

EFECTO DEL FILTRADO OBTENIDO A PARTIR DE CULTIVOS DEL HONGO *Pyricularia grisea* Sacc. EN MEDIO LÍQUIDO, SOBRE PLÁNTULAS Y SEMILLAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)

Regla M. Cárdenas, María M. Hernández y R. Morejón

ABSTRACT. Raw extracts of pure colonies of *Pyricularia grisea* fungus, of 60 days of incubation in 200 mL of Czapek liquid medium were used at different concentrations, on 30-day-old rice seedlings of IR-837 var. and in seeds from IR-837 and IR-759-54-2-2 cv., with the objective of proving their toxigenic power. Seedling symptoms consisted of progressive wilting twelve hours after they were placed in the filtrate and they were directly related with the concentration. There was an inhibiting action of the filtrate and its dilutions on rice seed germination in both varieties, which is in correspondance with the concentration, although there were not statistically significant differences among treatments. The different filtrate concentrations influenced seedling height and root length, that was inhibited under the action of the pure filtrate, but increasing with concentration decrement in the susceptible variety, although there were no statistically significant differences. Results proved that the fungus produces toxic substances in Czapek culture medium.

Key words: disease resistance, metabolite, toxins, *Pyricularia grisea*, rice, fungus

RESUMEN. Extractos crudos de colonias puras del hongo *Pyricularia grisea*, de 60 días de incubación en 200 mL de medio líquido Czapek, fueron utilizadas en diferentes concentraciones, sobre plántulas de arroz de 30 días, var. IR-837 y en semillas de las variedades IR-837 e IR-759-54-2-2, con el objetivo de comprobar su poder toxigénico. Los síntomas en las plántulas consistieron en marchitamiento progresivo a partir de las doce horas de colocadas en el filtrado y estuvieron directamente relacionadas con la concentración. Se manifestó una acción inhibidora del filtrado y sus diluciones sobre la germinación de la semilla de arroz en ambas variedades, lo cual estuvo en correspondencia con la concentración, aunque estadísticamente no hubo diferencias significativas entre los tratamientos. Las diferentes concentraciones del filtrado ejercieron influencias en la altura de las plántulas y en la longitud de las raíces, lo cual se inhibió bajo la acción del filtrado puro, incrementándose con la disminución de la concentración en la variedad susceptible, aunque estadísticamente no se presentaron diferencias significativas. Los resultados demuestran que el hongo produce sustancias tóxicas en el medio de cultivo Czapek.

Palabras clave: resistencia a la enfermedad, metabolitos, toxinas, *Pyricularia grisea*, arroz, hongo

INTRODUCCIÓN

Los hongos fitopatógenos producen una amplia y variada gama de compuestos, entre los cuales se encuentran las toxinas, que son metabolitos que inducen alteraciones en las reacciones metabólicas en las células vegetales vivas, lo que produce una desorganización de los procesos fisiológicos que se llevan a cabo en las plantas y propician el desarrollo de enfermedades.

A escala mundial se han realizado numerosos trabajos empleando toxinas con especificidad hospedera producidas por algunos hongos fitopatógenos, con vistas a la selección *in vitro* de variedades resistentes a las enfermedades producidas por esos patógenos (Cornide,

Lima y Suril, 1993). En Cuba, en lo últimos años se ha incrementado el número de trabajos relacionados con esta temática, pudiéndose citar los estudios llevados a cabo por Veitía *et al.* (1996) en papa (*Solanum tuberosum*) con el hongo *Alternaria alternata*; en tomate (*Lycopersicon esculentum*) se han utilizado las toxinas de *Stemphylium solani* (Márquez *et al.* 1996; Lara *et al.*, 1998). También en tomate se ha trabajado con las toxinas del hongo *Alternaria solani* (Pérez y Martínez, 1996); en caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) con las del hongo (*Ustilago scitaminea*) (Héctor *et al.* 1998) entre otros.

El hongo *Pyricularia grisea*, agente causal de la Piriculariosis, produce diferentes sustancias que al parecer están implicadas en mayor o menor grado en el proceso de la patogénesis y en la manifestación de los síntomas de la enfermedad (Kozaka, 1995), que tiene gran importancia a nivel mundial por las pérdidas que ocasiona al cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.); sin embargo, en la literatura consultada no aparecen estudios utilizando

Ms.C. Regla M. Cárdenas y Ms.C. R. Morejón; Investigadores de la Estación Experimental del Arroz «Los Palacios»; Dra. María M. Hernández, Investigador Titular del departamento de Genética y Mejoramiento, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, Cuba.

las toxinas o metabolitos de este hongo en la selección *in vitro* de formas resistentes.

Teniendo en cuenta lo antes expuesto se realizó el presente estudio, con el objetivo de comprobar el efecto toxigénico del filtrado obtenido a partir de cultivos del hongo *Pyricularia grisea* sobre plántulas y semillas de arroz, constituyendo una fase demostrativa de que el aislamiento del patógeno utilizado produce sustancias tóxicas en el medio de cultivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Experimento 1

Efecto de diferentes concentraciones del filtrado en plántulas de arroz. Se tomó como base la metodología descrita por Hernández *et al.* (1991) a la que se le hicieron algunas modificaciones.

El filtrado utilizado se obtuvo a partir de un aislamiento monospórico del hongo *Pyricularia grisea* caracterizado por Cárdenas y Hernández (1997), incubado durante 60 días en 200 mL de medio líquido Czapek a temperatura de 28°C en condiciones de oscuridad y se pasó a través de un filtro de placa no. 5 al vacío y bajo el flujo laminar. A partir de aquí se realizaron las siguientes diluciones:

- ⇒ una parte del filtrado: una parte de agua destilada estéril
- ⇒ una parte del filtrado: dos partes de agua destilada estéril
- ⇒ una parte del filtrado: tres partes de agua destilada estéril.

Además, se empleó el filtrado puro (FP), un testigo con agua destilada (H₂O_d) y otro con medio Czapek (M).

Se utilizaron plántulas de 30 días de germinada de la variedad IR-837 susceptible a la piriculariosis, a las que se les eliminó previamente la zona de la raíz y se colocaron cada una en tubos de ensayos conteniendo 20 mL de las soluciones antes mencionadas, para un total de 10 tubos por cada tratamiento que corresponden a las diferentes concentraciones estudiadas.

Las evaluaciones se realizaron cada 12 horas a partir de las 12 horas de iniciado el bioensayo y hasta las 60 horas y consistió en registrar el número de plántulas con síntomas. Estas se basaron en el marchitamiento de la superficie foliar, para lo cual se empleó el esquema que representa el área foliar afectada (AFA) por *Piricularia* utilizado por Aricapa y Correa-Victoria (1994), ajustado a nuestras condiciones experimentales, teniendo en cuenta los daños en las hojas por encima de 32 % AFA.

Experimento 2

Efecto de las diferentes concentraciones del filtrado en la germinación de semillas de arroz, longitud de la raíz y altura de las plántulas. Se utilizaron semillas de arroz de las variedades resistente y susceptible a la piriculariosis IR-759-54-2-2 e IR-837, respectivamente, las cuales fueron desinfectadas con hipoclorito de sodio al 25 % durante 15 minutos y posteriormente lavadas con abundante agua destilada. Se colocaron sobre papel de filtro en placas Petri conteniendo 2 mL de las siguientes soluciones:

- ⇒ una parte del filtrado: una parte de agua destilada estéril
- ⇒ una parte del filtrado: dos partes de agua destilada estéril.

Además, se empleó el filtrado puro (FP), un testigo con agua destilada (H₂O_d) y otro con medio Czapek (M).

Las evaluaciones se realizaron a las 48 y 120 horas, expresándose en porcentaje de semillas germinadas. A las 120 horas se determinó el número de semillas germinadas y se midió además la longitud de las raíces y la altura de las plántulas con ayuda de una regla graduada en milímetros. Se utilizó un Diseño Completamente Aleatorizado con un arreglo factorial y tres repeticiones.

Se evaluaron 30 semillas por cada tratamiento; los datos del porcentaje de semillas germinadas se transformaron según la expresión: $\arccos \sqrt{\%}$

Posteriormente se retransformaron para su interpretación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Tabla I se puede apreciar que a partir de las 12 horas de montado el bioensayo, las soluciones con mayor concentración del filtrado (FP y 1:1) produjeron síntomas en las plántulas que consistieron en marchitamiento, aunque el número inicial de plantas afectadas fue bajo en ambos casos. A partir de las 24 horas éste se incrementó hasta alrededor de las 60 horas en que todas las plántulas presentaron síntomas severos. Al respecto, Agrios (1985) refirió que los filtrados obtenidos a partir de cultivos del hongo contenían la toxina piricularina y podían producir marchitamiento; por otro lado, Kozaka (1995) informó que se han aislado más de 10 tipos de compuestos fitotóxicos producidos por el patógeno y entre ellos un glicopéptido que es una toxina inductora de marchitez.

Tabla I. Número de plántulas con síntomas en las diferentes concentraciones

Horas	H ₂ O _d	Plantas con síntomas				
		Medio	FP	1:1	1:2	1:3
12	0	0	3	2	0	0
24	0	0	8	6	5	0
36	0	0	8	8	7	2
48	0	0	10	10	9	4
60	0	0	10	10	10	10

El marchitamiento se manifestó primeramente a todo lo largo del borde de las hojas, comenzando por las más jóvenes y fue avanzando hacia el nervio central hasta cubrir la totalidad de ésta y provocar la muerte de la plántula.

Este hecho pone de manifiesto el poder toxigénico del filtrado y su relación con la concentración, lo cual abre la posibilidad de su empleo en la selección *in vitro* de formas resistentes.

Sobre la base de este resultado se procedió al montaje del bioensayo con semillas de arroz; los resultados se muestran en la Tabla II. En ésta se observa que a las 48 horas comenzaron a germinar las semillas en la variedad IR-837 con las diferentes concentraciones estudiadas, alcanzando el mayor porcentaje en la concentración 1:2 y para el caso de la variedad IR-759-54-2-2 resultó

ser de 3 % a dicha concentración. A las 120 horas la variedad IR-837 presentaba los mayores porcentajes de germinación con respecto a la IR-759-54-2-2.

Tabla II. Porcentajes de germinación en las diferentes concentraciones (datos retransformados)

Tiempo Concen- tración	H ₂ O	Porcentajes de germinación					Porcentajes de germinación				
		48 horas			120 horas		48 horas			120 horas	
		Medio	FP	1:1	1:2	H ₂ O	Medio	FP	1:1	1:2	
IR837	23h	24i	17i	20h	33g	93b	93b	87c	93b	83d	
IR759	7j	8j	0l	0l	3k	97a	97a	60f	70e	73e	

ES= 0.9354
CV= 3.42 %

Medias con letras iguales no difieren significativamente ($p < 0.05$)

Se puede apreciar un comportamiento un tanto errático de las variedades estudiadas en cuanto a la germinación en las diferentes concentraciones del filtrado, destacándose el hecho de que la variedad considerada como resistente a la enfermedad mostró en todos los casos valores de germinación por debajo de la variedad susceptible, lo cual pudiera atribuirse a la dormancia de la semilla, que en el caso de esta variedad resultó ser de mayor duración que en el caso de la IR-837.

En la Tabla III puede observarse que a pesar de los problemas con la germinación que aparentemente presentaron las semillas de la variedad IR-759-54-2-2 y, en general, los bajos valores alcanzados en los testigos, se manifestó una acción inhibitoria del filtrado y sus diluciones sobre la germinación de las semillas de ambas variedades, estando esta acción en correspondencia con la concentración, aún cuando no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos ni con el testigo.

Tabla III. Número de semillas germinadas en las diferentes variedades

Variiedad	Concentración	Germinación
IR 837	H ₂ O	9.333 ab
	M	9.333 ab
	FP	8.666 b
	1:1	9.333 ab
	1:2	8.333 bc
IR 759	H ₂ od	9.666 a
	M	9.666 a
	FP	6.000 e
	1:1	7.000 de
	1:2	7.333 cd

ES = 0.3536
CV = 7.46 %

De manera general, en esta experiencia el filtrado y sus diluciones ejercieron una influencia variable en relación con la longitud de la raíz, mientras que para el caso de la altura de las plantas esta influencia no fue significativa. En la Tabla IV se pueden observar los resultados obtenidos en cuanto a la longitud radical, pudiéndose apreciar que para el caso de la variedad susceptible, el filtrado

puro ejerció una acción inhibitoria mayor, aunque esta actividad no fue estadísticamente diferente al resto de los tratamientos usados para esta variedad, mientras que para la variedad resistente la mayor inhibición tuvo lugar con el filtrado puro y la dilución 1:1, presentándose diferencias significativas con el resto de los tratamientos empleados en este caso.

Tabla IV. Longitud de la raíz de las plántulas en función de la variedad y la concentración

Variiedad	Concentración	Longitud raíz
IR 837	H ₂ O	2.000 abc
	M	2.000 abc
	FP	1.286 bcd
	1:1	2.193 ab
	1:2	2.193 ab
IR 759	H ₂ od	2.803 a
	M	2.803 a
	FP	0.879 d
	1:1	1.046 cd
	1:2	2.150 ab

ES = 0.3210
CV = 30.40 %

En la Tabla V se pueden apreciar los resultados referentes a la altura de las plántulas. Aquí no se distinguen diferencias significativas entre los tratamientos; no obstante, los valores más bajos (mayor inhibición) corresponden al FP en el caso de la variedad susceptible y al FP y la dilución 1:1 para la variedad resistente. O sea, que este comportamiento tendió a ser similar al observado en el caso de la longitud radical.

Tabla V. Altura de las plántulas en función de la variedad y la concentración

Variiedad	Concentración	Altura
IR 837	H ₂ O	6.696
	M	0.696
	FP	0.153
	1:1	0.743
	1:2	0.636
IR 759	H ₂ od	1.166
	M	1.166
	FP	0.463
	1:1	0.490
	1:2	1.066

ES = 0.2514 NS
CV = 64.32 %

No obstante, haberse encontrado pocas diferencias entre los tratamientos utilizados, en el caso de la longitud radical y la altura de las plántulas, en el resto de la experiencia se pudo apreciar actividad deletérea del filtrado y sus diluciones, que pudieran ser consecuencia de los disturbios que ocasionan en el metabolismo hospedero las toxinas o metabolitos contenidos en el filtrado.

Teniendo en cuenta los resultados de este trabajo, se recomienda continuar realizando este tipo de estudio y al mismo tiempo diseñar otros experimentos, usando diferentes variedades que permitan conocer con más exactitud la influencia del filtrado y sus diluciones sobre la planta de arroz.

REFERENCIAS

- Agrios, G. N. Fitopatología. México : Editorial Limusa. 1985, p. 75-105.
- Aricapa, M. G. y Correa-Victoria, F. Integración de fitopatología, mejoramiento y biología molecular para el desarrollo de resistencia estable al añublo del arroz (*Pyricularia grisea*). En Taller sobre «DNA fingerprinting» de *Pyricularia grisea*. Colombia. 1994, p. 1-4.
- Cárdenas, R. M. y Hernández, M. M. Caracterización morfológica de un aislamiento de *Pyricularia grisea* Sacc. en diferentes medios de cultivo. *Cultivos tropicales*, 1997, vol. 18, no. 2, p. 40-43.
- Cornide, M. T., Lima, H. y Surli, J. La resistencia genética de las plantas cultivadas. La Habana. Editorial Científico-Técnica. 1994, p. 146-147.
- Héctor, E., et al. A. El ahijamiento *in vitro* en presencia de filtrados de *Ustilago scitaminea* Sydow como criterio para la resistencia al carbón de variedades de caña de azúcar. En Programas y Resúmenes. XI Seminario Científico del INCA . 1998, p. 106.
- Hernández, M. M., et al. Efectividad del empleo de filtrados de *Alternaria solani* Ellis y Martin (Jones y Groul) en la selección *in vitro* de formas resistentes en papa (*Solanum tuberosum* L.). *Cultivos Tropicales*, 1991, vol. 12, no. 2, p. 48-50.
- Kozaka, T. Enfermedades y plagas. En Science of the Rice Plant Physiology. Tokyo : Food and Agriculture Policy Research Center, 1995, p. 850-868.
- Lara, R. M., et al. Efecto de la toxina del hongo *Stemphylium solani* Weber sobre dos variedades de tomate. En Programas y Resúmenes. XI Seminario Científico del INCA. 1998, p. 106.
- Márquez, R., et al. Empleo de filtrados fitotóxicos producidos por *Stemphylium solani* Weber para la selección de variedades de tomate tolerantes al patógeno. En Programas y Resúmenes. X Seminario Científico del INCA. 1996, p. 107.
- Pérez, S. y Martínez, B. Filtrados de *Alternaria solani* Sor. para la diferenciación de genotipos de tomate. Resultados preliminares. *Protección Vegetal.*, 1996, vol. 11, no. 2, p. 119-121.
- Veitía, N., et al. Posibilidad del empleo de las toxinas de *Alternaria alternata* en la selección *in vitro* de papa. En Programas y Resúmenes. X Seminario Científico del INCA. 1996, p. 107.

Recibido: 23 de marzo de 1999

Aceptado: 24 de septiembre de 1999

**INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
DIPLOMADO DE MATEMÁTICA APLICADA
2000**

**“Formación de especialistas en matemática
aplicada a las ciencias agrícolas”**



Duración: 6 meses

PRECIO: 1000.00 USD

Para más información diríjase a:

**Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba CP 32700
Telf: (53)(64) 6-3867, 6-3773
Fax: (53)(64) 6-3867
e-mail: posgrado@inca.edu.cu**