

EFECTO DE LA QUITOSANA SOBRE EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO *In Vitro* DEL HONGO *S. oryzae* Sawada Y LA PROTECCIÓN DE SEMILLAS DE ARROZ (*Oryza sativa* Lin)

A. Cruz[✉], Deyanira Rivero, B. Martínez, M. A. Ramírez y L. Maqueira

ABSTRACT. The chitosan, a non-toxic and biodegradable polymer, has been proved as an alternative to control some phytopathogen fungi. Therefore, the effect of Q-63 chitosan (100, 500 and 1000 mg.L⁻¹) was studied on the conidial germination and mycelial growth of *Sarocladium oryzae*, causal agent of sheath rot disease in rice, as well as its potentiality for protecting rice seeds inoculated with the pathogen. Germination percentage of the conidia treated with different concentrations of Q-63 was evaluated after two, five, eight, 11 and 14 hours, colony diameter was measured after two, five, eight, 11 and 13 days while fungal infection percentage in seeds treated with Q-63 was determined after six, seven, eight and nine days. Results showed the inhibitory effect of the compound on spore germination, mycelial growth and its seed protecting effect at the highest concentration.

Key words: chitosan, *Sarocladium oryzae*, seed, rice

RESUMEN. La quitosana, polímero no tóxico y biodegradable, ha demostrado ser una alternativa para el control de algunos hongos fitopatógenos. En este sentido, se estudió el efecto de la quitosana Q-63 (100, 500 y 1000 mg.L⁻¹) sobre la germinación de los conidios y el crecimiento micelial de *Sarocladium oryzae*, agente causal de la pudrición de la vaina del arroz, así como su potencialidad para la protección de semillas de arroz inoculadas con el patógeno. Para ello, se evaluó el porcentaje de germinación de los conidios tratados con Q-63 a las diferentes concentraciones, en los tiempos dos, cinco, ocho, 11 y 14 horas, se midió el diámetro de las colonias a los dos, cinco, ocho, 11 y 13 días y se determinó el porcentaje de infección por el hongo en semillas tratadas con Q-63 a los seis, siete, ocho y nueve días. Los resultados mostraron el efecto inhibitorio del compuesto sobre la germinación de esporas, el crecimiento micelial y protector en las semillas a la mayor concentración.

Palabras clave: quitosana, *Sarocladium oryzae*, semillas, arroz

INTRODUCCIÓN

La calidad de las cosechas y los rendimientos del cultivo del arroz se ven afectados por el ataque de un gran número de hongos fitopatógenos, entre los cuales se destaca *Sarocladium oryzae*, agente causal de la enfermedad conocida como pudrición de la vaina. Infecciones severas por este hongo conducen a afectaciones en la calidad de los granos, el porcentaje de germinación de las semillas y la emergencia de las panículas durante la etapa de floración (1). *S. oryzae* se transmite fundamentalmente por la semilla y es capaz de sobrevivir en granos de arroz infectados por más de 12 meses (1). Esta enfermedad se encuentra distribuida en numerosos países del mundo; sin embargo, no es hasta finales de 1997 que se detecta por primera vez en Cuba, en asociación con el ácaro *Steneotarsonemus spinki*. Este complejo

ácaro-hongo en 1998 llegó a causar pérdidas devastadoras en las plantaciones arroceras cubanas, lo cual se manifiesta en una reducción de los rendimientos de hasta 2 t.ha⁻¹ (2). En Taiwán y la India, el hongo ha causado pérdidas en los rendimientos entre un 60 y un 80 % respectivamente (3).

Entre las estrategias seguidas para el control de *S. oryzae* se encuentran la resistencia varietal, el control cultural, biológico y químico (1), siendo este último el más utilizado en el mundo, a pesar de ser perjudicial para el hombre y el ambiente. Por lo que se ha intensificado la búsqueda de nuevos productos que sean económicamente viables y menos agresivos al ambiente. En este sentido, la quitosana, polímero no tóxico y biodegradable (4), representa una posible alternativa como agente de control de patógenos. Este derivado desacetilado de la quitina se encuentra en las paredes celulares de algunos hongos (*Basidiomycetes* spp) y se obtiene por tratamiento alcalino de la quitina (5). La quitosana Q-63, procedente del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), ha manifestado resultados satisfactorios frente a *Phytophthora parasitica* en tabaco (6).

La quitosana, además, tiene la propiedad de inducir mecanismos de defensa en las plantas e inhibir el cre-

A. Cruz y Deyanira Rivero, Investigadores; Ms.C. M. A. Ramírez, Investigador Agregado; L. Maqueira, Reserva Científica de la Estación Experimental de Arroz "Los Palacios", Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas; Dr.C. B. Martínez, Investigador Titular del Departamento de Microbiología Vegetal, Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA), San José de las Lajas, La Habana, Cuba, CP 32 700.

✉ actriana@inca.edu.cu

cimiento micelial de un gran número de hongos fitopatógenos (5, 7, 8). Aunque no se ha determinado un mecanismo de acción de cómo se realiza esta inhibición, algunos suponen que los aminoácidos catiónicos de los oligosacáridos de quitosana se unen a los grupos aniónicos de los microorganismos y retardan su crecimiento (9), otros plantean que la acción está dada de forma indirecta al hacer inaccesible el Ca^{2+} , nutrientes y minerales esenciales para el crecimiento de hongos filamentosos (4).

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto antifúngico de la quitosana Q-63 sobre el crecimiento micelial y la esporulación del hongo *S. oryzae* en medio de cultivo, así como su efecto protector en semillas de arroz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo es el resultado de tres ensayos realizados en el laboratorio de Micología Vegetal, perteneciente al Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (CENSA).

La quitosana Q-63 se obtuvo a partir de la quitina de langosta, siguiendo la metodología descrita por Ramírez (10). El grado de desacetilación fue del 63.5 % y el grado de polimerización de 278.

Para el ensayo de actividad antifúngica se utilizó la cepa 130102 de *S. oryzae*, perteneciente al cepario de Micología Vegetal del Departamento de Fitopatología del CENSA.

La siembra del hongo *S. oryzae* se realizó en medio Agar Czapek Dox (Merck) repartido en placas Petri de 7,5 cm de diámetro y se incubaron a una temperatura de 28°C y oscuridad durante siete días, para lograr el crecimiento y la esporulación.

Ensayo en medio de cultivo. A partir del cultivo en Agar Czapek Dox, se extrajeron discos de micelio con un perforador de 4 mm de diámetro, los que fueron sumergidos, asépticamente, durante un minuto en las soluciones ajustadas a pH 5.2 correspondientes a los diferentes tratamientos: agua destilada estéril (control) y concentraciones de Q-63 de 100, 500 y 1000 mg.L⁻¹.

Posteriormente, los discos correspondientes a cada tratamiento se colocaron en el centro de placas Petri que contenían medio Agar Czapek Dox (un disco por placa), ajustado antes de la esterilización a un pH 7. Las placas se incubaron a una temperatura de 28°C, en condiciones de oscuridad.

La evaluación consistió en medir el diámetro de cada colonia del hongo con una regla graduada, por un período de 13 días, al que se le restó el diámetro del disco sembrado. Con los resultados obtenidos se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial mediante la fórmula: % de inhibición = $(1 - \text{tratado/control}) \times 100$. Los datos fueron transformados según la fórmula $2 \arccos \sqrt{\%}$. Se registró, además, el color, la forma y textura de la colonia.

Ensayo de germinación de los conidios. A partir del cultivo de *S. oryzae*, se preparó una suspensión de esporas.

Para ello se añadieron 10 mL de agua destilada estéril por placa. Se agitó con una espátula de Drigalski flameada. La concentración se determinó y se ajustó a 5×10^5 conidios.mL⁻¹ mediante el empleo de una cámara de Thomas.

En tres portaobjetos se adicionaron 20 µL de la suspensión de esporas de *S. oryzae* y 20 µL de Q-63 a las concentraciones de 600, 1000, 1500 y 2000 mg.L⁻¹ respectivamente, para obtener concentraciones efectivas de quitosana de 300, 500, 750 y 1000 mg.L⁻¹, correspondientes a los tratamientos. El control consistió en la mezcla de 20 µL de la suspensión de esporas con igual volumen de agua destilada estéril. Los portaobjetos se incubaron en condiciones de cámara húmeda, en oscuridad, a $26 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 14 horas. En un microscopio (ZEISS Standard 25) a un aumento de 400X, se evaluó el porcentaje de germinación de los conidios a las dos, cinco, ocho, 11 y 14 horas. Se utilizaron tres portaobjetos por tratamiento y se observaron cuatro campos por lámina, con al menos 50 esporas por campo.

Los datos obtenidos en este ensayo se procesaron a través de un Análisis de Varianza de Clasificación Simple y las medias se docimaron a través de la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan, con un nivel de significación de 0,05.

Ensayo con semillas. A partir del cultivo de *S. oryzae* en Agar Czapek Dox inicial, se realizó una suspensión de esporas y para ello se añadieron 5 µL de agua destilada estéril. Se agitó con una espátula de Drigalski estéril. La concentración se determinó y se ajustó a 5×10^6 conidios.mL⁻¹ mediante el empleo de una cámara de Thomas.

Se seleccionaron semillas sanas de la variedad INCA LP-6, procedentes de la Estación Experimental de Arroz "Los Palacios", se sumergieron en hipoclorito de sodio (1 %) y etanol (70 %) durante dos minutos y un minuto, respectivamente. Posteriormente, fueron lavadas tres veces con agua destilada estéril.

Una vez desinfectadas las semillas, se sumergieron, asépticamente, en 10 mL de las diferentes concentraciones de Q-63, durante 10 minutos y se dejaron secar sobre papel de filtro estéril. Luego, fueron inoculadas por aspersión con 5 mL de la suspensión de esporas de *S. oryzae* (5×10^6 conidios.mL⁻¹).

Los tratamientos fueron:

1. Semillas no tratadas con Q-63 y asperjadas con agua destilada estéril (control negativo)
2. Semillas no tratadas con Q-63 y asperjadas con la suspensión de esporas de *S. oryzae* (control positivo)
3. Semillas tratadas con Q-63 a 500 mg.L⁻¹ y asperjadas con la suspensión de esporas de *S. oryzae*
4. Semillas tratadas con Q-63 a 750 mg.L⁻¹ y asperjadas con la suspensión de esporas de *S. oryzae*
5. Semillas tratadas con Q-63 a 1000 mg.L⁻¹ y asperjadas con la suspensión de esporas de *S. oryzae*.

Las semillas se colocaron sobre un papel de filtro estéril humedecido en placas Petri de 25 cm de diámetro

(cámara húmeda), a razón de 25 semillas por tratamiento y se incubaron durante nueve días a 30°C en oscuridad.

A los seis, siete, ocho y nueve días de iniciado el ensayo, se evaluó el porcentaje de infección de las semillas por *S. oryzae*, para lo cual se empleó un estereomicroscopio binocular (ZEISS Stemi SV 6). Se consideraron como semillas infestadas aquellas que presentaron crecimiento micelial y/o esporulación sobre su superficie y/o manchado. Se utilizaron cuatro repeticiones por tratamiento.

Para el desarrollo de este ensayo se utilizó un Diseño Completamente Aleatorizado. Los datos se transformaron mediante la expresión $2 \arcsen \sqrt{\%}$ (6). Con estos datos se realizó un Análisis de Varianza Bifactorial, donde los factores fueron las concentraciones de Q-63 y de inóculo. Las medias se docimaron mediante la Prueba de Rangos Múltiples de Duncan, con un nivel de significación de 0.05.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo en medio de cultivo. La coloración de las colonias fue rosado salmón, con la aparición de pequeños tufos blancos en el centro, textura aterciopelada y bordes regulares; estos resultados concuerdan con otros (11). Estas características no mostraron diferencias entre los tratamientos. Con el aumento de la concentración del compuesto, se observó un incremento en la profundidad en las hendiduras radiales de la colonia, lo que pudiera estar relacionado con el efecto del polímero sobre el hongo. Esto concuerda con otros estudios, en los que se destacan variaciones en las características culturales de otros hongos filamentosos frente a la quitosana (4).

Como puede observarse (Figura 1), el mayor efecto inhibitorio se obtiene el día 2, a la mayor concentración del compuesto, observándose diferencia significativa al ser comparadas con las otras dos concentraciones (100 y 500 mg.L⁻¹). En las restantes evaluaciones, no existen diferencias significativas entre las concentraciones de Q-63, pero sí con respecto al control. Estos resultados coinciden con los obtenidos en estudios realizados con los patógenos *Rhizoctonia solani* Kuhn (12) y *Pyricularia grisea* Sacc (13); sin embargo, las diferencias obtenidas en los mayores porcentajes de inhibición en el crecimiento de estos hongos, respecto a los resultados del presente trabajo, podrían ser atribuidas al modo de ensayo utilizado, ya que realizaron sus experimentos mediante envenenamiento del medio y/o a las características fisiológicas de los hongos evaluados, como ha sido reflejado en trabajos donde se utilizan otros hidrolizados de quitosana (4).

Por otra parte, los porcentajes de inhibición después de la primera evaluación tuvieron poca variación, lo que puede estar dado por una interacción estable entre el hongo y el compuesto, aspecto que sería de interés evaluar en estudios posteriores, puesto que indica un efecto fungistático. A partir del método empleado y los resultados, se puede inferir que la acción sobre el hongo fue directa, como se señala en otras investigaciones (9).

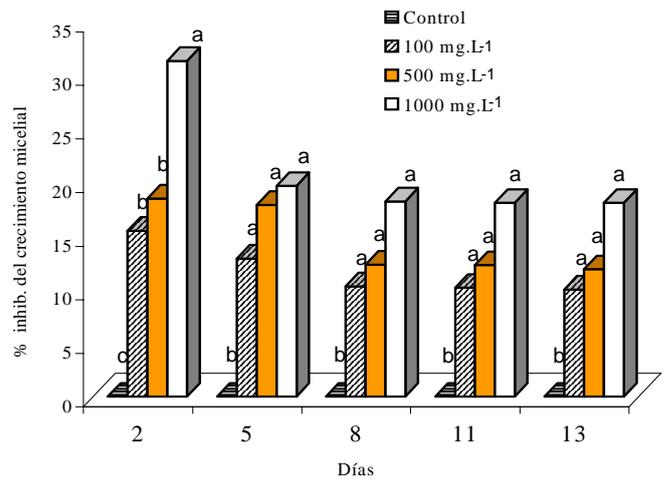


Figura 1. Efecto de diferentes concentraciones de quitosana sobre el crecimiento micelial de *S. oryzae*

Ensayo de germinación de los conidios. En la Figura 2 se puede observar, que el porcentaje de germinación conidial en el control fue significativamente mayor al resto de los tratamientos con quitosana, independientemente del tiempo de la evaluación. Estas diferencias se hacen evidentes a partir de las dos horas y se acentúan con el tiempo, alcanzándose en el control el 100 % de germinación conidial a las 11 horas; mientras que en los tratamientos de menores concentraciones de Q-63 (300 y 500 mg.L⁻¹), el porcentaje de germinación fue de 18 y 16 % respectivamente, lo cual demuestra las potencialidades del preparado sobre la germinación conidial del hongo *S. oryzae*.

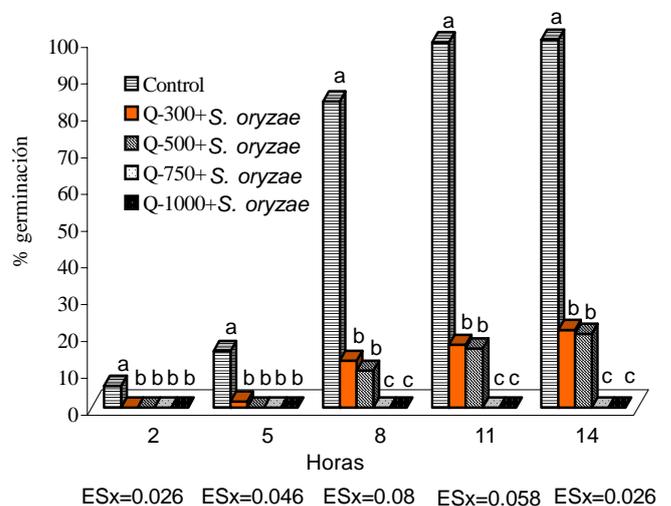


Figura 2. Efecto de diferentes concentraciones de quitosana Q-63 sobre la germinación de conidios de *S. oryzae*

Los mejores resultados fueron alcanzados a las concentraciones de 750 y 1000 mg.L⁻¹, las cuales inhibieron completamente la germinación de los conidios del hongo. Un efecto biológico similar al de estos últimos tratamientos fue obtenido al tratar conidios de *Fusarium spp*

con quitosana Q-63 (14), con una total inhibición de su germinación para las concentraciones de 500 y 1000 mg.L⁻¹. Sin embargo, los resultados del presente estudio superan los obtenidos sobre la germinación de los conidios de los hongos *Phytophthora cactorum*, *P. meggasperma*, *P. paroeandrum*, *Pythium debaryanum*, *Fusarium oxysporum* y *F. culmorum*, en los cuales no se alcanzó una total inhibición de la germinación (15).

Ensayo con semillas. La Figura 3 muestra el porcentaje de ataque de *S. oryzae* en semillas tratadas con diferentes concentraciones de Q-63.

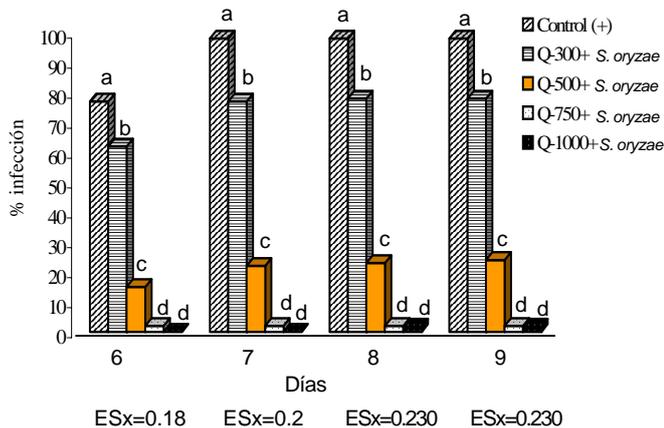


Figura 3. Efecto de la quitosana Q-63 sobre el ataque de semillas de arroz por *S. oryzae*

Como se puede apreciar, a medida que aumentó la concentración de la quitosana Q-63 disminuyó significativamente el porcentaje de ataque de *S. oryzae*, mostrando cada uno de estos tratamientos diferencias significativas respecto al control. Este comportamiento coincide con otros resultados obtenidos en la protección de semillas con diferentes concentraciones de quitosana (8).

Como se refleja en el gráfico, el porcentaje de ataque en los diferentes tratamientos aumentó ligeramente entre los días 6 y 7, momento a partir del cual se alcanzó estabilidad protectora en el tiempo. Los mejores tratamientos en el control de la infección fueron para las concentraciones de 1000 y 750 mg.L⁻¹, ya que solo se alcanzó un 1,7 y un 2 % respectivamente, de ataque a las semillas, en el último día de la evaluación. La efectividad de la concentración de 1000 mg.L⁻¹ en el control de *S. oryzae* en este trabajo, coincide con investigaciones realizadas por otros en la lucha contra hongos fitopatógenos como *Pyricularia grisea* y *Rhizoctonia solani* Kuhn (12, 13).

Con estos resultados puede concluirse que Q-63 ejerce un efecto inhibitorio en el crecimiento micelial, la germinación de los conidios y protege la semilla contra el ataque externo de *S. oryzae*, lo que abre nuevas posibilidades de control de este hongo dentro del manejo integrado de plagas del cultivo del arroz.

REFERENCIAS

1. CAB International. Crop Protection Compendium [CD]. Londres, 2001.
2. Cuba. Minagri. Informe sobre el vaneado de la panícula y la pudrición de la vaina del arroz, producida por el complejo del ácaro *Steneotarsonemus spinki* y el hongo *Sarocladium oryzae* Sawada. La Habana : INISAV. 1998. 26 p.
3. Tchen, J. S. M.; Chen, L. L.; Hsieh, S. T. y Eu, T. S. Isolation and phytotoxic effects of helvolic acid from plant pathogenic fungus *S. oryzae*. *Bot. Bull. Acad.*, 1997, vol. 38, p. 251-256.
4. Roller, S. y Covill, N. The antifungal properties of chitosan in laboratory media and apple juice. *International Journal of Food Microbiology*, 1999, vol. 47, no. 2, p. 67-77.
5. Roller, S. y Covill, N. The antimicrobial properties of chitosan in mayonnaise and mayonnaise-based shrimp salads. *Journal of Food Protection*, 2000, vol. 63, no. 2, p. 202-209.
6. Falcón, A.; Ramírez, M. A.; Márquez, R. y Hernández, M.. Chitosan and its hidrolisates at tobacco-*Phytophthora parasitic* interaction. *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 1, p. 61-66.
7. Paz-Lago, D.; Cabrera, G.; Ramírez, M. A.; Pombo, R. y Gutiérrez, A. Influencia de derivados de quitina en la interacción tomate-*Fusarium oxysporum fsp lycopersicii* a nivel de bioensayo. *Cultivos Tropicales*, 1999, vol. 20, no. 3, p. 59-61.
8. Hirano, S. Application of chitin and chitosan in the ecological and environmental fields. En: *Applications of Chitin and Chitosan*. Lancaster : Technomic Publishing, 1997. p. 31-54.
9. Majeti, N. y Kumar, R. A review of chitin chitosan applications. *Reactive Functional Polymers*, 2000, vol. 46, p. 1-27.
10. Ramírez, M. A.; Cabrera, G.; Gutierrez, A y Rodríguez, T. Metodología para la obtención de quitosana a bajas temperaturas a partir de quitina de langosta. *Cultivos Tropicales*, 2000, vol. 21, no. 1, p. 81-84.
11. Bonilla, T.; Sandoval, R.; López, M. O. y Porras, A. Determinación del medio de cultivo para el crecimiento y esporulación de *Sarocladium oryzae*. En: Memorias del Encuentro Internacional de Arroz. (2:2002:La Habana). 2002. p. 165-166.
12. Parra, Y. y Ramírez, M. A. Efecto de diferentes derivados de la quitina sobre el crecimiento *in vitro* del hongo *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Cultivos Tropicales*, 2002, vol. 23, no. 2, p. 73-75.
13. Rodríguez T.A.; Ramírez, M. A.; Márquez, R. y Nápoles, M. C. Comparación de la actividad antifúngica de dos productos derivados de quitina sobre el hongo *Pyricularia grisea*. En: Memorias del Encuentro Internacional de Arroz. (2:2002:La Habana). 2002. p. 162.
14. Rivero, D.; Cruz, A.; Martínez, B.; Ramírez, M, A.; Rodríguez, A. T. y Cárdenas, R. M. Efecto protector de la quitosana en semillas de arroz frente a *Fusarium* spp. *Rev. Protección Vegetal*, 2004, vol. 19, no. 2, p. 140-144.
15. Ben-Shalom, N. y Platt, D. Compositions and method for controlling fungal disease in plants. *United States Patent*, 5,965,545. October 12. 1999.

Recibido: 8 de noviembre de 2004

Aceptado: 16 de mayo de 2005