laboratorio $\pm 20^{\circ}\text{C}$, los cultivos mostraron numeros oogonios; igual respuesta tuvieron algunos cultivos en NAV, bajo luz incandescente, en condiciones de laboratorio, mientras que otros cultivos presentaron oogonios y anteridios.

Por otra parte los cultivos en NAV-st, luz incandescente y condiciones de laboratorio sólo presentaron oogonios.

En algunos microcultivos en PDA, luz-día en condiciones de laboratorio, al quinto día aparecieron gran cantidad de anteridios que al sexto día, fueron visibles en todos los microcultivos.

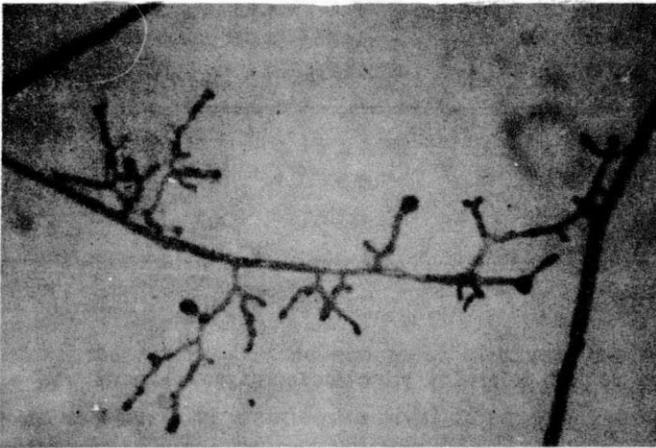


Fig.3. Anteridios en diferentes estados de desarrollo. 400 X

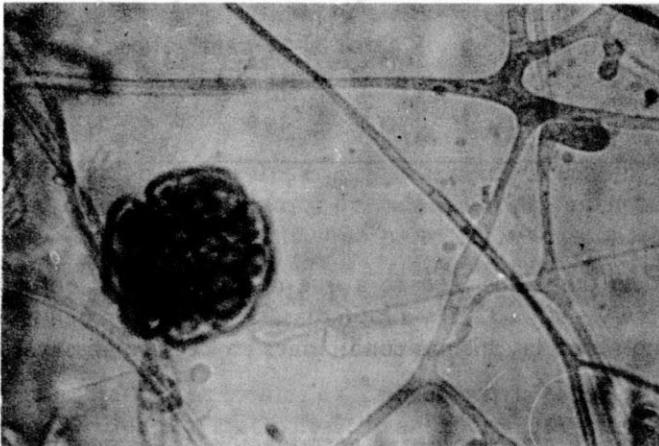


Fig. 4. Zoosporangios intercalares (Z), morfológicamente poco diferenciados formando zoosporas en la vesícula (V). 400 X

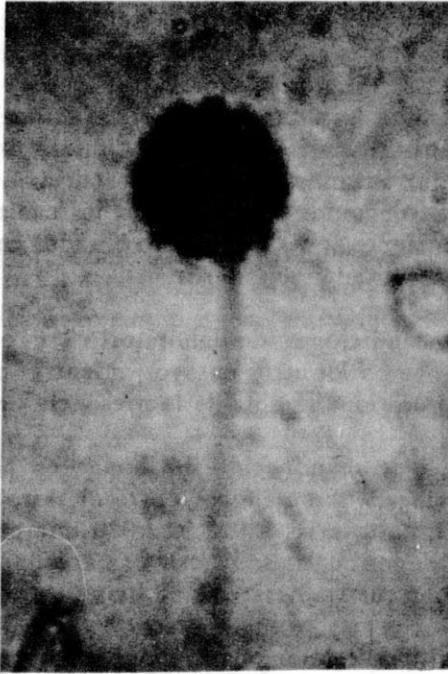


Fig. 5. Oogonio situado en el ápice de una hifa reproductiva, la pared presenta protuberancias con el ápice truncado. 400 X

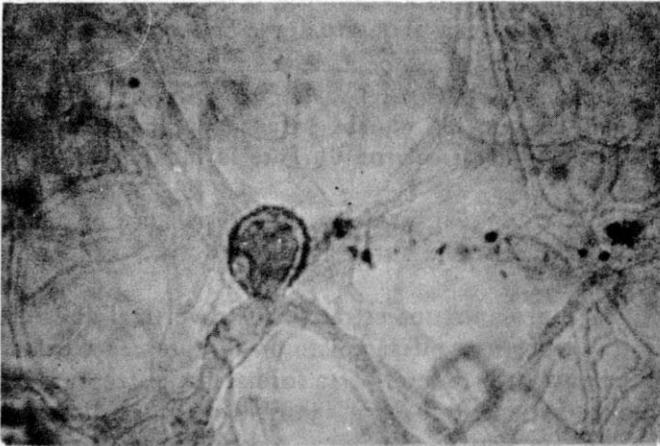


Fig. 6. Oospora de *Phytium sp.* germinando. Nótese la pared gruesa característica de la oospora. 400X

Los microcultivos en PDA, oscuridad y condiciones de laboratorio presentaron tanto anteridios como oogonios.

En los microcultivos colocados en estufa a 32°C, el hongo no presentó desarrollo vegetativo ni reproductivo de ningún tipo.

En resumen, en los medios utilizados en este trabajo, al sexto día, temperatura ambiente, bajo luz día, luz incandescente y en oscuridad, el hongo produjo anteridios, y al séptimo día oogonios y esporangios, los cuales no fueron fáciles de diferenciar morfológicamente de las hifas, pero basados en la ubicación de las vesículas, se dedujo que su posición es intercalar.

En DPA, oscuridad y condiciones de laboratorio, se observó una mayor proporción de anteridios que en los otros ensayos; mientras que en NAV-st, luz día y condiciones de laboratorio, fué notable la presencia de oogonios.

Con base en la evidencia de germinación del hongo en nevera, se diseñó el experimento para confirmarla, observándose entre el tercero y quinto día un desarrollo máximo en longitud de las hifas de 1.000 micrones, permaneciendo detenido 10 días, al cabo de los cuales se reactivó su crecimiento; a temperatura ambiente tales cultivos continuaron desarrollándose en un micelio normal.

Las cajas de petri con cultivos del hongo en PDA permanecieron a temperatura de 0°C, en nevera durante 3 semanas, al cabo de las cuales se sacaron y examinaron, notándose ausencia de estructuras de reproducción sexual y presencia de hifas dispuestas en cabellera. Un día después, a temperatura ambiente, se encontraron numerosos anteridios con apariencia granulosa (Fig. 3). Al segundo día se hizo evidente la presencia de oogonios y al quinto día se observaron vesículas en la zona de unión entre dos colonias.

Se destaca el hecho de que las nuevas hifas aparecen más blanquecinas y agodonosas que las que se desarrollaron durante la incubación en nevera.

El hongo germina y crece en igual forma en agua destilada y en agar, en ausencia de nutrientes, lo que demuestra su autonomía.

En todos los cultivos se presentó una estratificación vertical de la colonia, de tal forma que en el estrato inferior se desarrollan preferentemente hifas vegetativas, las cuales se levantan entrecruzándose, hasta formar una estructura específica. En el estrato intermedio se encuentran gran cantidad de anteridios, y en el estrato superior del cultivo se encuentran oogonios, zoosporangios y vesículas (Fig. 4).

Los oogonios son abundantes y presentan proyecciones (Fig. 5), son globosos, de 13 a 19 micrones de diámetro, con promedios que van desde 11.2 a 13.5 micrones (Tabla 3) excluidas las proyecciones; se encontraron oosporas tanto pleróticas como apleróticas. Se observaron anteridios, generalmente agrupados sobre hifas diferentes a las que llevan el oogonio.

Caracterización del hongo: hifas incoloras, dispuestas en forma racemosa.

Las estructuras de la reproducción sexual son oogonios equinulados generalmente pleróticos, fertilizados por anteridios en forma de clava, de pared reticulada que se reproducen en grupos sobre una misma hifa; las estructuras de la reproducción asexual estan representadas por zoosporas que se producen en zoosporangios intercalares morfológicamente poco diferenciados, las cuales se liberan desde vesículas bien diferenciadas.

La morfología se ajusta a la del género *Pythium* descrito por *Pringshein* en 1858, el cual pertenece a la clase Oomicetes, familia Pythiaceae.

Las mediciones de los oogonios se muestran en la siguiente tabla

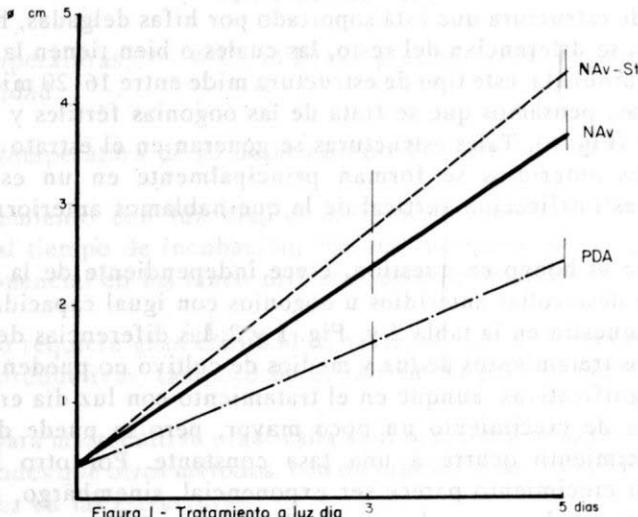


Figura 1 - Tratamiento a luz día

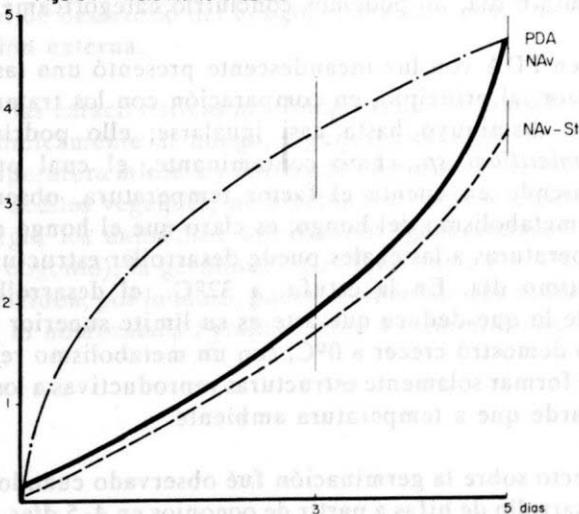


Figura 2 - Tratamiento de luz incandescente

Las mediciones registradas en la Tabla 4 no se ajustan a ninguna de las especies revisadas hasta el momento, por lo cual es probable que se trate de una nueva especie; para llegar a la confirmación del tal hecho, se hace necesario un análisis

de algunos compuestos químicos que son liberados al medio por este hongo y de su sensibilidad a ciertas drogas. También se hace necesario averiguar su función ecológica en el medio donde fue encontrado.

En un cultivo de un mes se observaron complejos de 2-5 elementos subglobosos de más o menos de 40 micrones de diámetro, los cuales no volvieron a presentarse en las réplicas.

Las hifas en el medio DPA alcanzaron 4-5 micrones en el mejor estado de desarrollo; en microcultivo fueron más delgadas.

Existe un tipo de estructura que está soportado por hifas delgadas, hialinas, que relativamente no se diferencian del resto, las cuales o bien tienen la pared lisa, o bien la tienen equinulada, este tipo de estructura mide entre 16-20 micrones; dadas sus características, pensamos que se trata de las oogonias fértiles y los oosporas, respectivamente (Fig. 6). Tales estructuras se generan en el estrato más elevado, mientras que los anteridios se forman principalmente en un estrato medio, confirmando la estratificación vertical de la que hablamos anteriormente.

Es evidente que el hongo en cuestión, crece independiente de la presencia de tiamina y puede desarrollar anteridios u oogonios con igual capacidad en PDA o NAV, como se muestra en la tabla 2 y Fig. 1 y 2; las diferencias de crecimiento entre los distintos tratamientos de luz y medios de cultivo no pueden considerarse notablemente significativas, aunque en el tratamiento con luz día en NAV-st, se observa una tasa de crecimiento un poco mayor, pero se puede decir que, en general, su crecimiento ocurre a una tasa constante. Por otro lado, en luz incandescente su crecimiento parece ser exponencial, sin embargo, como sólo se midió hasta el quinto día, no podemos concluirlo categóricamente.

El tratamiento en PDA con luz incandescente presentó una tasa de crecimiento marcada y superior, al principio, en comparación con los tratamientos en NAV, y posteriormente disminuyó hasta casi igualarse; ello podría atribuirse a la presencia de *Penicillium sp.* como contaminante, el cual pudo actuar como antagonista. Teniendo en cuenta el factor temperatura, observamos su efecto definitivo en el metabolismo del hongo; es claro que el hongo crece mejor entre 15 - 20°C., temperaturas a las cuales puede desarrollar estructuras sexuales entre el quinto y séptimo día. En la estufa, a 32°C., el desarrollo fué apenas de supervivencia, de lo que deduce que éste es su límite superior de desarrollo. En nevera, el hongo demostró crecer a 0°C, con un metabolismo relativamente bajo, hasta el grado de formar solamente estructuras reproductivas a los 40 días, es decir, 6-7 veces más tarde que a temperatura ambiente.

Un definido efecto sobre la germinación fué observado cuando se cultivó a 0°C. obteniéndose desarrollo de hifas a partir de oogonios en 4-5 días, las cuales pueden proseguir su desarrollo para formar un micelio normal. El método de microcultivo empleado, demostró ser muy eficiente, de tal forma que se obtuvo un desarrollo equivalente al clásico, con mayor facilidad de manipulación al manejar láminas con el hongo fijado "in situ", sin que ocurrieran alteraciones.

El hongo tiende a formar una serie de hifas dentríticas, las cuales se orientan de tal modo que convergen sobre otras, para finalmente formar una estructura esférica; esta estructura probablemente tiene la función de ofrecer un soporte para que el resto del micelio pueda elevarse sobre el sustrato. Puesto que pudimos obtener microcultivos con facilidad, ello demuestra que puede formar aprehensorios sobre el vidrio.

En determinadas ocasiones el hongo puede formar una serie de vesículas en zonas muy específicas, que se producen a partir de esporangios intercalares.

CONCLUSIONES

- 1) A bajas temperaturas 0° - 4°C., el hongo presenta germinación; lo que denota mayor agresividad.
- 2) La óptima temperatura de su desarrollo oscila entre 15 y 20°C.
- 3) En el tratamiento con luz día, el crecimiento del hongo es directamente proporcional al tiempo de incubación; con luz incandescente el crecimiento del hongo es exponencial en los cinco primeros días de incubación.
- 4) El hongo no requiere gran cantidad ni variedad de nutrientes para desarrollar estructuras reproductivas, tampoco necesita tiamina para su crecimiento.
- 5) La técnica para microcultivo practicada aquí se recomienda, ya que proporciona mejores resultados que otros métodos, con un práctico manejo que evita posteriores malformaciones en las estructuras.
- 6) En la fase inicial de desarrollo del hongo, se muestra como autónomo, pues no requiere de nutrición externa.
- 7) En el estudio de las características morfológicas que se consideran importantes para ubicar taxonómicamente al hongo, algunas coinciden con *P. mammillatum* Meurs, como la temperatura mínima y óptima de crecimiento, la insensibilidad ante los esteroides de los aceites vegetales, no afectándose la producción de oogonios y oosporas; sin embargo, los anteridios son diclinos (generalmente ubicados sobre hifas diferentes al oogonio), la germinación es fácil entre 0 y 4°C, y las medidas de Oogonios no coinciden; por lo tanto, podemos concluir que se trata de una nueva especie. Por ahora lo nombramos *Phytium* cerca a *mammillatum* Meurs.

BIBLIOGRAFIA

- BAKER, K.F. & COOK R.J., 1982. *Biological Control of Plant Pathogens*. The American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota, USA.
- BRUCKART, W.I. & LORBEER J.W., 1982. *Pythium Species Pathogenic to Onion Seedlings Grown on Organic Soils in New York*. Phytopathology. 72:469-475.
- DOMSCH, K., GAMS, W. & ANDERSON, H.T. 1980. *Compendium of Soil Fungy*. Academic Press. London.
- SINGLETON, L.L. & ZIVO. 1980. *Effects of Pythium arrhenomanes and Root Tip Amputation on Wheat Seedling Development*. Phytopathology 71: 316-319.
- SPARROW, F.W. 1959. *Aquatic Hyphomycetes*. Michigan State University Press.
- STANGHELLINI, M.E. & BURR T.J. 1973. Germination in vivo of *Pythium aphanidermatum* Oospores and Sporangia. Phytopathology 63: 1943-1946.
- WALKER J.C. 1973. Patología Vegetal. Ed. Omega S.A. por Barcelona.