

INSTITUTO TECNOLOGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE BIOLOGÍA

INFORME DE

TRABAJO FINAL DE GRADUACION

**NUEVAS ESTRATEGIAS PARA LA CONSERVACION *in vitro* DE LA
DIVERSIDAD GENETICA DEL HONGO *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al***

Mariela Eugenia Leandro Muñoz

Cartago, 2006

NUEVAS ESTRATEGIAS PARA LA CONSERVACION *in vitro* DE LA DIVERSIDAD GENETICA DEL HONGO *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al*

Mariela Eugenia Leandro Muñoz*

RESUMEN

El cacao, *Theobroma cacao* L. es una especie perteneciente a la familia Malvaceae, cuya demanda está creciendo a nivel mundial, debido a sus propiedades curativas y cosméticas. Una de las limitantes en la producción de este cultivo en América Tropical es la moniliasis, la cual es causada por el hongo *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al* (Basidiomicete, Marasmiaceae). Actualmente esta especie se encuentra en una fase invasiva muy intensa y la mayoría de los genotipos comerciales de cacao son aparentemente susceptibles. Por esto, CATIE con el apoyo de WCF (The World Cocoa Foundation) y USDA (The United States Department of Agriculture) está desarrollando desde hace algunos años un programa de mejoramiento genético que enfatiza en la selección de genotipos superiores de alta producción y resistencia a las principales enfermedades. Dentro de sus objetivos, el programa pretende estudiar aspectos básicos de la biología del hongo con el fin de establecer mejores controles cuarentenarios dentro y entre países, diseñar estrategias de combate más efectivas y duraderas, y afinar la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia y de organismos antagonistas para biocontrol.

Para esto, es fundamental la adecuada preservación de los aislamientos del hongo bajo condiciones de laboratorio, por períodos largos, con el fin de mantener el material disponible tanto para los estudios actuales como futuros. Actualmente, para la conservación de *M. roreri* se han implementado más comúnmente los subcultivos periódicos en cuñas de agar, crecimiento bajo aceite mineral, el almacenamiento a bajas temperaturas, en agua destilada, la crioconservación y la liofilización. Sin embargo, la mayoría de estas técnicas son difíciles de implementar y altamente costosas, por lo que en este trabajo se pretende evaluar e implementar en CATIE

* INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2006.

métodos eficientes para asegurar la preservación a largo plazo de la variabilidad genética contenida en su colección internacional de cepas de *M. royeri*. Entre los métodos utilizados están la conservación de las cepas en papel filtro y la conservación mediante el ADN de las cepas. El primero arrojó resultados satisfactorios y logró mantener la viabilidad de las cepas por dos meses, aunque se conoce que puede mantenerla por años. Para la conservación mediante el ADN de las cepas se probaron dos *kits* de extracción y fue el Genomic DNA from Plant NucleoSpin[®] de Macherey-Nagel el que mostró los mejores resultados, siendo factible obtener ADN de buena calidad a partir de todas las cepas de *M. royeri* que fueron evaluadas.

**NUEVAS ESTRATEGIAS PARA LA CONSERVACION *in vitro* DE LA
DIVERSIDAD GENETICA DEL HONGO *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al***

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.**

Miembros del Tribunal

**MSc. Vladimir Villalba Velásquez,
Profesor Asesor-ITCR**

**Ph.D. Wilbert Phillips Mora,
Asesor- Empresa**

**Ing. Olga Rivas Solano,
Lectora**

DEDICATORIA

A mis padres por su amor, esfuerzo, dedicación y apoyo brindado durante toda mi vida.

A mis hermanos por sus consejos y enseñanzas.

A la familia Poveda de la Peña por su apoyo incondicional durante mis estudios.

Mariela

AGRADECIMIENTOS

La autora desea dejar constancia de su agradecimiento a las siguientes personas, por su colaboración en el presente trabajo:

Al grupo de Mejoramiento Genético de Cacao del CATIE por el apoyo financiero y logístico para la ejecución del proyecto, en especial a Ph.D. Wilbert Phillips Mora, por sus valiosas enseñanzas y dedicación; a MSc. Adriana Arciniegas Leal por su apoyo incondicional y a José Castillo Fernández por sus consejos y ayuda.

A los funcionarios de los Laboratorios de Fitopatología y Biotecnología del CATIE, especialmente a Manrique González Vargas, Edgar Esquivel Murillo, Allan Meneses Martínez y Juan Luis Ortiz Vargas por su colaboración en las labores de laboratorio.

A Ph.D. Vera Sánchez Garita por su confianza y respaldo.

A mi tutor, MSc. Vladimir Villalba Velásquez por su entrega y su efectiva forma de enseñar.

A la profesora Ing. Olga Rivas Solano por la lectura de este trabajo y por sus correcciones.

INDICE GENERAL

RESUMEN	i
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS	v
INDICE GENERAL.....	vi
INDICE DE CUADROS	vii
INDICE DE FIGURAS	viii
INDICE DE ANEXOS	ix
1. INTRODUCCION.....	1
2. REVISION DE LITERATURA.....	3
OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS	14
3. MATERIALES Y METODOS.....	15
4. RESULTADOS	24
5. DISCUSION.....	35
6. CONCLUSIONES	41
7. RECOMENDACIONES.....	42
8. LITERATURA CITADA	43
ANEXOS	46

INDICE DE CUADROS

Núm.	Título	Pág.
1	Descripción de las cepas analizadas en las extracciones de ADN.	19
2	Concentración de las muestras obtenidas con el Genomic DNA Purification Kit #K0519 de Fermentas.	34
3	Concentración de las muestras obtenidas con el Genomic DNA from Plant NucleoSpin [®] de Macherey-Nagel.	35

INDICE DE FIGURAS

Núm.	Nombre	Pág.
1	Lavado de las cepas para obtener la solución de esporas.	16
2	Agitación de la solución de esporas.	16
3	Inoculación y distribución de las esporas en el medio YEA.	17
4	Preparación de la solución de esporas.	19
5	Desprendimiento de esporas con ayuda de un pincel.	20
6	Agitación de la solución de esporas.	20
7	Inoculación de la solución de esporas en el medio líquido mineral.	21
8	Incubación de las cepas en medio líquido mineral.	21
9	Germinación de esporas de <i>M. roreri</i> .	24
10	Colonias monospóricas de <i>M. roreri</i> observadas al estereoscopio.	25
11	Cepa monospórica de <i>M. roreri</i> de 22 días.	26
12	Desarrollo de <i>M. roreri</i> a los 4 días.	26
13	Distribución de los círculos de papel sobre el plato Petri.	27
14	Crecimiento y esporulación de <i>M. roreri</i> sobre los discos de papel a los 8 días.	27
15	Desarrollo de cepas con aparente vegetatividad de <i>M. roreri</i> creciendo en medio líquido mineral.	29
16	Desarrollo de cepas con mayor esporulación de <i>M. roreri</i> creciendo en medio líquido mineral.	30
17	Desarrollo de la cepa con esporulación media de <i>M. roreri</i> creciendo en medio líquido mineral.	30
18	Aspecto del micelio de las 5 cepas de <i>M. roreri</i> después de la filtración.	31
19	Aspecto del micelio de las 5 cepas de <i>M. roreri</i> después del secado.	31
20	Aspecto del micelio de las 5 cepas de <i>M. roreri</i> en platos Petri con medio V8.	32
21	Gel de agarosa al 1% para la cuantificación del ADN.	33

INDICE DE ANEXOS

Núm.	Título	Pág.
1	Colección de cepas de <i>M. royeri</i> del CATIE por país de origen.	46
2	Cepas monospóricas de <i>M. royeri</i> de la colección del CATIE por país de origen.	47
3	Medios de cultivo utilizados.	48
4	MassRuler™ DNA ladder, mix, ready-to-use #SM0403 de Fermentas.	50

1. INTRODUCCION

El cacao, *Theobroma cacao* L. es una especie perteneciente a la familia Malvaceae; es un árbol con una altura promedio de 5-6 metros y posee un denso follaje. Sus frutos son llamados mazorcas y se cosechan dos veces al año. Su vida productiva es de 25 a 30 años y sus tres grandes grupos son el Criollo, el Forastero y el Trinitario (Ram, 1989).

Las enfermedades del cacao causan pérdidas estimadas en 30-40% a nivel mundial. La moniliasis, causada por el hongo *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al*, (Basidiomicete, Marasmiaceae) es la más importante en la región. Su origen se localiza probablemente en Colombia, y de ahí se ha diseminado a 10 países en América Tropical: Ecuador (antes considerado su centro de origen), Venezuela, Panamá, Costa Rica, Nicaragua, Perú, Honduras, Guatemala, Belice y México (Phillips-Mora *et al*, 2006). Esta enfermedad ha desestabilizado la producción cacaotera de América Tropical, provocando en varias áreas la destrucción total de la cosecha y el abandono de muchas plantaciones. Se considera que *M. roreri* se encuentra en una fase invasiva muy intensa, siendo la mayoría de los genotipos comerciales de cacao aparentemente susceptibles. Surge entonces la preocupación de que este patógeno se disemine a otros continentes, en particular a África Occidental en donde tendría efectos devastadores pues allí se da la mayor producción mundial de cacao (Phillips-Mora, 2003a).

CATIE con el apoyo de WCF (The World Cocoa Foundation) y USDA (The United States Department of Agriculture) está desarrollando desde hace 15 años un programa de mejoramiento genético que enfatiza en la selección de genotipos superiores de alta producción y resistencia a las principales enfermedades, en particular a moniliasis. Esta sería la mejor estrategia de combate debido a que las alternativas actualmente propuestas para el control de esta enfermedad no han tenido éxito en su aplicación a nivel de campo por no ser accesibles para los

pequeños productores que enfrentan este problema. Dentro de los objetivos de este programa se encuentra estudiar más a fondo aspectos básicos de la biología del hongo, como son el nivel, la fuente y la distribución geográfica de su variabilidad genética, ya que son clave para el establecimiento de mejores controles cuarentenarios dentro y entre países, para el diseño de estrategias de combate más efectivas y duraderas, y para afinar la búsqueda de nuevas fuentes de resistencia y de organismos antagonistas para biocontrol (Phillips-Mora, 2003b).

Para dichos estudios es fundamental la adecuada preservación de los aislamientos del hongo bajo condiciones de laboratorio, por períodos largos de tiempo, con el fin de mantener el material disponible para los estudios actuales como futuros. Actualmente, las colecciones se mantienen en cultivos puros en platos Petri con medio de cultivo, metodología que es más demandante en tiempo y tiene el riesgo de que se puedan perder las cepas o que estas se desactiven debido a las continuas transferencias. En este momento cada mes se deben refrescar los aislamientos, lo que implica una mayor inversión económica, debido al requerimiento de platos y medio de cultivo, además, se requiere de más espacio para almacenar los platos. La metodología de conservación a largo plazo que se busca establecer en este proyecto pretende ser una opción viable y útil que permita conservar las cepas por un mayor lapso de tiempo, en un menor espacio, y sin la necesidad de platos o medio de cultivo.

Otra forma complementaria de conservar el material genético para futuros estudios, es a través de su ADN, para lo cual se requiere la estandarización de un protocolo de extracción de ADN que optimice el tiempo y los recursos, y que al mismo tiempo brinde un producto de alta calidad que pueda ser utilizado en futuras investigaciones (de Vicente & Andersson, 2006).

2. REVISION DE LITERATURA

2.1 El cultivo del cacao

Desde la época precolombina, el cacao fue considerado de gran valor y estima, al punto que sus semillas se utilizaban como moneda. Los mayas fueron los que domesticaron este cultivo y preparaban sus semillas para consumirlo como un producto final muy agradable para el paladar. Esta información se transmitió hasta los aztecas, y fue el Rey Monctezuma quien enseñó a los españoles cómo preparar un alimento a partir del cacao (Enríquez, 2004).

Theobroma cacao L. es una especie perteneciente a la familia Malvaceae, es un árbol perenne pequeño, de aproximadamente 5-6m que presenta un denso follaje, y cuyas flores y frutos se desarrollan directamente de las ramas o el tronco. Sus frutos son llamados mazorcas y se empiezan a producir cuando la planta tiene aproximadamente 2 años de edad, y tardan entre 5-7 meses para madurar. Además, la especie cuenta con dos estaciones de cosecha anuales. El árbol de cacao posee una vida productiva de entre 25 a 30 años. En 1882, Morris denominó Criollo y Forastero a las dos grandes clases de cacao, las cuales fueron divididas en diversas variedades. Las variedades criollas fueron las que se cultivaron en las civilizaciones antiguas, las forasteras se cultivaron posteriormente (Ram, 1989).

Su centro de origen se localiza en el noreste de Suramérica, específicamente de los trópicos húmedos de la zona alta amazónica. Su desplazamiento hasta México se dio por la costa Pacífica, donde se localizan la mayoría de genotipos Criollos. El cultivo llegó a la zona Atlántica, islas del Caribe y otras partes del mundo por los españoles, quienes los sembraron de forma intensiva, con el fin de satisfacer la creciente demanda de sus productos derivados (Enríquez, 2004). Actualmente se siembra en la mayoría de los países tropicales, entre los 20° latitud norte, y los 20° latitud sur, a una altitud de 300 hasta los 1300 msnm, con un promedio de temperatura y precipitación anual de 25°C y 1150 a 2500 mm³, respectivamente. Generalmente, el

cacao se siembra bajo sombra y a una densidad de 500 a 2000 árboles por hectárea (Ram, 1989).

2.2 Nombre del hongo y la enfermedad que produce

Este hongo fue denominado como *Monilia roreri* por Ciferri & Parodi en 1933, pero en 1978 fue renombrado por Evans *et al* como *Moniliophthora roreri* debido a que presenta caracteres morfológicos que lo hacen afín a los basidiomicetes. Existen muchos nombres comunes para la enfermedad que produce, tales como: moniliasis o monilia, enfermedad de Quevedo, mancha ceniza, podredumbre acuosa, prinque y mal palúdico (Tazelaar, 1991).

Su centro de origen y diversidad genética se localiza en Colombia (Phillips-Mora, 2003b). Se cree que de ahí se dispersó hasta Ecuador, Perú y algunas zonas de Venezuela. De ahí hasta Panamá, Centroamérica y por último a México. En 1978, la enfermedad se reportó en Costa Rica por Enríquez y Suárez, específicamente en la zona Atlántica, y para 1980 ya estaba distribuida por todo el territorio nacional (Phillips-Mora, 2003b).

2.3 Desarrollo de la enfermedad

La infección ocurre en las primeras etapas de crecimiento de los frutos, y conforme van creciendo, las mazorcas se vuelven más resistentes (Enríquez, 2004). Una vez que el fruto es infectado por el hongo puede tardar de 40 a 60 días para manifestar los daños externos. Cuando el fruto es joven y las condiciones del tiempo son lluviosas o calurosas, este período se acorta. Esto se debe a que en las etapas iniciales de la infección, el hongo invade el interior del fruto y posteriormente aparecen los síntomas externos, los cuales pueden aparecer hasta que la mazorca esté completamente desarrollada.

Al abrir frutos sin síntomas visibles, éstos se encuentran podridos en mayor o menor grado y pesan más que los frutos sanos (Enríquez, 2004). Si las mazorcas tienen menos de tres meses, el primer síntoma que se presenta es el desarrollo de una

protuberancia, giba o hinchazón, pero el primer síntoma de la infección es la aparición de pequeños puntos amarillos en mazorcas verdes y anaranjados en mazorcas rojas. Después se puede presentar una mancha irregular de color marrón en la parte central que puede mostrar un halo amarillento. Este síntoma se conoce como mancha chocolate (Porrás & Enríquez, 1998). En cuanto a los signos del patógeno, estos aparecen bajo condiciones húmedas y calurosas. Sobre la mancha chocolate se empieza a desarrollar una felpa dura y blanca, la cual constituye el micelio del hongo, y sobre este micelio crecen una gran cantidad de esporóforos, formando una masa crema o marrón claro. Las mazorcas que permanecen adheridas a los árboles pueden esporular hasta por 9 meses y se van momificando (Enríquez, 2004).

2.4 Importancia económica de la enfermedad

El consumo de semillas de cacao para el año 2002 fue de 3 millones de toneladas, y gracias a la demanda de chocolates a nivel mundial, este consumo ha ido incrementando en estos últimos 4 años. Las enfermedades del cultivo figuran como el principal responsable del decline en la producción, ya que provocan la pérdidas de 30-40% de las áreas cultivadas (Fortiz & Robles, 2002).

Unas décadas atrás, en Costa Rica, el cacao fue un cultivo tradicional. En 1962 se exportaron 12.000 TM, pero en la década de los 80 la producción fluctuó entre 5.000 y 9.500 TM. En 1973 existían 20.213 ha sembradas de cacao, concentradas principalmente en la provincia de Limón, sin embargo, por causa de la moniliasis, en 1981 el 21% de los cacaoteros del país abandonaron el cultivo y 34.4% no pensaban seguir con esta actividad. En 1981, la producción disminuyó un 74% (Enríquez *et al*, 1981). Desde entonces, la moniliasis fue acabando con todas las plantaciones de cacao del país, afectando así a los pequeños y medianos productores y a los campesinos cuyo sostén económico básico era este cultivo.

Actualmente, la demanda del cultivo está creciendo a nivel mundial, debido a las propiedades curativas y cosméticas que se le atribuye a esta especie, y es por esto

que el control de la enfermedad causada por el hongo *M. roreri* es fundamental para la reactivación de la producción cacaotera en Costa Rica y en varios países latinoamericanos.

2.5 Características del parásito

M. roreri es un patógeno altamente especializado que ataca solamente a los géneros *Theobroma* (22 especies) y *Herrania* (17 especies) (Phillips-Mora, 2003b). Sus hifas son hialinas de pared delgada y septadas, aunque después se tornan café; su micelio vegetativo posee tabiques con doliporos. Las esporas se forman básicamente en cadenas simples o ramificadas cada una con 4-10 conidios envueltos en la pared celular original (Thévenin & Trocmé, 1996, Ram, 1989). Esta última característica hace a *M. roreri* afín a los basidiomicetes (Tazelaar, 1991). Las esporas son fácilmente removibles, de pared gruesa, color amarillo pálido cuando están inmaduras o café oscuro en su madurez, y pueden ser de forma globosa o elíptica (Herrera, 1988). Las características de estas estructuras varían un poco dependiendo de la cepa en cuestión.

M. roreri se considera un hongo hemibiótrofo, dado que su ciclo pasa por dos fases: una fase biotrófica, que va desde la germinación de las esporas hasta la invasión intercelular de la epidermis de las mazorcas; y una fase necrótica cuando el crecimiento de la mazorca disminuye y el hongo invade las células provocando la aparición de necrosis interna y externa (Thévenin & Trocmé, 1996).

2.6 Métodos de conservación de hongos en general

La gran diversidad genética del Reino Fungi ha creado la necesidad de establecer estrategias de conservación *ex situ* eficientes y a largo plazo (Fernández *et al*, 2005). Dichas estrategias no se deben restringir a coleccionar y conservar el germoplasma, si no que deben incluir un manejo eficiente del material para documentar, caracterizar y evaluar la variabilidad genética disponible en las colecciones (de Vicente & Andersson, 2006).

Para el establecimiento de una estrategia de conservación de hongos, se debe considerar que: todos los cultivos se mantengan vivos y puros, que cada cepa permanezca estable morfológica y genéticamente y en el caso de los patógenos, que conserven también su patogenicidad. Además, se deben tomar en cuenta los objetivos de la conservación, las metodologías propuestas y los recursos económicos disponibles (de Vicente & Andersson, 2006). Por último, es importante considerar que cada cepa debe conservarse al menos por dos métodos de preservación, uno de los cuales debe ser a largo plazo (Fernández *et al*, 2005).

Las técnicas más usuales de conservación son:

2.6.1 Cultivo en cuñas de agar: consiste en simular las condiciones naturales para lograr un desarrollo completo del hongo. Esto se logra mediante la preparación de medios de cultivo estériles a base de agar, con la adición de nutrientes como los jugos vegetales y extractos naturales, así como también compuestos sintéticos de composición conocida. El medio se puede depositar ya sea en platos Petri, en botellas o en tubos de ensayo. Esta metodología, aunque es simple, demanda mucho tiempo para las transferencias de los hongos, además de que requiere mucho material cada cierto período, lo que eleva los costos. Por otro lado, los riesgos de contaminación y pérdida del material son altos, y las constantes transferencias pueden ocasionar la pérdida de viabilidad de las cepas (Kirsop & Doyle, 1991).

2.6.2 Técnica de capa de aceite mineral: consiste en sembrar trozos de cultivos de hongos ya desarrollados, en tubos que contienen agar dispuesto en forma de taco y posteriormente se cubren con una capa de aceite mineral estéril (Panizo *et al*, 2005).

2.6.3 Conservación a bajas temperaturas: radica en cultivar los hongos en cuñas de agar para almacenarlos luego a temperaturas entre 4°C y 7°C. Presenta por lo tanto los mismos inconvenientes que el cultivo simple en cuñas de agar, además de

requerir el equipo de enfriamiento y ser dependiente de la electricidad (Kirsop & Doyle, 1991).

2.6.4 Conservación en agua destilada: es también conocida como método de Castellani y fue propuesta hace más de 4 décadas. En este medio el crecimiento de los hongos es muy restringido, pero se mantiene la viabilidad y la pureza. Se considera un método barato, simple y eficiente; además evita el ataque de los ácaros (Fernández *et al*, 2005).

2.6.5 Crioconservación: consiste en sumergir micelio esporulado crecido sobre algún tipo de sustrato en nitrógeno líquido a -196°C . Entre los diferentes sustratos utilizados están los granos de trigo. Esta técnica asegura la estabilidad genética, brinda altos porcentajes de sobrevivencia y es aceptada universalmente. Además, ofrece excelentes resultados para los basidiomicetes. Entre sus inconvenientes está el alto precio del nitrógeno líquido y el hecho de que el suministro de este compuesto no está garantizado (Nagai *et al*, 2005; Singh *et al*, 2004).

2.6.6 Liofilización: se considera, teóricamente, uno de los métodos más efectivos para la conservación de cultivos con sus características originales, aunque no es favorable para especies que producen grandes esporas o que no producen esporas (Fernández *et al*, 2005). De acuerdo con León & Gallardo (2001), este método consiste en la eliminación de agua mediante sublimación a partir de suspensiones precongeladas o congeladas, por congelación evaporativa bajo vacío. Su principal inconveniente es que requiere de un equipamiento especial y es un proceso más complejo, sin embargo, para el almacenamiento de los muestras no es necesario ningún aparato, aunque las temperaturas bajas (4°C a -30°C) son preferibles a la temperatura ambiente (León & Gallardo, 2001). Por otro lado, esta metodología ofrece la ventaja de que la conservación es por muchos años, evita la contaminación y conserva las propiedades morfológicas y bioquímicas originales. Además, el

material se conserva en bulbos de vidrio resistente, pequeños, fáciles de almacenar, transportar y distribuir (Fernández *et al*, 2005).

2.6.7 Cultivo en tierra o arena: consiste en el crecimiento de los hongos en cualquiera de estos sustratos estériles. Para esto, el sustrato es tamizado y luego se deposita en recipientes sellados. Posteriormente, dichos recipientes se autoclavan y se incuban con el fin de comprobar su esterilidad. Este proceso se realiza unas 3 veces como mínimo. Una vez que el sustrato está completamente estéril, se procede a inocularlo con suspensiones de esporas de aproximadamente 10^7 esporas/ml, y se incuban alrededor de 7 días o hasta que el hongo tenga un crecimiento considerable en el sustrato. Por último, los cultivos se guardan en refrigeración (León & Gallardo, 2001). Recientemente se descubrió que la conservación en tierra y en aceite mineral puede afectar la viabilidad, la capacidad de esporulación y el dimorfismo de algunas especies (Fernández *et al*, 2005).

2.6.8 Preservación en sílica gel anhidra: para esta metodología se preparan las botellas de sílica gel estériles y enfriadas. Los cristales de sílica gel se inoculan con una solución de esporas del hongo en leche descremada estéril fría y se dejan 20 minutos en un baño de hielo. Trascurrido este período se almacena las botellas a 25°C por una o dos semanas hasta que los cristales se separen por agitación. Se procede a probar la viabilidad del hongo, y si es positiva, las botellas se almacenan en un recipiente hermético a 4°C. Este método requiere estrictamente de las botellas de sílica gel, que implican un costo elevado y su gel indicador requiere ser reemplazado dos veces al año (Kirsop & Doyle, 1991).

Para la selección y posterior implementación de alguno de los métodos descritos, es importante tomar en cuenta el tipo de hongo que se quiere preservar, la cantidad de cepas que se quieren mantener, con qué finalidad serán utilizadas y cuáles son los recursos, tanto humanos como de materiales y equipos, con que se dispone (Panizo *et al*, 2005).

2.7 Factores nutricionales que afectan el crecimiento y esporulación de *M. roreri* en medios artificiales

Para la conservación de las cepas, es importante conocer varios aspectos fisiológicos que intervienen en el desarrollo del hongo, esto con el fin de propiciarle las condiciones óptimas y rápidamente disponibles para lograr un buen crecimiento (Herrera, 1988). Por otra parte, se sabe que las condiciones que favorecen el crecimiento vegetativo de los hongos son diferentes a las que favorecen la fase reproductiva de los mismos (Herrera *et al*, 1989).

Entre los elementos no metálicos que constituyen casi la totalidad del micelio de los hongos se encuentran el C, H, O, N, P y S. El H se obtiene a partir del agua, y el O₂ mediante la respiración. El K y Mg son elementos metálicos, que en conjunto con los no metálicos son considerados macroelementos, ya que son requeridos por el hongo en cantidades relativamente grandes. Dichos elementos son utilizados para la formación de las paredes celulares y tienen participación en eventos metabólicos, por ende deben ser componentes esenciales de un medio artificial para el cultivo de cualquier hongo (Herrera, 1988).

El nitrógeno puede ser utilizado por los hongos en forma de nitratos, nitritos, amonio y aminoácidos u otras moléculas orgánicas como las bases púricas o pirimídicas, sus precursores o productos de su metabolismo (Herrera *et al*, 1989). Este elemento se requiere para la síntesis de aminoácidos y proteínas, además forma parte de los ácidos nucleicos y vitaminas; por esto es indispensable para el buen desarrollo de cualquier hongo (Herrera, 1988). Es incorrecto determinar una fuente de nitrógeno patrón para todos los hongos, ya que muchos requieren fuentes específicas de este elemento, o se favorecen con una determinada fuente (Herrera *et al*, 1989). Phillips-Mora & Galindo (1985) determinaron que el aminoácido asparagina es la fuente de N más favorable para *M. roreri*, debido a que permite un adecuado desarrollo vegetativo y la mayor producción de conidios. La mayoría de los aminoácidos se absorben como tales y pueden metabolizarse para formar otros aminoácidos por

transaminación. También pueden funcionar como fuentes de carbono al acoplarse los ácidos orgánicos derivados del ciclo de Krebs (Herrera *et al*, 1989).

El carbono es el elemento que los hongos necesitan en mayor cantidad; se conoce que *M. roreri* y los hongos en general, presentan una mejor respuesta a la fuente que a la dosis de carbono (Herrera, 1988). Phillips-Mora & Galindo (1985) y Herrera (1988) coinciden en que la maltosa, al ser el disacárido más aprovechable por los hongos, se considera la fuente que permite el mayor crecimiento micelial, área esporulada y tendencia a formar una mayor cantidad de conidios (Herrera, 1988). La relación C:N puede influir en el patrón de esporulación del hongo (Herrera *et al*, 1989).

Para *M. roreri*, Phillips-Mora (2003b) recomienda el medio de cultivo V8 modificado (20% v/v de jugo V8, Campbell Soup Company, Campbell, NJ, USA, 0.1% m/v de asparagina, 2% m/v de maltosa y 1.8% de agar), el cual permite un buen desarrollo vegetativo de las cepas, además de su esporulación. El V8 es un medio de cultivo compuesto a base de jugo de vegetales que favorece la producción de esporas. Su combinación con la asparagina y la maltosa eleva dicha producción.

2.8 Factores físicos que afectan el crecimiento y esporulación de *M. roreri* en medios artificiales

2.8.1 Temperatura: su incremento provoca el aumento de la actividad enzimática y química, por lo que se acelera la síntesis de vitaminas, aminoácidos y otros metabolitos; sin embargo, una alta temperatura puede inactivar dichas actividades y detener el crecimiento. Para *M. roreri*, el rango ideal para el crecimiento y esporulación de las colonias que crecen en V8 es de 24 a 27°C (Chacin, 1975; Herrera, 1988).

2.8.2 Luz: La tasa de crecimiento y la formación de estructuras reproductivas son afectadas por la intensidad, duración y calidad de la luz. Este efecto estimulador se observa claramente en la formación de anillos alternos concéntricos o zonación que muestra *M. roreri* al exponerse a períodos alternos de luz y oscuridad, donde la luz favorece la formación de estructuras reproductivas (anillos pardo claros de crecimiento rastrero) y la oscuridad favorece al desarrollo vegetativo (anillos color crema, menos esporulados y de crecimiento más aéreo). A pesar de esto Phillips-Mora (2003b) observó la formación de anillos concéntricos en cultivos mantenidos en total oscuridad.

Aunque este hongo es poco exigente en cuanto a la longitud de cada período, Herrera (1988) determinó que el régimen lumínico de 12 horas de luz y oscuridad permite alcanzar el punto máximo de esporulación de las colonias en V8.

2.8.3 pH: Con relación al pH inicial del medio de cultivo se ha comprobado que la adición de una solución tampón no afecta significativamente el crecimiento y esporulación (rápida y abundante) del hongo (Herrera, 1988).

2.9 Factores que influyen en la germinación de las esporas de *M. roreri*

De los nueve medios de cultivo para la germinación de las esporas probados por Ram (1989), el medio YEA (anexo 3) fue el que presentó el mayor porcentaje de germinación, con un 81,3%, de esporas germinadas. Además recomienda realizar la dilución de las esporas en agua destilada estéril con 0.01% de Tween 80, con el fin de que estas estén bien dispersas. En cuanto al ajuste del pH del medio, Ram (1989) obtuvo un porcentaje de germinación bastante elevado sin necesidad de modificar su pH del medio.

Según Campuzano (1981), el mayor porcentaje de germinación se da a 22.5°C y a 96% de humedad. Esto es avalado por Galindo (1985), quien indica que para su germinación

y desarrollo del tubo germinativo, las esporas requieren de una película de agua. Además Phillips-Mora (2003b) recomienda un régimen lumínico de 12/12 períodos alternos de luz/oscuridad, con el fin de estimular el desarrollo de las hifas y estructuras vegetativas del hongo.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar e implementar en CATIE métodos eficientes para asegurar la preservación a largo plazo de la variabilidad genética contenida en su colección internacional de cepas de *M. roreri*.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Optimizar una técnica eficiente para la germinación de esporas de *M. roreri*, con el fin de realizar cultivos monospóricos de las cepas de este hongo pertenecientes a la colección del CATIE.
2. Evaluar e implementar la metodología de conservación de cepas por medio de papeles de filtro.
3. Evaluar dos formas de obtención de micelio para ser usado en las extracciones de ADN.
4. Comparar la eficiencia de dos *kits* de extracción de ADN usando cepas con muy diversos niveles de esporulación, además de cepas conservadas *in vitro* por mucho tiempo en CATIE y otras introducidas recientemente a la colección, con el fin de realizar extracciones de todas las cepas de la colección usando el *kit* más eficiente.
5. Establecer una colección de respaldo de los aislamientos a través de su ADN.

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Localización del experimento

El experimento se llevó a cabo en los Laboratorios de Fitopatología y Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), ubicado en Turrialba, Costa Rica entre los meses Junio y Diciembre del 2006.

3.2 CULTIVOS MONOSPORICOS

Se realizaron cultivos monospóricos para algunas de las cepas de la colección que se pueden observar en el anexo 2. El resto de las cepas se encuentran en proceso.

3.3 GERMINACION DE ESPORAS DE *M. RORERI*

3.3.1 Preparación de los platos Petri: En una cámara de transferencia Edge Gard® Hood, se dispensaron 5ml del medio de cultivo YEA (anexo 3) en platos Petri estériles de 8,5cm de diámetro con ayuda de un pipeteador Powerpette Plus de Jencons y una pipeta estéril. Los platos se dejaron a temperatura ambiente por 2 a 3 días debidamente sellados y empacados en bolsas plásticas.

3.3.2 Inoculación de los platos: Con un día de anterioridad, se prepararon todos los instrumentos necesarios para la inoculación de los platos: beakers con magnetos, puntas de pipeta, espátulas de vidrio, autoclavándolos por 30 minutos a 121°C y 15 lbs de presión. Los beakers se cubrieron con trozos de papel aluminio en la parte superior con el fin de evitar su contaminación.

Como fuente de inóculo se usaron platos Petri en donde las cepas del hongo habían crecido por 15 días en medio V8 (anexo 3). En la cámara de transferencia, se procedió a abrir, uno por uno dichos cultivos, para realizarles un lavado superficial con 2,5 ml de agua destilada estéril con 0.01% de Tween 80 (Spectrum Chemical Mfg. Corp.) como dispersante. Este lavado se realizó dos veces con el fin de

desprender una mayor cantidad de esporas. La Figura 2 muestra el lavado de los cultivos.



Figura 1. Lavado de las cepas para obtener la solución de esporas.

El líquido se movió suavemente en forma circular para liberar las esporas (alrededor de 10^4 esporas/ml). Después de cada lavado, la solución se trasvasó en un beaker con un movimiento rápido, con el fin de evitar la contaminación, el cual se mantuvo cubierto con papel aluminio mientras se agitó por 5 minutos en un agitador Fisher Thermix® dentro de la cámara de transferencia.



Figura 2. Agitación de la solución de esporas.

Transcurrido este tiempo se procedió a determinar la concentración de la solución con ayuda de un hemacitómetro Boeco de $1/10\mu\text{m}$ de profundidad, ajustándola a un valor de 10^4 , realizando diluciones en agua destilada estéril. Seguidamente, se agitó

la solución por 5 minutos y se procedió a inocular 0,5 ml de la misma por cada plato Petri previamente preparados. El inóculo se distribuyó por toda la superficie con ayuda de una espátula de vidrio como se puede observar a continuación en la Figura 3:



Figura 3. Inoculación y distribución de las esporas en el medio YEA.

Luego, se sellaron los platos con papel de parafina y se incubaron a 26°C, 12/12 períodos alternos de luz/oscuridad hasta que se corroboró la germinación de las esporas mediante la frecuente observación de los platos en el microscopio de luz.

3.3.3 Obtención de los cultivos monospóricos: Una vez que las esporas germinaron y formaron una pequeña colonia apenas perceptible, se procedió a cortar con un bisturí en la cámara de transferencia, trozos de medio que contenían sólo una colonia. Estos trozos se sembraron en un plato Petri con medio V8, realizando dos repeticiones por cepa. Los platos se incubaron a 26°C, 12/12 períodos alternos de luz/oscuridad, hasta que el micelio cubrió todo el plato y había esporulado.

3.4 EVALUACION DEL METODO DE CONSERVACION EN DISCOS DE PAPEL¹

Todas las cepas de la colección del CATIE (anexo 1) se sometieron a este método.

¹ Hífo, J.C. 2006. Conservación de las cepas en papel. CORPOICA, Colombia, Comunicación Personal.

Inicialmente se hicieron círculos de papel filtro con ayuda de dos sacabocados de diferentes diámetros (0,5 cm y 1 cm), se autoclavaron y se secaron. Se tomaron círculos de ambos diámetros y se colocaron dentro de platos Petri alrededor de cultivos con radios de aproximadamente 0,5 cm y pertenecientes a cepas monospóricas y no monospóricas. Los platos fueron entonces incubados, a períodos alternos de 12/12 horas luz/oscuridad.

Cuando las cepas esporularon sobre el papel, se extrajeron los círculos de papel con pinzas, evitando desprender el medio con ellos, y se colocaron en sobres de papel estériles debidamente rotulados, con el fin que los discos fueran perdiendo la humedad. Para completar la fase de secado, los sobres fueron colocados entonces en un horno de reflujo de aire a 25°C por 2 a 3 días. Transcurrido este período, los sobres de papel se colocaron dentro de sobres de papel pergamino, que se guardaron en una hielera pequeña de estereofón y se almacenaron a -10°C.

Para comprobar la viabilidad de las cepas, se extrajeron muestras de los papeles y se colocaron dentro de platos Petri con medio agar agua observando si se daba la germinación de las esporas mediante frecuentes revisiones de los platos por medio del microscopio de luz.

3.5 EXTRACCION DE ADN

Se compararon dos formas de obtención de micelio y dos *kits* de extracción de ADN (Genomic DNA Purification Kit #K0519 de Fermentas y Genomic DNA from Plant NucleoSpin[®] de Macherey-Nagel). Se usaron cinco cepas diferentes, entre las cuales unas presentaban aparente vegetatividad y otras estaban muy esporuladas, además, unas eran aislamientos conservados *in vitro* por mucho tiempo en CATIE y otros habían sido introducidos recientemente en su colección. Las cepas empleadas se describen en el siguiente cuadro:

Cuadro 1. Descripción de las cepas analizadas en las extracciones de ADN.

Nombre	Procedencia	Estado	Fecha de colecta
Co 86	Arauca, Colombia	Esporulada	Set, 2006
Co 93	Santander, Colombia	Vegetativa	Set, 2006
E 30	Los Ríos, Ecuador	Vegetativa	Dic, 1999
E 43	Imbabura, Ecuador	Esporulada	Set, 1999
P 5	Huanuco, Perú	Esporulación media	1997

3.5.1 Formas de obtención del micelio:

3.5.2 Método 1: Producción de micelio en medio líquido mineral.

Se siguió la metodología empleada por Phillips-Mora (2003b). Con un día de anterioridad se prepararon todos los instrumentos necesarios (beakers con magnetos, puntas de pipeta, espátulas de vidrio, entre otros), autoclavándolos por 30 minutos a 121°C y 15 lbs de presión. Los beakers se cubrieron con trozos de papel aluminio en la parte superior con el fin de evitar su contaminación.

A partir de cultivos de las cepas indicadas de 11 a 15 días, se preparó una solución de esporas agregando a cada plato en dos ocasiones 5 ml de agua destilada estéril con 0.01% de Tween 80, como se muestra a continuación:



Figura 4. Preparación de la solución de esporas.

Luego de agitar suavemente el plato con movimientos circulares en cada caso el líquido se colocó en un beaker con un movimiento rápido, con el fin de evitar la contaminación de la solución. En algunos casos, para remover las esporas, se tuvo que utilizar un pincel de la siguiente manera:



Figura 5. Desprendimiento de esporas con ayuda de un pincel.

El beaker tapado con aluminio se agitó por 5 minutos fuera de la cámara como se muestra a continuación:



Figura 6. Agitación de la solución de esporas.

Luego se depositó la solución de cada cepa en un erlenmeyer de 250 ml que contenía 100 ml de medio líquido mineral (anexo 3) de la siguiente forma:



Figura 7. Inoculación de la solución de esporas en el medio líquido mineral.

Los cultivos se incubaron a 25°C, 12/12 períodos alternos de luz/oscuridad y en constante agitación (150 rpm) por 8 días. La Figura 8 muestra lo anterior.



Figura 8. Incubación de las cepas en medio líquido mineral.

Transcurrido este período, el micelio se recogió mediante una filtración con bomba al vacío, se lavó con agua destilada estéril y se secó en un horno a 35°C por 48 horas. El micelio seco se maceró en un mortero con nitrógeno líquido y se almacenó en tubos de microcentrífuga de 1,5 ml a -20°C.

3.5.3 Método 2: Producción de micelio en medio V8 sólido.

Se sembraron platos de V8 sólido con cada una de las cepas anteriormente mencionadas. A los 10 a 15 días de crecimiento, se extrajo el micelio con ayuda de un bisturí estéril. Inmediatamente antes de la extracción del ADN, dicho micelio se maceró en un mortero con nitrógeno líquido.

A continuación se describen los dos métodos usados para la extracción del ADN. En ambos casos se siguió rigurosamente el protocolo sugerido por el fabricante de los *kits* de extracción.

3.5.4 Evaluación del KIT 1: Genomic DNA Purification Kit #K0519 de Fermentas

Se pesaron de 25 a 30 mg de micelio pulverizado en un tubo de microcentrífuga y se resuspendieron en 200 µl de buffer TE. A cada tubo se le agregó 400 µl de la solución de lisis y se incubó a 65°C por 5 minutos. Inmediatamente se le agregó 600 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente por inversión (de 3 a 5 veces) y se centrifugó a 10.000 rpm por 2 minutos. Se preparó la solución de precipitación, mezclando 720 µl de agua desionizada estéril con 80 µl de la solución concentrada 10X. Se tomó la fase acuosa que contenía el ADN y se pasó a un tubo nuevo. Se le agregó 800 µl de la solución de precipitación anteriormente preparada, se agitó vigorosamente por inversión por 1-2 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 10.000 rpm por 2 minutos. Transcurrido este tiempo, se removió el sobrenadante completamente (sin secar) y se disolvió el ADN en 100 µl de NaCl 1.2 M, agitando con vortex. El ADN debió estar bien disuelto. Seguidamente se agregaron 300 µl de etanol frío, se dejó precipitar el ADN por 10 minutos a -20°C y se centrifugó a 10.000 rpm por 3 a 4 minutos. Se extrajo el etanol y se lavó el ADN con etanol frío al 70%, y por último se disolvió en 100 µl de agua destilada estéril seguido de una breve exposición de los tubos al vortex.

3.5.5 Evaluación del KIT 2: Genomic DNA from Plant NucleoSpin® de Macherey-Nagel

Se pesaron de 50 a 200 mg de micelio pulverizado en un tubo de microcentrífuga. Se agregaron 10 µl de la solución de RNasa A (10 mg/ml) al buffer C1 y se resuspendió la muestra en 200 µl de este buffer. Se homogenizó la muestra sometiéndola al vortex regularmente. Después se agregaron 100 µl más de buffer C1 y se continuó homogenizando. Posteriormente se agregaron 100 µl de cloroformo, se mezcló 10 segundos en el vortex y se centrifugó por 5 minutos a 10.000 rpm. Se recogió la fase acuosa superior con una pipeta y se depositó en un tubo de centrífuga nuevo; se incubó a 60°C por 30 minutos. Transcurrido este período, se centrifugó la muestra por 5 minutos a 10.000 rpm y se transfirieron 300 µl del sobrenadante a un tubo nuevo. Seguidamente se agregaron 300 µl de buffer C4 y 200 µl de etanol, y se mezcló con vortex por 30 segundos. El etanol y el buffer C4 se debieron mezclar antes. Se colocó la columna NucleoSpin® Plant en un tubo de centrífuga de 2 ml, se depositó la muestra en la columna con ayuda de una pipeta, y se centrifugó por 1 minuto a 10.000 rpm. El líquido que salió de la columna fue descartado. Se continuó agregando 400 µl de buffer CW a la columna, se centrifugó y se descartó el líquido de misma forma que en el paso anterior.

Se agregaron 700 µl de buffer C5 a la columna, se centrifugó y se descartó el líquido de misma forma que en el paso anterior. Se agregaron 200 µl de buffer C5 a la columna, se centrifugó 2 minutos y se descartó el líquido de misma forma que en el paso anterior, hasta que la membrana de sílica gel estuvo seca. Por último, se colocó la columna en un tubo nuevo de 1,5 ml. Se agregaron 100 µl de buffer CE (precalentado a 70°C) a la membrana y se incubó a temperatura ambiente por 5 minutos. Por último, se centrifugó por 1 minuto a 10.000 rpm para liberar el ADN de la membrana.

3.5.6 Determinación de la concentración de ADN

Para ambos métodos de extracción, la concentración del ADN se midió mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se usó una escalera MassRuler™ DNA

Ladder, Mix, ready-to-use #SM0403 de Fermentas (anexo 4) para determinar por comparación la concentración de ADN.

4. RESULTADOS

4.1 GERMINACION DE ESPORAS DE *M. RORERI*

La germinación se evidenció cuando se observó la formación de colonias separadas, apenas perceptibles a simple vista, en el plato Petri, como se muestra en la Figura 9.

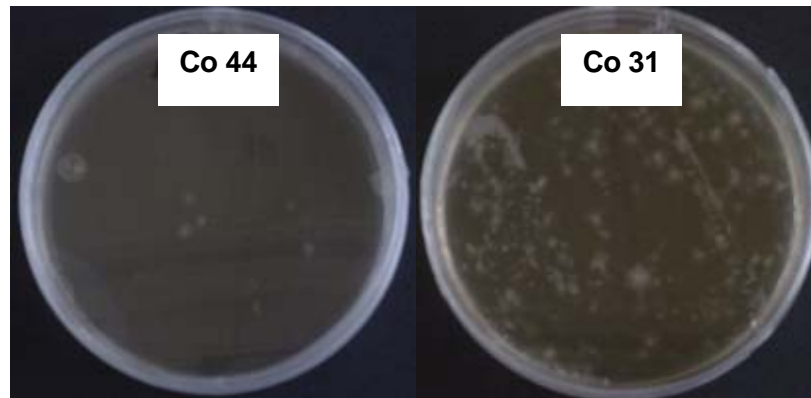


Figura 9. Germinación de esporas de *M. roreri*.

Este proceso de germinación se produjo en todas las cepas y se observó entre 15 y 22 días después de que se inocularon las soluciones de esporas, dependiendo de la cepa en cuestión; hubo cepas como la C 27 y la C 28 que a los 10 días desarrollaron colonias monospóricas visibles, mientras que cepas como la Co 45 y la Co 47 tardaron 25 días en desarrollarlas. Sin embargo, en un análisis a nivel microscópico a los 6 días después de la inoculación, en promedio, el 85% de las esporas inoculadas de todas las cepas germinaron.

Como se puede observar en la Figura 9, algunas cepas como la Co 44 desarrollaron un menor número de colonias en comparación con cepas como la Co 31, donde hay una mayor formación de colonias.

Mediante observaciones de los platos Petri al estereoscopio se determinó que cada una de las colonias provenían del desarrollo de una sola espora, lo cual se puede corroborar en la Figura 10.



Figura 10. Colonias monospóricas de *M. roreri* observadas al estereoscopio.

4.2 CULTIVOS MONOSPORICOS

Al sembrar las colonias monospóricas en medio V8, cada una de estas tuvo la capacidad de desarrollarse normalmente y colonizar todo el plato en aproximadamente 15 días, obteniéndose así cultivos monospóricos de manera rápida y fácil. Seguidamente se muestra una cepa monospórica.

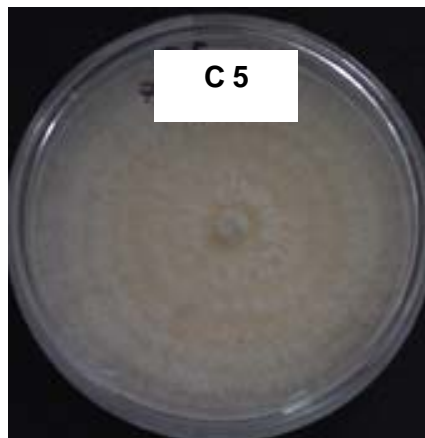


Figura 11. Cepa monospórica de *M. roreri* de 22 días.

4.3 EVALUACION DEL METODO DE CONSERVACION EN DISCOS DE PAPEL

Al desarrollar esta metodología se determinó que las cepas de *M. roreri* tardan de 3 a 5 días para alcanzar un radio de 0,5 cm, siendo este parámetro necesario para poder colocar los círculos de papel en el plato Petri. La Figura 12 muestra el desarrollo de una cepa de *M. roreri* a los 4 días, con un radio aproximado de 0,5 cm.

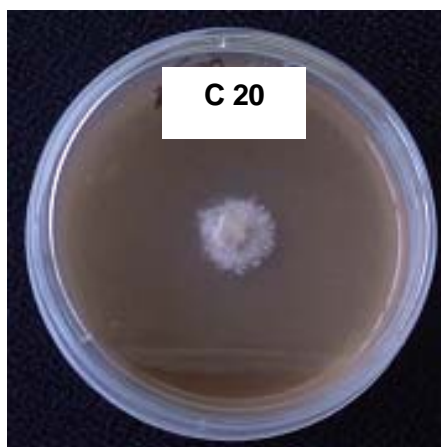


Figura 12. Desarrollo de *M. roreri* a los 4 días.

Los círculos de papel fueron colocados en el plato Petri con la siguiente distribución:



Figura 13. Distribución de los círculos de papel sobre el plato Petri.

El hongo se desarrolló sin problema sobre los papeles, cubriéndolos totalmente en aproximadamente 15 días, tras lo cual esporuló sobre ellos. En el caso de las cepas con aparente vegetatividad, la cobertura de los papeles se dio en un período similar a las demás (11 a 18 días), pero su esporulación no fue tan evidente. El crecimiento y la esporulación sobre los discos de papel se muestran en la Figura 14.

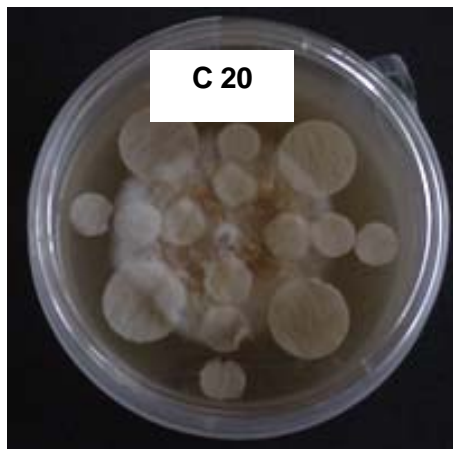


Figura 14. Crecimiento y esporulación de *M. roreri* sobre los discos de papel a los 8 días.

Al analizar todas las cepas, se determinó que tardan en promedio 15 días para colonizar y esporular sobre todos los discos, aunque hay cepas como la C 1 y la C 2

que pueden tardar hasta un mes. Este fenómeno se observó principalmente en las cepas que se encuentran en crecimiento aparentemente vegetativo con baja esporulación.

Se pudo observar que a mayor tiempo de exposición de los papeles en el plato Petri, más difícil es su remoción y hay un alto riesgo de que el medio se adhiera a ellos, por lo que se recomienda removerlos inmediatamente después de que el hongo haya esporulado sobre ellos.

Para el secado de los papeles, se determinó que los sobres de papel manila ofrecen una excelente protección de las cepas en el horno, además de que ayudan a absorber la humedad de los discos, sin que estos se adhieran a los sobres. Además, que la temperatura de secado del horno puede oscilar entre los 25°C y los 33°C, siempre y cuando no sobrepase esta temperatura.

Para el almacenamiento de las cepas, se encontró que los sobres de pergamino protegen de la humedad a los discos que están almacenados en sobres de manila; la hielera de estereofón cumple con la misma función, pero también protege las esporas de las bajas temperaturas del congelador. El rango óptimo de almacenamiento es de -10°C a -20°C.

En una evaluación preliminar realizada con cepas conservadas por 2 meses usando la metodología descrita, se encontró que las cepas aún sobrevivían al almacenamiento a -10°C. Dichas evaluaciones seguirán siendo realizadas en forma rutinaria para corroborar la efectividad del método para la preservación de las cepas a largo plazo.

4.4 OBTENCION DE MICELIO PARA EXTRACCIONES DE ADN

4.4.1 Método 1: Producción de micelio en medio líquido mineral

La obtención de la suspensión de esporas para el crecimiento en medio líquido fue más difícil para las cepas aparentemente vegetativas, las cuales se caracterizaron por producir cantidades mucho menores de esporas y de color más claro.

Con el desarrollo de este método se obtuvo un crecimiento de micelio característico, dependiendo de las cepas que se inocularon. A los 8 días desde la inoculación se observó que las cepas aparentemente vegetativas (Co 93 y E 30) formaban pelotas de color blanco de aproximadamente 2 cm de diámetro, como se muestra en la Figura 15.



Figura 15. Desarrollo de cepas de *M. roreri* con aparente vegetatividad creciendo en medio líquido mineral.

Las cepas con mayor esporulación (Co 86 y E 43) formaron un micelio grumoso con una coloración café oscura, como se muestra en la Figura 16:

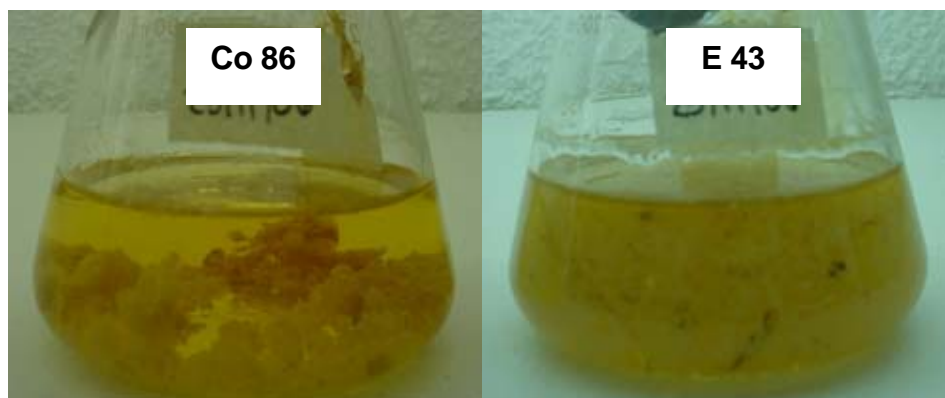


Figura 16. Desarrollo de cepas de *M. roreri* con esporulación creciendo en medio líquido mineral.

La formación de micelio de la cepa P 5, con esporulación media, fue un punto medio entre las cepas de apariencia vegetativa y las cepas esporuladas, ya que esta cepa formó pelotas de aproximadamente 0,5 cm de diámetro pero con una coloración café (Figura 17).

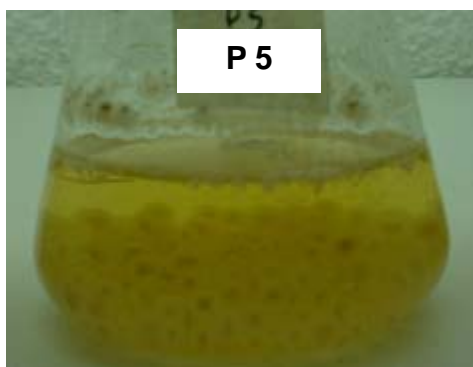


Figura 17. Desarrollo de la cepa de *M. roreri* con esporulación media creciendo en medio líquido mineral.

El micelio húmedo de estas cepas, una vez filtrado y lavado se observó de la siguiente manera:

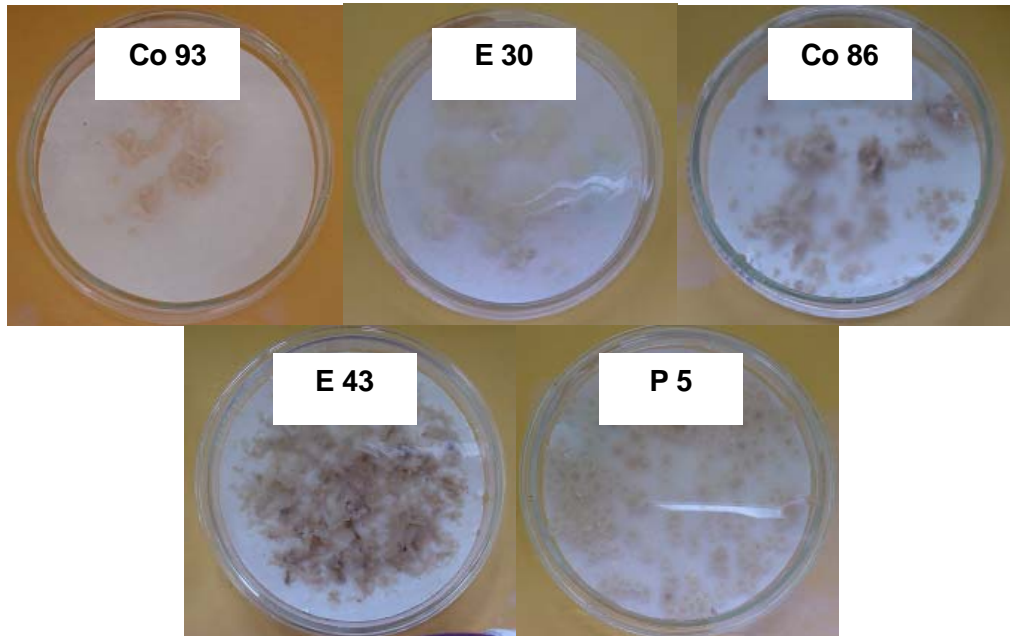


Figura 18. Aspecto del micelio de las 5 cepas de *M. roreri* después de la filtración.

Después de concluir el tiempo de secado, el micelio de las cepas lució de la siguiente manera:

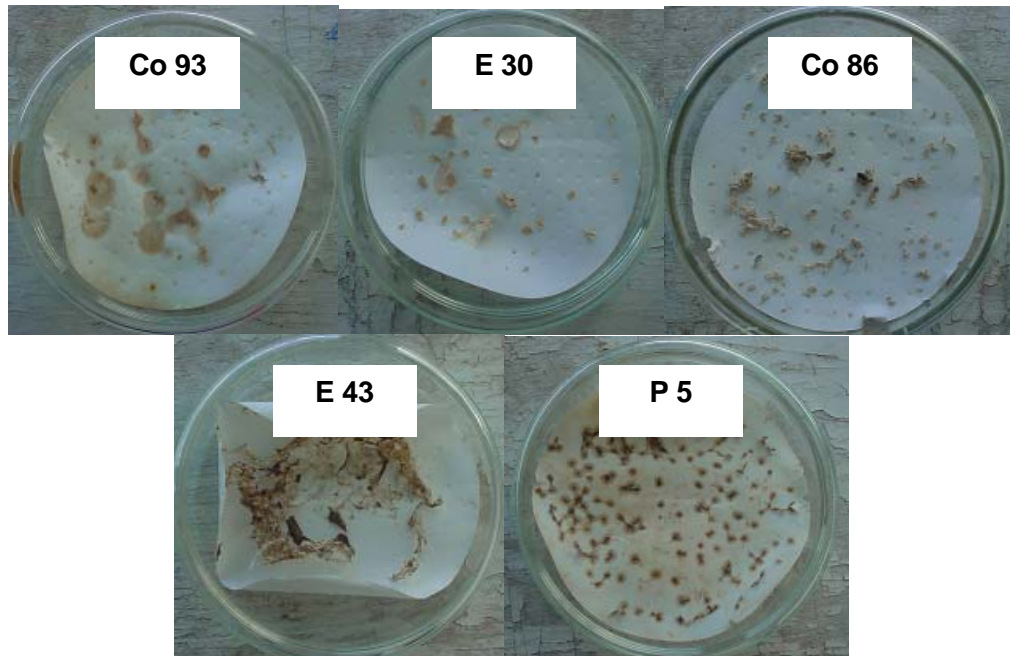


Figura 19. Aspecto del micelio de las 5 cepas de *M. roreri* después del secado.

En este método el crecimiento del micelio ocurre en 8 días, pero el filtrado (1 día) y secado del mismo (2 días) lleva más trabajo y más tiempo.

4.4.2 Método 2: Producción de micelio en medio V8 sólido

Para obtener el micelio con este método se requieren 15 días, que es el tiempo aproximado que tardan las cepas en colonizar totalmente el plato Petri. Para extraer el micelio solo es necesario raspar suavemente el plato con un bisturí estéril. La toma de la muestra de micelio se simplificó cuando la cepa era aparentemente vegetativa. Las cepas en los platos Petri con V8 lucen de la siguiente manera:

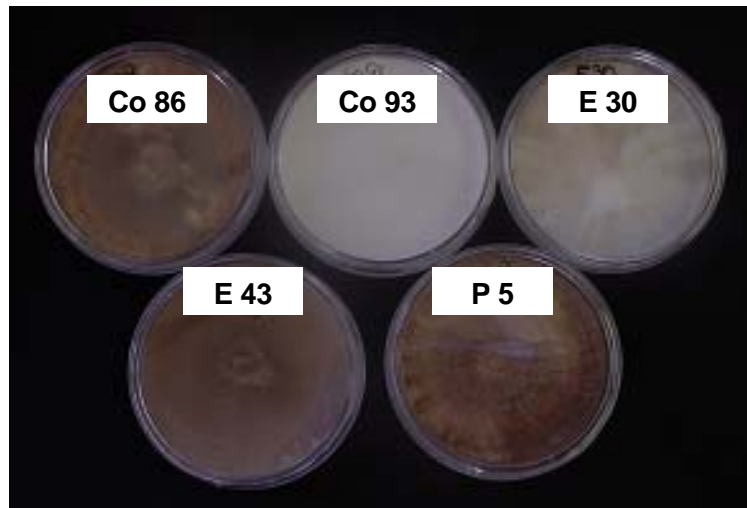


Figura 20. Aspecto del micelio de las 5 cepas de *M. royeri* en platos Petri con medio V8.

4.5 EXTRACCION DE ADN

Para las cinco cepas de *M. royeri* fue factible obtener ADN en una concentración similar. Sin embargo, se obtuvo un mejor resultado con el *kit* de Macherey-Nagel que con el *kit* de Fermentas, para el cual además se detectó un error experimental que hizo que dos muestras migraran en forma incorrecta por lo que no pudieron estimarse sus concentraciones. Con el *kit* de Fermentas se observó un ADN contaminado con ARN,

lo cual se evidencia con el *Smir* observado en la Figura 21. Aunque los dos *kits* fueron muy sencillos y rápidos de usar (25 minutos por muestra), el *kit* de Macherey-Nagel fue más laborioso, pero incluye la limpieza del ADN con una RNasa incluida en el mismo.

Fue posible obtener ADN de cepas con diferente apariencia, desde muy esporuladas hasta en estado de aparente vegetatividad. También se obtuvo ADN de los aislamientos nuevos y de los más viejos.

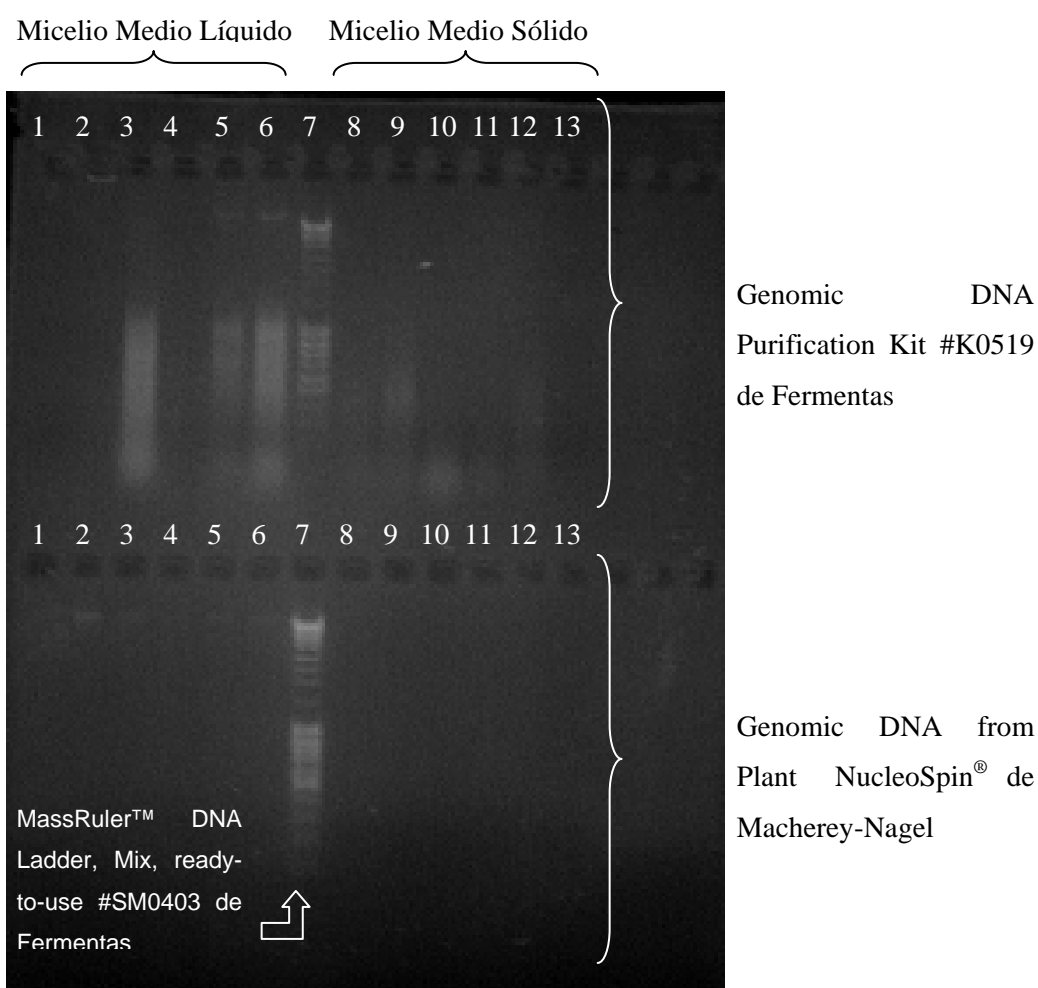


Figura 21. Gel de agarosa al 1% para la cuantificación del ADN.

4.5.1 Cuantificación del ADN

El ADN extraído fue cuantificado en gel de agarosa al 1% encontrándose que las cantidades variaron entre 70 y 90 ng/ μ l para las extracciones hechas con micelio obtenido a partir de medio líquido mineral. Como se mencionó, la única excepción se dio con dos muestras en el *kit* de Fermentas que migraron en forma inversa. No se obtuvo ADN con ninguno de los dos *kits* cuando se usó el micelio tomado del cultivo en medio V8 sólido. Lo anterior queda evidenciado en los siguientes cuadros:

Cuadro 2. Concentración de las muestras obtenidas con el Genomic DNA Purification Kit #K0519 de Fermentas.

Carril	Forma de extracción	Cepa	Concentración de ADN (ng/ μ l)
1	Control con agua		-
2	Micelio Medio líquido	Co 86	80
3	Micelio Medio líquido	Co 93	-
4	Micelio Medio líquido	E 30	-
5	Micelio Medio líquido	E 43	70
6	Micelio Medio líquido	P 5	70
7	Escalera		-
8	Micelio medio sólido	Co 86	0
9	Micelio medio sólido	Co 93	0
10	Micelio medio sólido	E 30	0
11	Micelio medio sólido	E 43	0
12	Micelio medio sólido	P 5	0
13	Control con agua		-

Cuadro 3. Concentración de las muestras obtenidas con el Genomic DNA from Plant NucleoSpin® de Macherey-Nagel.

Carril	Forma de extracción	Cepa	Concentración de ADN (ng/μl)
1	Control con agua		-
2	Micelio Medio líquido	Co 86	90
3	Micelio Medio líquido	Co 93	80
4	Micelio Medio líquido	E 30	80
5	Micelio Medio líquido	E 43	80
6	Micelio Medio líquido	P 5	80
7	Escalera		-
8	Micelio medio sólido	Co 86	0
9	Micelio medio sólido	Co 93	0
10	Micelio medio sólido	E 30	0
11	Micelio medio sólido	E 43	0
12	Micelio medio sólido	P 5	0
13	Control con agua		-

De los resultados obtenidos se concluye que la obtención de micelio mediante el cultivo en medio líquido mineral y el *kit* de Macherey-Nagel fueron los procedimientos más efectivos para la extracción de ADN de *M. roreri*, totalizando 80-90 ng/μl para todas las cepas evaluadas.

5. DISCUSION

El presente estudio se realizó con la finalidad de estandarizar dos protocolos de conservación a largo plazo de la diversidad genética de *M. roreri* que el CATIE ha colectado en América Tropical. Se busca asegurar la disponibilidad de este valioso material para futuras investigaciones. El mantenimiento físico de las cepas se logró a través de la conservación en papel filtro, mientras que la preservación mediante el ADN

de las cepas fue posible al contar con un método eficaz y sencillo de extracción de ADN de buena calidad.

5.1 GERMINACION DE ESPORAS DE *M. RORERI* Y OBTENCION DE CULTIVOS MONOSPORICOS

El objetivo de desarrollar un protocolo para la germinación de esporas fue poder obtener cultivos monospóricos. La concentración de esporas que se inoculó en el medio YEA (anexo 3) fue menor a la empleada por Ram (1989), con el objeto de inducir una mayor separación entre las colonias y facilitar su aislamiento. Se inocularon 0,5 ml de dicha solución, con el fin de proveerle a las esporas una película de agua para que germinaran (Galindo, 1985; Campuzano, 1981). Con respecto a la temperatura óptima, los platos Petri se incubaron a 26°C, ya que Chacin (1975) señala que el óptimo crecimiento de *M. roreri* se da entre 25° y 27°C. Por último, se seleccionó un régimen lumínico de 12/12 períodos alternos de luz/oscuridad, ya que, según Phillips-Mora (2003b) éste estimula el desarrollo de las hifas y estructuras vegetativas del hongo. El pH no se tomó en cuenta debido a que Ram (1989) obtuvo un 81,3% de germinación en medio de cultivo YEA (anexo 3) sin necesidad de modificar el pH del medio.

En este trabajo se determinó mediante observaciones al microscopio que a los 6 días el 85% de las esporas inoculadas de cada cepa había germinado. Sin embargo, con el objeto de facilitar el procedimiento, se consideró que las esporas habían germinado hasta que se dio la formación de colonias monospóricas distinguibles a simple vista, lo que ocurrió entre 15 y 22 días después de la inoculación. Dichas cepas fueron analizadas en un estereoscopio con el fin de determinar si provenían de una sola espora. Se comprobó que es más simple la remoción de las colonias sin ayuda de un microscopio, y que el desarrollo de las mismas en medio V8 se acelera, obteniéndose platos totalmente colonizados en 15 días.

Como se mencionó anteriormente, las colonias monospóricas aisladas fueron capaces de desarrollarse normalmente en un período muy corto en medio V8, gracias a que se

aislaron con un grado mayor de desarrollo, ya que en pruebas preliminares, cuando se aislaron con ayuda del microscopio sólo esporas con tubo germinativo, no se logró que estas se desarrollaran en medio V8, ni siquiera en un lapso de 2 meses.

Existen diferencias entre especies de hongos con relación a los requerimientos nutricionales para la germinación de sus esporas, las cuales se pueden deber a diferencias en su pared y en la composición y cantidad de sustancias de reserva (Flores, 1989). *M. roleri* no es una excepción y por esto fue necesaria una estandarización de los factores físicos y nutricionales que favorecen la germinación de sus esporas con el fin obtener colonias monospóricas en un periodo más corto y en forma sencilla.

De acuerdo con los resultados de Ram (1989) el medio YEA (anexo 3) ofrece las sustancias orgánicas externas necesarias, lo que le permitió a este autor obtener un 81,3% de germinación para todas las cepas probadas. En este trabajo se utilizó el mismo medio de cultivo, obteniendo un promedio de germinación similar (85% del total de esporas inoculadas de cada cepa).

Las diferencias que se presentaron entre cepas, en cuanto a la cantidad y al inicio de formación de colonias monospóricas se puede deber a que, se conoce que existen cepas que según su procedencia tienen porcentajes de germinación mayores o menores (Flores, 1989; Phillips-Mora, 2003b).

5.2 EVALUACION DEL METODO DE CONSERVACION EN DISCOS DE PAPEL Los papeles se colocaron en el plato Petri hasta que la cepa alcanzó un radio de 0,5 cm debido a que, en ese lapso de 3 a 5 días, se tuvo la posibilidad de descartar los platos

contaminados, al igual que aquellos platos en donde las cepas no crecieron, ya sea por inactividad de las mismas o por errores experimentales al sembrarlas².

Se colocaron círculos grandes y pequeños con el fin de determinar posteriormente cuál de los dos tamaños simplificaba más el proceso de aislamiento de las cepas a partir del papel. Se concluyó que los círculos pequeños son mejores ya que se pueden iniciar nuevas colonias colocando en el medio de cultivo discos enteros sin necesidad de partirlos.

El hecho de que algunas cepas tarden más en cubrir y esporular sobre los papeles se debe a que como ya se mencionó, cada cepa crece en períodos diferentes de acuerdo a su procedencia (Flores, 1989; Phillips-Mora, 2003b), al igual que todas las cepas no producen la misma cantidad de esporas. Es importante indicar que es necesario que en los papeles haya esporas, ya que estas estructuras son las que se preservan a largo plazo y no el micelio³. Esto se debe a que las esporas de *M. roreri* soportan la acción del congelamiento y secamiento sin perder su capacidad patogénica (Fallas, 1983).

Como se mencionó, la remoción de los papeles debe realizarse inmediatamente después de que la cepa haya esporulado sobre estos, ya que si se deja más tiempo, el medio de cultivo se deshidrata y se adhiere a los papeles, lo que favorece la contaminación por otros organismos.

Los sobres de papel manila ofrecen una excelente protección para el secado en el horno, debido a que no permiten el escape de esporas. Además, por ser de papel, ayudan a absorber la humedad de los discos, sin que estos se adhieran a los sobres. Por su parte, los sobres de pergamino protegen de la humedad a los discos de papel; esto es importante ya que si las esporas se hidratan pierden la viabilidad. La hielera de

² Híó, J.C. 2006. Conservación de las cepas en papel. CORPOICA, Colombia, Comunicación Personal.

estereofón, además de proteger de la humedad, protege las esporas de las bajas temperaturas que puede alcanzar el congelador³.

Aunque solo se ha realizado una evaluación de sobrevivencia a los 2 meses, dichas evaluaciones seguirán siendo realizadas en forma rutinaria aunque en otros lugares ya se está llevando a cabo esta técnica con éxito³.

5.3 OBTENCION DE MICELIO PARA EXTRACCIONES DE ADN

5.3.1 Método 1: Producción de micelio en medio líquido mineral

La remoción de esporas para hacer las diluciones que se inocularon se dificultó en las cepas aparentemente vegetativas, debido a que al tener tan poca esporulación fue necesario raspar el medio con ayuda de un pincel para extraer todas las esporas formadas. Por el contrario, para las cepas esporuladas no fue necesario el empleo del pincel, ya que sólo con la adición del agua y movimientos circulares las esporas se desprendieron en forma masiva.

El hecho de que las cepas aparentemente vegetativas produjeran un micelio en forma de pelotas de color blanco de aproximadamente 2 cm de diámetro, se puede deber a que las esporas, al estar en menor concentración, se encontraban más dispersas por todo el medio pudiendo formar su micelio más libremente. Al igual que las anteriores, la cepa con esporulación media formó pelotas de aproximadamente 0,5 cm de diámetro pero con una coloración café, debido a que aunque tenía una mayor concentración de esporas, estas no estaban tan agrupadas. Contrario a estas, las cepas bastante esporuladas formaron un micelio grumoso con una coloración café oscura, ya que en este caso las esporas eran muy abundantes y por ende estaban muy unidas y casi formando una masa. La coloración del micelio se debió a las características de la cepa.

³ Hío, J.C. 2006. Conservación de las cepas en papel. CORPOICA, Colombia, Comunicación Personal.

5.3.2 Método 2: Producción de micelio en medio V8 sólido

Aunque en este método se invirtió menos tiempo y la toma de micelio fue más sencilla, hubo una diferencia entre cepas con aparente vegetatividad y cepas esporuladas, ya que con las primeras fue más fácil desprender el micelio, debido a que éste fue más compacto.

5.4 EXTRACCION DE ADN

En esta parte, en cuanto al proceso en sí, tanto el *kit* de Fermentas como el *kit* de Macherey-Nagel tuvieron un desempeño muy similar; ambos fueron sencillos y rápidos de usar (25 minutos por muestra) y extrajeron ADN tanto de cepas aparentemente vegetativas como esporuladas así como de cepas conservadas *in vitro* por períodos cortos o largos. Sin embargo se concluyó que *kit* de Macherey-Nagel tuvo un mejor desempeño al producir ADN libre de ARN.

5.4.1 Cuantificación del ADN

Con respecto a la cuantificación el *kit* de Macherey-Nagel brindó mejores resultados al arrojar concentraciones de ADN levemente superiores (80-90 ng/μl) que el *kit* de Fermentas (70-80 ng/μl).

En cuanto al método de obtención de micelio para las extracciones de ADN, del micelio cultivado en medio V8 sólido no se pudo extraer ADN. Esto se pudo deber a que el micelio no se secó antes de macerar y por ende al extraerse el agua la muestra era muy pequeña. Por último, del micelio obtenido mediante el cultivo en medio líquido mineral sí se pudo extraer ADN, ya que este micelio sí se secó antes de macerar y por ende la muestra estaba más concentrada.

6. CONCLUSIONES

- Fue factible conservar la diversidad genética de *M. roreri* usando discos de papel y su ADN.
- Se corroboró la gran importancia que tienen los requerimientos nutricionales y físicos para la germinación de esporas de *M. roreri*.
- El cultivo monospórico de cepas de *M. roreri* se simplifica si se aíslan colonias monospóricas bien formadas y no esporas en estados incipientes de germinación.
- La conservación a largo plazo de cepas de *M. roreri* en papel es una estrategia simple, viable y económica.
- La conservación del ADN de las cepas respalda a la colección en papel.
- El cultivo de *M. roreri* en medio líquido mineral permite obtener muestras adecuadas para las extracciones de ADN.
- No fue posible extraer ADN a partir de micelio crecido en medio V8 sólido.
- El *kit* de Macherey-Nagel es más efectivo para extraer ADN de *M. roreri* que el *kit* de Fermentas.
- Ambos *kits* son capaces de extraer ADN tanto de cepas aparentemente vegetativas como cepas esporuladas, así como de cepas conservadas *in vitro* por períodos cortos o largos.

7. RECOMENDACIONES

- Continuar con las evaluaciones periódicas de la viabilidad de las cepas conservadas en papel.
- Probar más *kits* de extracción de ADN que ofrezcan un producto de calidad a menor precio.
- Realizar un estudio detallado para saber si las cepas de *M. roreri* aparentemente vegetativas lo son, o si sus características son solamente variantes fenotípicas de la especie.

8. LITERATURA CITADA

- CAMPUZANO, H. 1981. Influencia de la temperatura y la humedad en la germinación de esporas de *Monilia roreri*. En: 8th International Cocoa Research Conference. Colombia. 1981. Actas Cocoa Producers' Alliance. Lagos, Nigeria. 493-497 p.
- CHACIN, L. 1975. Algunos aspectos biológicos y patogénicos de hongo *Monilia roreri* Ciferri y Parodi, agente causal de la moniliasis en cacao. Tesis Ing. Agr. Maracaibo, Venezuela. Universidad del Zulia. 64 p.
- ENRIQUEZ, G.; BRENES, O; DELGADO, J. 1981. Desarrollo e impacto de la moniliasis del cacao en Costa Rica. En: 8th International Cocoa Research Conference. Colombia. 1981. Actas Cocoa Producers' Alliance. Lagos, Nigeria. 375-380 p.
- _____. 2004. Cacao Orgánico: Guía para los productores ecuatorianos. Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Manual no 54.
- FALLAS, A. 1983. Estudio sobre la epifitología de la moniliasis del cacao (*Moniliophthora roreri* Cif & Par) Evans en dos zonas productoras de Costa Rica. Tesis Bach. San Carlos, Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. 78 p.
- FERNANDEZ, C.; MARTINEZ, G.; PERURENA, M; ILLNAIT, M.; VALDES, I. 2005. La colección de cultivos de hongos del instituto de medicina tropical "Pedro Kourí": funciones y retos. Revista Cubana de Medicina Tropical. Vol. 57 (no 3): 1-7.
- FLORES, D. 1989. Estudio ultramicroscópico del proceso de infección de *Moniliophthora roreri* en frutos de cacao. Tesis Msc. Turrialba, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 84 p.
- FORTIZ, L; ROBLES, H. 2002. How the diseases and plagues affect the production of cacao. Revista Agricultura Tropica et Subtropica. Vol 35: 173-177.

- GALINDO, J. 1985. Enfermedades del cacao de importancia económica en América. En: XXV Reunión Anual de la American Phytopathological Society 1985. Guanajuato, México. 26 p.
- HERRERA, F. 1988. Efecto de factores nutricionales y físicos sobre el crecimiento y esporulación de *Moniliophthora roreri* *in vitro*. Tesis Msc. Turrialba, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 159 p.
- _____. GALINDO, J.; RAMIREZ, C. 1989. Crecimiento y esporulación de *Moniliophthora roreri* en diversas fuentes de nitrógeno y carbono. Revista Turrialba. Vol. 39 (no 4): 429-434.
- KIRSOP, B. DOYLE, A. 1991. Maintenance of microorganisms and cultured cells. A manual of laboratory methods. Segunda edición. San Diego, California. Academic Press Inc. 308p.
- LEÓN, M.; GALLARDO, R. 2001. Comprobación de la viabilidad de cultivos fúngicos conservados en tierra de jardín y liofilizados. Revista ICIDCA sobre los derivados de la caña de azúcar. Vol. 35 (no 1): 57-59.
- NAGAI, T.; TOMIOKA, K.; TAKEUCHI, K.; IIDA, M.; KAWADA, M.; SATO, T. 2005. Evaluation of preservation techniques of microorganism resources in the MAFF genebank. JARQ (Japan Agricultural Research Quarterly). Vol 39 (no 1): 19-27.
- PANIZO, M.; REVIKINA, V., MONTES, W.; GONZALEZ, G. 2005. Mantenimiento y preservación de hongos en agua destilada y aceite mineral. Revista Sociedad Venezolana de Microbiología. Vol. 25 (no 1): 35-40.
- PHILLIPS-MORA, W.; COUTIÑO, A.; ORTIZ, C.; LÓPEZ, A.; HERNÁNDEZ, J.; AIME, M. 2006. First report of *Moniliophthora roreri* causing frosty pod rot (moniliasis disease) of cocoa in Mexico. Plant Pathology. Vol. 55 (no 4): 584.
- _____. GALINDO, J. 1985. Effect of light, temperature, carbon and nutrition sources on growth and sporulation of *Moniliophthora roreri* Cif & Par. Phytopathology. Vol. 75 (no 1): 178.
- _____. 2003a. Nuevas expectativas en la lucha contra la moniliasis del cacao: origen, dispersión y diversidad genética del hongo *Moniliophthora*

- roreri* en incorporación de fuentes de resistencia a través del mejoramiento genético. Turrialba, Costa Rica. CATIE. 3 p.
- _____. 2003b. Origin, biogeography, genetic diversity and taxonomic affinities of the cacao (*Theobroma cacao* L.) fungus *Moniliophthora roreri* (Cif.) Evans *et al.* as determined using molecular, phytopathological and morpho-physiological evidence. Tesis Ph.D. Londres, Inglaterra. Universidad de Reading. 349 p.
- PORRAS, V.; ENRÍQUEZ, G. 1998. Avance de la moniliasis del cacao en Centroamérica. Agencia de Cooperación Técnica en Costa Rica. IICA. San José, Costa Rica. 20 p.
- RAM, A. 1989. Biology, epidemiology and control of moniliasis (*Moniliophthora roreri*) of cacao. Tesis Ph.D. Londres, Inglaterra. Universidad de Londres. 313 p.
- SINGH, S. K.; UPADHYAY, R. C.; YADAV, M.C.; TIWARI, M. 2004. Development of a novel lyophilization protocol of mushroom mycelial cultures. *Current Science*. Vol. 87 (no 5): 568-570.
- TAZELAAR, C. 1991. Epidemiology of *Moniliophthora roreri*: A field study in the Atlantic Zone of Costa Rica. Atlantic Zone Programme. Turrialba, CR. CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CR); MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería, CR); AUW (Agriculture University Wageningen). (Fields Reports no 62).
- THÉVENIN, J. M.; TROCMÉ, O. 1996. La moniliasis del cacao. Plantations, recherche, développement. Vol. 3 (no 6): 403-406.
- WEISING, K.; NYBOM, H.; WOLFF, K.; MEYER, W. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Inc. Boca Ratón, Florida. 322 p.

ANEXOS

Anexo 1. Colección de cepas de *M. royeri* del CATIE por país de origen.

Belice	Costa Rica	Colombia		Ecuador	Honduras	México	Nicaragua	Panamá	Perú	Venezuela	
Be1	C1	Co2	Co49	Co88	E1	H1	Mx1	N1	Pa6	P1	V6
Be2	C2	Co6	Co50	Co89	E2		Mx2	N5		P2	V7
	C5	Co7	Co51	Co90	E4		Mx3	N6		P4	V8
	C7	Co8	Co52	Co91	E5					P5	
	C8	Co11	Co53	Co92	E6					P6	
	C9	Co12	Co54	Co93	E7						
	C13	Co13	Co55	Co94	E8						
	C14	Co15	Co56	Co95	E9						
	C16	Co17	Co57	Co96	E10						
	C18	Co19	Co58	Co97	E16						
	C20	Co20	Co59		E18						
	C23	Co21	Co60		E21						
	C26	Co22	Co61		E24						
	C27	Co23	Co62		E25						
	C28	Co24	Co63		E27						
	C29	Co25	Co64		E30						
	C30	Co26	Co65		E31						
	C31	Co27	Co66		E32						
	C32	Co28	Co67		E34						
	C33	Co29	Co68		E36						
		Co30	Co69		E42						
		Co31	Co70		E43						
		Co32	Co71								
		Co33	Co72								
		Co34	Co73								
		Co35	Co74								
		Co36	Co75								
		Co37	Co76								
		Co38	Co77								
		Co39	Co78								
		Co40	Co79								
		Co41	Co80								
		Co42	Co81								
		Co43	Co82								
		Co44	Co83								
		Co45	Co84								
		Co46	Co85								
		Co47	Co86								
		Co48	Co87								

Anexo 2. Cepas monospóricas de *M. royeri* de la colección del CATIE por país de origen.

Belice	Costa Rica	Colombia	Ecuador
Be1	C1	Co7	E1
	C7	Co8	E2
	C13	Co11	E5
	C14	Co12	E16
	C20	Co13	E18
	C23	Co15	
	C26	Co17	
	C27	Co19	
	C28	Co20	
	C30	Co21	
	C31	Co22	
	C32	Co23	
	C33	Co24	
		Co26	
		Co27	
		Co28	
		Co29	
		Co30	
		Co31	
		Co32	
		Co36	
		Co37	
		Co43	
		Co44	
		Co45	
		Co47	

Anexo 3. Medios de cultivo utilizados.

Preparación de 1L del medio de cultivo YEA (Ram, 1989).

1. Se pesaron 10 g de extracto de levadura Sigma[®] y 15 g de agar Sigma[®].
2. En un beaker se colocaron 1000 ml de agua destilada. Este fue colocado en un agitador magnético y se le aplicó calor.
3. Se agregó el extracto de levadura y el agar, y se agitó hasta que se disolvieron los reactivos.
4. Se dispensó la solución en botellas autoclavables debidamente rotuladas.
5. Dichas botellas fueron autoclavadas con el medio de cultivo por 30 minutos a 121°C y 15 lbs de presión, en un autoclave Market Forge Sterilmatic.

Preparación de 1L del medio de cultivo V8 modificado (Phillips-Mora, 2003b).

1. Se pesaron 10 g de asparagina Sigma[®], 20 g de maltosa Fisher Scientific, 18 g de agar Sigma[®] y 30 g de Carbonato de calcio Sigma[®]. Además se midieron 200 ml de jugo V8, Campbell Soup Company, Campbell, NJ, USA.
2. En un beaker se colocaron 800 ml de agua destilada. Este fue colocado en un agitador magnético y se le aplicó calor.
3. Se agregaron todos los ingredientes preparados en el primer paso, y se agitó hasta que se disolvieron los reactivos.
4. Se dispensó la solución en botellas autoclavables debidamente rotuladas.
5. Dichas botellas fueron autoclavadas con el medio de cultivo por 30 minutos a 121°C y 15 lbs de presión, en un autoclave Market Forge Sterilmatic.

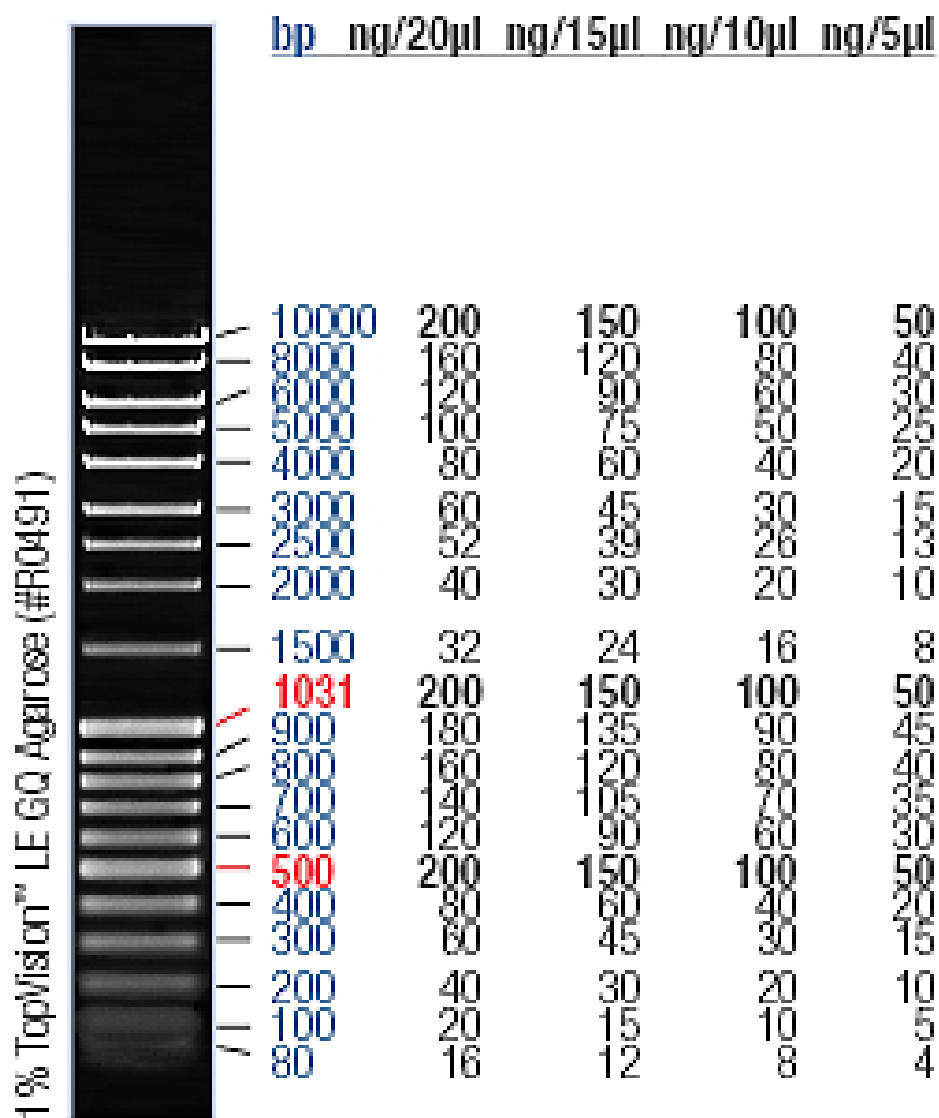
Preparación de 1L del medio de cultivo líquido mineral (Weising *et al*, 1995).

1. Para la preparación de este medio de cultivo se alistaron con anticipación diferentes diluciones de sales minerales y elementos traza, según el siguiente cuadro:

	Soluciones	Ingredientes
A	Buffer Fosfato	1,54 g/L KH_2PO_4 0,26 g/L K_2HPO_4
B	Sales Minerales y Microelementos	2,00 g/L NH_4NO_3 0,40 g/L Na_2SO_4 0,15 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,02 g/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
C	Solución Ferrosa	0,15 g/L $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
D	Solución de Calcio	1,10 g/L CaCl_2

- Una vez listas las soluciones, se pesaron 30 g de glucosa Sigma[®], 2 g de extracto de levadura Sigma[®] y 2 g de peptona Sigma[®].
- En un beaker se colocaron 1000ml de agua destilada. Este fue colocado en un agitador magnético y se le aplicó calor.
- Se agregaron todos los ingredientes preparados en el segundo paso, y se agitó hasta que se disolvieron los reactivos. Además se agregaron 10 ml/L de las soluciones A y B previamente preparadas.
- Se procedió a medir el pH del medio y se ajustó a un pH de 6.
- Se dispensó el medio en una botella autoclavable debidamente rotulada y se autoclavó por 30 minutos a 121°C y 15 lbs de presión, en un autoclave Market Forge Sterilmatic.
- Transcurrido este período, se trasladó el medio a una cámara de transferencia Edge Gard[®] Hood, en donde se procedió a adicionar 10ml/L de la solución C y 1 ml/L de la solución D a través de un filtro miliporo de 0,22 μm , ya que los componentes de estas soluciones son sensibles al calor.

Anexo 4. MassRuler™ DNA ladder, mix, ready-to-use #SM0403 de Fermentas.



10μl/lane, 8cm length gel,
1X TAE, 7V/cm, 45min

Disponible en: <http://www.fermentas.com/catalog/electrophoresis/massrulers.htm>