

DETERMINACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO Y ESPORULACIÓN DE *SAROCLADIUM ORYZAE* (SAWADA) GAMS & HAWKS

Tania Bonilla Bernal, Ileana Sandoval Ramírez, María Ofelia López y Ángela Porras

Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal. Calle 110 no. 514 e/ 5a. B y 5a. F, Playa, Ciudad de La Habana, CP 11600

RESUMEN

La enfermedad conocida como pudrición de la vaina del arroz es producida por *Sarocladium oryzae*, el cual se detectó por primera vez en nuestro país a finales de 1997. Este hongo, conjuntamente con el ácaro *Steneotarsonemus spinki*, provocó serias afectaciones en el cultivo del arroz en La Habana y Pinar del Río. Sobre la biología y epidemiología de este patógeno es muy poco lo que se conoce hasta el momento, por lo que se hace necesario realizar diferentes estudios biológicos de nuestros aislamientos. En este trabajo se evaluó el crecimiento y esporulación de *S. oryzae* en cinco medios de cultivo, con el objetivo de seleccionar el más adecuado para el desarrollo de este hongo. Los medios estudiados fueron Agar de Czapeck Dox (modificado), Agar arroz, Agar de Sabouraud, Agar extracto de malta y Agar papa dextrosa. A los tres, seis, nueve, doce y quince días se midió el crecimiento micelial del hongo y se determinó la esporulación por conteos de conidios en la cámara de Neubauer. Se describieron las colonias en cada medio de cultivo, observando diferencia en cuanto a la forma de la colonia, coloración y aspecto en cada sustrato. A los quince días se pudo apreciar que el hongo creció más en agar extracto de malta, donde alcanzó 51 mm, seguido de agar de Czapeck, con 45 mm, y 41 mm en agar de Sabouraud. Para la esporulación se alcanzaron concentraciones de $1,4 \times 10^7$ con/mL en el sustrato antes mencionado y en los restantes los valores oscilaron entre $1,1 \times 10^6$ a $4,4 \times 10^6$ con/mL. El medio agar de Czapeck fue seleccionado como el adecuado para el crecimiento, esporulación y carácter diagnóstico de *S. oryzae*, fundamentalmente por la pigmentación naranja del reverso de la colonia.

Palabras claves: *Sarocladium oryzae*, medio de cultivo, crecimiento, esporulación

ABSTRACT

Sheath rot diseases is caused by *S. oryzae* detected for the first time in Cuba by the end of 1997. This fungus and the mite *Steneotarsonemus spinki* produced serious damage in Pinar del Río and La Habana provinces. Biological and epidemiological studies on this pathogen are very scarce so it is necessary to carry out different biological studies to our *S. oryzae* isolates. Growth and sporulation were assessed on five culture media in order to select the best one. The media studied were: modified Czapeck-Dox Agar, Rice Agar, Sabouraud's Agar, Malt Extract Agar and Potato Dextrose Agar. The micelial growth and sporulation were measured at 3, 6, 9 and 15 days. Colonies were described for every culture media having differences in relation to their color, shape and texture. The best media when assessed at 15 days were Malt Extract Agar reading 51 mm the colony diameter, followed by Czapeck-Dox reading 45 mm and on Sabouraud's Agar colonies reached 41 mm mycelial growth. The sporulation value reached on Sabouraud's Agar was 1.4×10^7 conidia/ml. For the rest of media the sporulation ranged from $1.1-1.4 \times 10^6$ conidia/ml. Czapeck-Dox culture medium was selected as the proper one for growth, sporulation and for diagnostic purpose since orange pigment in colony reverse, appeared when cultured on it.

Key words: *Sarocladium oryzae*, culture media, growth, sporulation

INTRODUCCIÓN

La pudrición de la vaina del arroz causada por el hongo *Sarocladium oryzae* se ha convertido en los últimos años en una enfermedad de gran importancia en diferentes países de Asia, África y América, sobre todo debido a la introducción de variedades semienanas y cultivares de alta producción [Gill y Bonman, 1994]. En Taiwán la presencia de este hongo ha provocado la esterilidad, vaneado y decoloración de la semilla, con pérdidas estimadas entre un 20-60% [Tschen *et al.*, 1997].

En nuestro país se detecta por primera vez en septiembre de 1997, al ocurrir una explosión epidémica de la enfermedad y al mismo tiempo del ácaro *S. spinki*; los que provocaron considerables pérdidas de las cosechas en las provincias de La Habana y Pinar del Río [Sandoval *et al.* 1999].

Los síntomas de la enfermedad aparecen en la fase de maduración y comienzo de la formación de la panícula. Principalmente la infección se observa en la parte superior de la vaina de la hoja que envuelve la panícula

la, y se presentan pequeñas manchas oblongas en la vaina de la hoja bandera, las cuales se alargan hasta formar grandes manchas irregulares, que pueden provocar necrosis de la vaina y el posterior bloqueo en la emergencia de la panícula [Anuradha y Madhiazagan, 2000].

El agente causal presenta conidióforos abundantes, con tres o cuatro fiálides verticiladas, conidios hialinos, lisos, unicelulares, cilíndricos y con extremos redondeados [Brady, 1980; Ou, 1985].

Sobre la biología de este patógeno no se tiene suficiente información, especialmente en nuestro país. Por tal motivo el objetivo fundamental de este trabajo fue seleccionar el medio de cultivo adecuado para el crecimiento, esporulación y conservación de este hongo, y así poder realizar estudios posteriores sobre la biología y epidemiología con nuestros aislamientos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudió el efecto de cinco medios de cultivo sobre el crecimiento y esporulación de *S. oryzae*. Los sustratos evaluados fueron agar papa dextrosa, agar dextrosa de Sabouraud, agar de Czapek-Dox (modificado), agar extracto de malta y agar arroz.

Todos los medios fueron esterilizados en autoclave durante 20 minutos a 1,5 atm, y posteriormente se extendieron en placas petri Anumbra de 9 cm de diámetro.

Para conocer el crecimiento micelial se prepararon placas madres a partir de aislamientos monospóricos del patógeno, las cuales se incubaron a temperatura ambiente durante siete días. Posteriormente se depositó un disco de agar con micelio de 0,5 cm de este cultivo en el centro de cada una de las placas con los cinco medios, sembrando tres placas por cada sustrato. Se determinó el crecimiento radial del patógeno a los tres, seis, nueve, doce y quince días después de la siembra a la temperatura de incubación de 30°C. Se describieron las características morfológicas de las colonias para cada uno de los sustratos.

Para el caso de la esporulación se prepararon erlenmeyers con 40 mL de cada medio de cultivo previamente licuado, y a una temperatura menor de 40°C se le añadió a cada uno 0,1 mL de una suspensión de *S. oryzae* a la concentración de 5×10^6 con/mL. Los erlenmeyers con cada sustrato y la suspensión del patógeno se extendieron en tres placas y se incubaron a 30°C. La frecuencia de evaluación fue la misma que para el crecimiento, determinando la esporulación en el microscopio óptico, mediante conteo de conidios en la cámara de Neuvauer.

Con los datos obtenidos a los quince días, se realizó un análisis de varianza utilizando el test de significación de Newman Keuls.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De manera general se observó que *S. oryzae* es capaz de crecer satisfactoriamente en los diferentes sustratos probados, aunque se caracteriza por tener un crecimiento lento, el cual varía en dependencia de los nutrientes presentes en ellos.

Las características de las colonias se comportan de la siguiente manera en cada medio utilizado:

Agar papa dextrosa: A los tres días las colonias son algodonosas con una coloración blanquecina y ligeramente naranja en el reverso. Pasados seis días se observaron aterciopeladas, con bordes regulares bien definidos y una coloración rosada pálida por ambas partes de la colonia, manteniéndose de esta manera hasta el final de la evaluación.

Agar dextrosa de Sabouraud: Se observaron colonias de textura aterciopelada de color amarillo muy claro con el borde más pálido casi blanco y por el reverso pardo a ocre tostado. Los bordes eran irregulares en forma de concha y se formaron surcos alrededor del centro de la colonia.

Agar Czapek-Dox (modificado): En este medio el hongo desarrolla colonias afieltradas con una coloración rosada que se va intensificando a medida que pasan los días, tomando un color rosado intenso casi naranja por el reverso de la colonia, con bordes filamentosos.

Agar extracto de malta: Las colonias son algodonosas, aunque un poco más ralas en el crecimiento alrededor del ponchete. La coloración por arriba es blanco sucio casi amarillo y por debajo color crema. Los bordes son ligeramente irregulares. En los trabajos realizados por Brady (1980) y Ou (1985) plantean que las colonias de *S. oryzae* en este medio son blancas con un tono azafrañado claro, compactas, algodonosas y con el reverso ocre naranja.

Agar arroz: Colonias de apariencia aterciopeladas, muy ralas. Coloración blanco sucio por encima y por el reverso, con los bordes ligeramente amarillos y angulosos.

En la evaluación realizada a los quince días se comprobó que *S. oryzae* creció más en agar extracto de malta donde alcanzó 51 mm, seguido de agar Czapeck con 45 mm, y 41 mm en agar de Sabouraud (Fig. 1).

El menor crecimiento se obtuvo con el medio agar papa dextrosa con 35 mm, el cual no presentó diferencias significativas con el agar arroz, que alcanzó 39 mm. Estos resultados coinciden con las descripciones realizadas por Shahjaban *et al.* (1977), donde se plantea que el crecimiento de este patógeno es lento en el sustrato de agar papa dextrosa y llega a alcanzar entre 30 a 35 mm de diámetro a los 10 días de incubación a 28°C con textura algodonosa de sus colonias, color blanco a naranja rosado muy claro en el reverso. Este hongo fue

cultivado también en frijol de lima agar; levadura glu-
cosa agar; agar de maíz y levadura-malta agar con buenos registros de esporulación en papa dextrosa agar, sin embargo no describen las características de las colonias sobre estos sustratos.

Debido a estas características de *S. oryzae* en agar papa dextrosa, consideramos que este medio puede ser utilizado para su conservación durante determinados períodos de tiempo, además de ser menos costoso que

otros sustratos evaluados y de utilizarse comúnmente, según López (1999), como un medio de rutina para el trabajo en el laboratorio.

En los estudios realizados sobre la variabilidad de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* llevados a cabo por Rivas y Orihuela (1988) el medio papa dextrosa agar resultó óptimo para el crecimiento y la esporulación del hongo a los siete días, en comparación con agar de Czapeck que fue el menos eficiente.

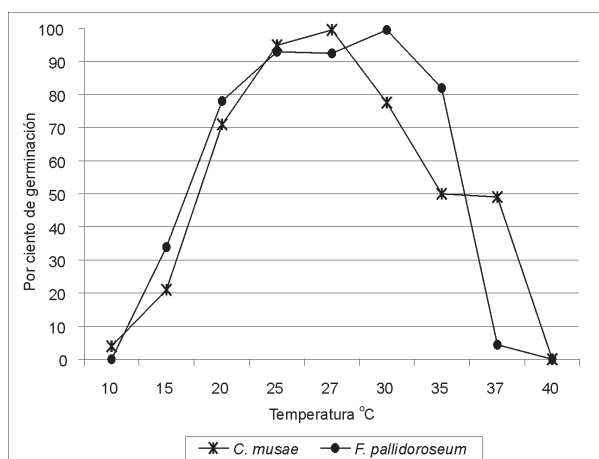


Figura 1. Crecimiento micelial de *S. oryzae* en los cinco medios de cultivo

Sandoval y Méndez (1987) estudiaron la influencia de diferentes sustratos en el crecimiento y esporulación de *Corynespora cassicola* determinando un crecimiento favorable en agar Sabouraud, papa dextrosa agar y Czapeck y la esporulación osciló entre $7-9 \times 10^6$ esporas/mL en estos medios.

En lo referente a la esporulación de *S. oryzae* se obtuvo una mayor concentración en agar de Sabouraud con $1,4 \times 10^7$ con/mL, siendo el único medio que difirió significativamente de los restantes, en los cuales los valores oscilaron entre $1,1 \times 10^6$ y $4,4 \times 10^6$ con/ mL.

Tabla 1. Esporulación de *S. oryzae* en diferentes medios de cultivo

Medios de cultivo	Evaluaciones (días)				
	3	6	9	12	15
PDA	$2,5 \times 10^5$	$4,7 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	2×10^6	$2,6 \times 10^6$ b
SABOURAUD	$0,8 \times 10^5$	$7,3 \times 10^5$	4×10^6	$8,7 \times 10^6$	$1,4 \times 10^7$ a
ARROZ	2×10^4	$2,2 \times 10^5$	$5,8 \times 10^5$	$7,8 \times 10^5$	$1,1 \times 10^6$ b
MALTA	1×10^5	$7,2 \times 10^5$	$1,9 \times 10^6$	2×10^6	3×10^6 b
CZAPECK	$1,5 \times 10^5$	$2,7 \times 10^5$	$1,6 \times 10^6$	$2,4 \times 10^6$	$4,4 \times 10^6$ b

Según Lukens (1963) ciertos medios de cultivo son más favorables para la esporulación de los hongos por tener carbohidratos complejos que frecuentemente son menos adecuados para la producción de hifas vegetativas y más adecuados para la producción de esporas y/o conidios. Los hongos generalmente crecen mejor en un medio rico en carbohidratos, pero si se conservan durante largos períodos de tiempo, la esporulación puede disminuir [CAB, 1983].

En muchas ocasiones la esporulación depende en gran medida del medio empleado. Por ejemplo, para el caso de *Fusarium oxysporum* en agar de arroz, tiene una baja producción de conidios, siendo superior en medio de harina de trigo y papa dextrosa agar [Berton, 1981].

El-Magied *et al.* (1991) utilizó diferentes medios selectivos (agar papa dextrosa, rosa bengala, AFP y agar Czapeck) para el aislamiento e identificación de hongos en arroz y maíz, determinando que agar Czapeck

fue el más adecuado para el crecimiento de estos hongos, incluyendo *S. oryzae*.

Brady *et al.* (1989) en los estudios realizados sobre la fisiología de *S. oryzae* comentan que los aislamientos de diferentes países y hospedantes como arroz y bambú presentan patrones de isoenzimas semejantes, pero existían diferencias en cuanto a la pigmentación del reverso de sus colonias, como son el color amarillo brillante al cultivar los aislamientos en nitrito agar, y otros exhibían color carmelita en nitrato Czapeck.

En nuestro caso particular la presencia del pigmento naranja brillante en este sustrato, tal y como se presenta en las cepas cultivadas en nuestro estudio, constituye un carácter diagnóstico, y por tales razones, a pesar de que el hongo creció más en agar extracto de malta y esporuló en agar de Sabouraud, el medio agar Czapeck fue seleccionado como el adecuado para el crecimiento, esporulación y sobre todo por el carácter diagnóstico, al destacarse la pigmentación naranja en el reverso de la colonia, lo cual facilita la identificación de *S. oryzae*. Esto coincide con López (1999) al plantear que el sustrato utilizado tiene gran influencia en la morfología de los caracteres útiles para el diagnóstico de hongos.

CONCLUSIONES

- El crecimiento de *S. oryzae* resultó lento en los cinco medios de cultivo evaluados.
- El crecimiento micelial fue mayor en agar de malta con 51 mm y la esporulación en agar de Sabouraud con una concentración de $4,4 \times 10$ con/mL.
- De todos los sustratos evaluados el más adecuado para el desarrollo del hongo fue agar de Czapeck por ser representativo de las características de esta especie, además de que el crecimiento y la esporulación fueron aceptables.

REFERENCIAS

- Anuradha, R.; K. Madhiazagan: «Sheath Rot in Rice», The Hindu. Online edition of *India's National Newspaper* on indiaserver.com. Thursday, January 27, 2000.
- Berton, O.: *Etiología da «mancha em reboleira» da soja (Glycine max (L.) Memil)*, Porto Alegre, Mestrado-Facultad de Agronomía/UFRGS, 1981.
- Brady, B. L. K.: «*Sarocladium oryzae*», *CMI Descriptions* No. 673, 1980.
- C.A.B. Commonwealth Mycological Institute: *Plant Pathologist's Pocketbook*, Second Edition, 393, 1983.
- El-Magried, M. A.; A. M. Alian; E. A. Abo-Alla; E. M. Hegazy: «Studies on the Isolation and Identification of Fungi from Corn and Rice Grains on Some Selective Media». *Annals of Agricultural Science (Mosh-tohor)* 29(4): 1521-1535, 1991.
- Gill, M. A.; J. M. Bonman: «An Efficiency Inoculation Technique for *Sarocladium oryzae* Causing Sheath Rot and Its Effect on Rice Plant», *Journal of Agricultural Research (Pakistan)* 32 (3): 325-332, Aug., 1994.
- López, M. O.: «Contribución al estudio y diagnóstico de la microbiota patógena de la caña de azúcar (*Saccharum* sp. híbrida) en Cuba», tesis presentada en opción al grado científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, MINAGRI, INISAV, 1999.
- Lukens, R. J.: «Photo Inhibition of Sporulation in *Alternaria porri*», *American Journal of Botany (Cambridge)* 50 (1-6): 720-724, 1963.
- Ou, S. R.: *Rice Disease*, CAB. International Mycological Institute, Kew Surrey, UK, 1985.
- Rivas, E.; R. Orihuela: «Variabilidad de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides*», *Protección Vegetal* 1: 19-25, 1998.
- Sandoval, Ileana; M. Méndez: «Influencia de diferentes sustratos en el crecimiento y esporulación de *Corynespora cassiicola*», *Cienc. Téc. Agric. Protección de Plantas* 10 (1): 115-120, 1987.
- Sandoval, Ileana; M. O. López; T. Bonilla; Y. Tomás: «Primer registro en Cuba de la pudrición de la vaina del arroz por *Sarocladium oryzae* (Sawada) Gams & Hawk», *Fitosanidad* 3(4): 7-12, 1999.
- Shajaban, A. K.; Z. Harahap; M. C. Rush: «Sheath Rot of Rice Caused by *Acrocyndrium oryzae* in Louisiana», *Plant Diseases Reporter*. 61(4):307-310, 1977.
- Tschen, S-M.J.; L. L. Chen; S-T Hsich; T-S Wu: «Isolation and Phytotoxic Effects of Helvolic Acid from Plant Pathogenic Fungus *Sarocladium oryzae*», *Bot. Bull. Acad. Sin.* 38:251-256, 1997.