

Evaluación de diferentes dosis de Maizina Americana® y sagú (*Maranta sp.*) como agentes gelificantes sobre el crecimiento de *Rhizoctonia solani* Kühn

Evaluation of different doses of Maizina Americana® and sagú (*Maranta sp.*) as gelling agents on the growth of *Rhizoctonia solani* Kühn

Sania HERRERA TOLEDO ¹, Ramón SILVA ACUÑA ² y María Claudia SÁNCHEZ CUEVAS ¹ ✉

¹Clínica Universitaria de Diagnóstico Agrícola (CUDA), Postgrado de Agricultura Tropical, Núcleo Monagas, Universidad de Oriente. Campus Juanico, Maturín, 6201, estado Monagas, Venezuela e ²Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA-Monagas), San Agustín de La Pica, estado Monagas
E-mail: mcsanchez@udo.edu.ve ✉ Autor para correspondencia

Recibido: 21/03/2013 Fin de arbitraje: 23/07/2013 Revisión recibida: 05/10/2013 Aceptado: 11/11/2013

RESUMEN

El incremento de precios de los productos importados, particularmente los insumos de laboratorio, de ellos, el agar, muy común en la preparación de medios de cultivos para el crecimiento de patógenos, impone la búsqueda de alternativas que lo reemplacen. El objetivo fue evaluar la Maizina Americana® y la harina de Sagú (*Maranta sp.*) como agentes solidificantes para sustituir el agar en los medios de papa dextrosa agar (PDA). La maizina se utilizó en dosis de 50, 75, 100 y 125 g.L⁻¹ y el sagú, en dosis de 60, 70, 80 y 90 g.L⁻¹. Se empleó el diseño experimental completamente aleatorizado, cada experimento con cinco tratamientos, cuatro repeticiones y cuatro cápsulas de Petri por unidad experimental; en cada ensayo, se colocó un tratamiento testigo de PDA. Para todas las dosis de maizina y sagú, se utilizó medio litro de la decocción de 200 g de papa y 20 g de sacarosa por litro de medio de cultivo. La evaluación de estos medios se realizó midiendo el crecimiento del hongo *Rhizoctonia solani* a las 24, 48 y 72 horas. De acuerdo con los resultados obtenidos, la dosis de maizina más promisorio resultó ser la de 75 g.L⁻¹ y para el caso del sagú, fue la de 90 g.L⁻¹. Ambos productos pueden ser empleados como agentes solidificantes en los medios de cultivo sustituyendo el agar, con el consecuente beneficio de los costos de preparación y sin efectos negativos sobre el crecimiento de *R. solani*.

Palabras clave: Agentes solidificantes, sustratos, medios de cultivo

ABSTRACT

The increase in prices of imported products, particularly the laboratory supplies, especially agar, very common in the preparation of culture media for the growth of pathogens, imposes the search for alternatives that will replace it. The objective was to evaluate the Maizina Americana® and sagú flour (*Maranta sp.*) as gelling agents to replace the agar in culture medium potato dextrose agar (PDA). The maizina was used at a dose of 50, 75, 100 and 125 g.L⁻¹ and sagú, in doses of 60, 70, 80 and 90 g.L⁻¹. Completely randomized experimental design was employed, each experiment with five treatments and four replicates and four capsules of Petri per experimental unit; a control treatment was placed on each trial with PDA. For all doses of Maizina Americana® and sagú, half a litre of the decoction of 200 g of potato and 20 g of sucrose per litre of culture medium was used. The evaluation of these media was performed by measuring the growth of the fungus *Rhizoctonia solani* at 24, 48 and 72 hours. According to the results obtained, the best maizina dose was 75 g.L⁻¹ and in the case of the sagú, it was 90 g.L⁻¹. Both products can be used as solidifying agent in the culture media replacing the agar, with a consequent benefit of the costs of media preparing and without negative effects on the growth of *R. solani*.

Key words: Gelling agents, substrates, culture media.

INTRODUCCIÓN

Comúnmente se ha empleado el agar como un sistema de soporte para los medios sólidos y semisólidos; sin embargo, es uno de los componentes de mayor costo en la preparación del medio para cultivos *in vitro* fitopatológicos o micológicos. Es una sustancia coloidal desecada, obtenida por cocción de diversas algas rojas, sobre todo de especies de los géneros como: *Gelidium*, *Pterocladia* (ambas de la

familia de Gelidaceae, orden Gelidales) y *Gracilaria* (familia Gracilariaceae, orden Gigartinales). El agar se obtiene en Japón, Corea, África del Sur, en las Costas del Atlántico y de *Gelidium amansii* Lamouroux en el Pacífico de los Estados Unidos. Anualmente se producen unas 6.500 toneladas, de las cuales aproximadamente un tercio proceden de Japón, y del género *Gelidium* se producen alrededor del 35% de la totalidad (Soffia, 2005).

El agar es un compuesto inerte que se usa para solidificar el medio de cultivo. Las concentraciones más utilizadas fluctúan entre 0,6 - 1 %, en las cuales existe una relación directa entre la concentración de agar y la firmeza del medio de cultivo. El valor del pH también afecta la rigidez del medio y dado que a valores bajos (ácidos) se dificulta el proceso de solidificación, es recomendable utilizar un pH próximo a 5,7 (Perea, 1987). Según la FAO (1990), las ventajas de uso del agar en los medios de cultivo son: 1. Con el agua, el agar forma geles que se funden a 100 °C y se solidifican a 45 °C, siendo estable a todas las temperaturas de incubación; 2. No es alterado por las enzimas vegetales; 3. No reacciona con los constituyentes del medio, y 4. No interfiere con la movilización de los constituyentes del medio.

Debido a que el agar es costoso, es importante tomar en cuenta otros compuestos que permitan sustituir este soporte tanto para usos en biotecnología como para estudios de biología de hongos en condiciones controladas (FAO, 1990). Una gran gama de sustancias se ha empleado para sustituir el agar, entre ellas la Agarosa, el Alginato, la Carragenina, el Gelrite®, el Phytigel®, los almidones de plantas y recientemente la goma "Katira" derivada de la corteza de *Cochlospermum religiosum* (L.) Alston, y la goma del "Xanthano" proveniente de la bacteria *Xanthomonas campestris* B-1459 (Roca, 1980; Hennersonn y Kinnersley, 1988; Trigiano y Gray, 2000 y Jain y Babbar, 2006). Posiblemente el más difundido es el Gelrite® (León, 2007).

En concordancia con lo antes planteado, y en estudio realizado por Romay *et al.* (2006) en el cual usaron almidones modificados de yuca como agentes gelificantes en medios de cultivo para micropropagación de yuca, se encontró que uno de los almidones empleados (AIM TF-351) puede sustituir al Phytigel®, ya que no causó ningún efecto sobre la tasa de multiplicación clonal de las plantas, surgiendo como una alternativa económica, de fácil manejo y disponibilidad. Los autores también señalan que presenta limitaciones de uso por no ser traslúcido y porque al final del periodo de crecimiento la consistencia del medio se hace muy viscosa, aunque el almidón de yuca sea ocho veces menor en costo en relación al Phytigel® y 15 veces menos que el agar (León, 2007).

Para los medios de cultivos con explantes de fresa, León (2007) señaló que al emplear los almidones AIM TF-351, AIM TF-352 y AIM TF-212 y agar como tratamiento testigo, los resultados

obtenidos indican que estadísticamente los almidones y el agar fueron similares en cuanto al número de hojas, pero diferentes en cuanto al número de brotes a los 35 días en multiplicación, cuando el agar los superó. El almidón AIM TF-352 fue el que permitió la mayor tasa de multiplicación.

Para el caso de medios de cultivo en los cuales se realizan estudios de aislamiento, conservación y de patogenicidad de hongos fitopatógenos y para los cuales se sustituyó el agar por otros agentes gelificantes, la información bibliográfica es limitada. Ante lo expuesto y considerar la ventaja que pueden representar los almidones o alimentos formulados que lo poseen en su composición, esta investigación tuvo por objetivo evaluar dosis de Maizina Americana® y de Sagú como agentes solidificantes, para sustituir el agar en los medios de papa dextrosa agar (PDA).

MATERIALES Y MÉTODOS

Los experimentos se realizaron en la Clínica Universitaria de Diagnóstico Agrícola (CUDA) del Postgrado de Agricultura Tropical de la Universidad de Oriente, Campus Juanico, en Maturín, estado Monagas, Venezuela. En condiciones de laboratorio, las placas fueron incubadas bajo condiciones controladas de luz y temperatura (12 h luz/ 12 h oscuridad, a 28 °C).

Preparación de los medios de cultivo

La preparación de los medios se realizó de acuerdo con el siguiente procedimiento: en un cilindro se colocó el ½ litro de agua de la decocción de 200 g de papa, el cual había sido previamente tamizado. Este volumen fue transferido a un erlenmeyer de 2 L, para agregarle los 20 g de dextrosa y cada una de las dosis evaluadas de Maizina Americana® y Sagú de acuerdo a cada tratamiento, en cada uno de los experimentos, mantenido sobre agitación constante y a la temperatura de 100 °C en calentador-agitador Orbital PC-351, donde el volumen final se ajustó a un litro. Los tratamientos fueron vertidos a razón de 20 mL.capsula Petri⁻¹ y colocadas en envases porta placas, esterilizadas en autoclave MARKET FORGE, por 15 min, a 15 psi y 121 °C. Para cada uno de los ensayos se colocó un tratamiento testigo con PDA.

Tratamientos, diseño experimental y cuantificación del crecimiento micelial

La maizina, obtenida del producto comercial, Maizina Americana® de Alfonso Rivas & Cía como

agente endurecedor, se valoró en dosis de 50, 75, 100 y 125 g.L⁻¹ la cual, de acuerdo a la descripción de su empaque comercial contiene fécula de maíz, tiamina, riboflavina, niacina y hierro; y la harina de sagú, obtenida del tubérculo de *Maranta* sp., producida artesanalmente en el estado Sucre, Venezuela, compuesta por 20,54% de amilosa y 79,46% de amilopectina, que genera una pasta opaca y resistente a la retrogradación (Valdés *et al.* 2010), se evaluó en las dosis de 60, 70, 80 y 90 g.L⁻¹. Para todas las dosis se utilizó como tratamiento testigo 15 g de agar, ½ litro de la decocción de los 200 g de papa y 20 g de sacarosa. L⁻¹ de medio de cultivo PDA.

El aislamiento de *Rhizoctonia solani* empleado proviene de la Micoteca de la Clínica Universitaria de Diagnóstico Agrícola, del Postgrado de Agricultura Tropical de la Universidad de Oriente, Núcleo Monagas, aislado de plántulas de café en fase de fosforitos, obtenidos en la Finca “Las Acacias” de la Universidad de Oriente en Caripe, Monagas y mantenido sobre PDA.

Para cada experimento, se empleó el diseño experimental completamente aleatorizado, con cinco tratamientos, cuatro repeticiones y la unidad experimental constituida por cuatro cápsulas de Petri. Se midió el diámetro del crecimiento micelial y sus valores se ajustaron al área respectiva en cada placa de Petri. Los valores promedios de área colonizada por *R. solani*, sobre las capsulas de Petri, fueron examinadas estadísticamente por medio de análisis de varianza, cuantificada a las 24, 48 y 72 horas después de la siembra del aislamiento proveniente de cultivos puros obtenidos sobre PDA y los valores promedios de la mediciones, fueron comparados por la prueba de Tukey a 5 % de probabilidad (Steel y Torrie 1985).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Ensayo con maizina

De manera general, se constató en la evaluación realizada a las 24 horas después de la siembra del aislamiento de *R. solani*, que en todos los medios con las diferentes dosis de maizina las áreas de crecimiento micelial de las colonias fúngicas fueron menores a la observada en el medio con PDA; caso similar se observó a las 48 y 72 horas de crecimiento. Particular comportamiento presentó el tratamiento con la dosis de 50 g.L⁻¹ de maizina, para la cual se observó la menor área de crecimiento radial del hongo ya que la consistencia del medio era muy blanda; caso contrario, se observó en las otras dosis

evaluadas de maizina, donde hubo mayor consistencia. En la medida que se aumentaron las cantidades del solidificante, similar a la consistencia del agar, el desarrollo de la colonia fue más profuso.

Para el análisis de varianza (Cuadro 1) se constató diferencias entre tratamientos en las tres cuantificaciones del área colonizada por el hongo en la cápsula de Petri.

A las 24 horas de evaluación (Cuadro 2), se evidenció mayor crecimiento radial de *R. solani* en el testigo, aunque estadísticamente fueron similares a las dosis mas altas de maizina por la prueba de Tukey a 5 % de probabilidad, apenas difiere del tratamiento con 50 g.L⁻¹ que presentó la menor área de crecimiento del aislamiento de *R. solani*. De acuerdo a los coeficientes de variación se puede visualizar que en la primera evaluación existe mayor variabilidad que podría ser interpretada como la adaptación del hongo al medio de cultivo y particularmente, debido a la falta de crecimiento constatada en el tratamiento con la menor dosis que no solidificó de forma efectiva el medio de cultivo; sin embargo, al ocurrir las evaluaciones a las 48 y 72 horas la variabilidad se hace cada vez menor, lo que indicaría adaptación de *R. solani*, a la condición de cultivo, por lo tanto un crecimiento mas uniforme en el soporte de cultivo de *R. solani*

En relación con la evaluación realizada a las 48 horas (Cuadro 2) después de la siembra del aislamiento de *R. solani*, se constató que el tratamiento con PDA mantiene el mayor crecimiento y estadísticamente fue similar al tratamiento con la dosis de 75 g.L⁻¹; los tratamientos con las dosis de 125 g.L⁻¹ y 100 g.L⁻¹ presentaron valores intermedios de crecimiento radial y estadísticamente similares. La menor dosis de maizina mantuvo la menor área de crecimiento y difiere estadísticamente de todos los demás. Para el caso de la evaluación a las 72 horas (Cuadro 2), los tratamientos PDA, 125 g.L⁻¹ y 75 g.L⁻¹

Cuadro 1. Análisis de varianza del diámetro de la colonia (cm²) a las 24, 48 y 72 horas después de la siembra en los medios de cultivo con las dosis de maizina.

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados Medios		
		24	48	72
Tratamientos	4	27,58**	783,33**	953,74**
Error	15	3,84	27,60	32,24
CV (%)		23,16	17,11	14,09

CV: Coeficiente de variación y ** Significativo por la prueba de F a 1% de probabilidad.

presentaron la mayor área colonizada y estadísticamente difieren de la dosis de 100 g.L⁻¹ de maizina que mostró un diámetro intermedio de crecimiento. La dosis de maizina a 50 g.L⁻¹ presentó la menor área de crecimiento radial y su valor difiere estadísticamente de los demás tratamientos. Tanto a las 24, 48 y 72 horas de transcurrido el crecimiento radial del aislamiento de *R. solani*, la dosis de 75 g.L⁻¹ mantiene similitud estadística con el testigo,

Ensayo con sagú

Se observó, en la evaluación realizada a las 24 horas después de la siembra de *R. solani*, que en todos los tratamientos con las diferentes dosis de sagú y el tratamiento testigo con PDA, la mayor área de crecimiento la presentó el tratamiento con la dosis de 90 g.L⁻¹, caso contrario se observó a las 48 y 72 horas, cuando la mayor área de crecimiento la presentó el medio con PDA. Particular comportamiento mostró el tratamiento con la dosis de 80 g.L⁻¹, el cual a las 24 horas obtuvo un valor intermedio en relación a los otros tratamientos y a las 48 y 72 horas presentó la menor área de crecimiento del hongo en relación con los demás tratamientos de sagú. Para el análisis de varianza (Cuadro 3) sólo se observó diferencias significativas para las evaluaciones a las 48 y 72 h.

Para este experimento (Cuadro 3) se ratifica lo planteado en relación a los coeficientes de variación del experimento empleando la maizina (Cuadro 1). Se observa disminución de la variabilidad de la área de crecimiento micelial, en la medida que avanza el crecimiento de *R. solani* en el medio de cultivo con la inclusión de la harina de sagú como agente

Cuadro 2. Valores promedios para las áreas de crecimiento (cm²) del aislamiento de *Rhizoctonia solani* en la diferentes dosis de maizina y papa dextrosa agar (PDA).

Tratamientos	Áreas de crecimiento de <i>R. solani</i> (h)		
	24	48	72
Maizina a 50 g.L ⁻¹	4,05 b	12,07 d	16,9 0 c
Maizina a 75 g.L ⁻¹	9,30 a	38,17 ab	50,16 a
Maizina a 100 g.L ⁻¹	9,04 a	23,53 c	32,23 b
Maizina a 125 g.L ⁻¹	8,95 a	30,91 bc	48,55 a
PDA [†]	10,95 a	48,84 a	53,60 a

[†] Medio de cultivo constituido de 200 g de papa, 15 g de agar y 20 g de sacarosa.L⁻¹ de agua y para el medio de cultivo empleando la maizina la cual sustituyó al agar en cada una de las dosis indicadas. Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey a 5% de probabilidad.

solidificante. Este comportamiento indica más uniformidad en el crecimiento de las colonias del aislamiento estudiado.

Con relación a la evaluación realizada a las 48 y 72 horas (Cuadro 4), después de la siembra del aislamiento de *R. solani*, se observó que el tratamiento con PDA presentó el mayor crecimiento y fue estadísticamente similar al tratamiento con la dosis de 90 g.L⁻¹ de sagú. El tratamiento con la dosis de 70 g.L⁻¹ presentó un valor intermedio de crecimiento radial y los tratamientos con las dosis de 60 g.L⁻¹ y 80 g.L⁻¹ de sagú, respectivamente, mantienen las menores áreas de crecimiento y son estadísticamente similares.

La dosis de 90 g.L⁻¹, presenta similitud estadística con el tratamiento testigo con PDA, tanto a las 48 como a las 72 horas, lo que hace promisor su empleo como sustituto al PDA, para el crecimiento del aislamiento de *R. solani*.

Cuadro 3. Análisis de varianza del diámetro de la colonia (cm²) a las 24, 48 y 72 horas después de la siembra en los medios de cultivo con las dosis de la harina de sagú y el papa dextrosa agar (PDA).

Fuente de variación	Grados de libertad	Cuadrados Medios		
		24	48	72
Tratamientos	4	1,77 ^{ns}	962,30**	1006,84**
Error	15	0,88	11,11	19,02
CV (%)		23,39	12,88	12,66

CV: Coeficiente de variación. ^{ns} No significativo ** y significativo a 1% de probabilidad por la prueba de F.

Cuadro 4. Valores promedios para las áreas de crecimiento (cm²) del aislamiento de *Rhizoctonia solani* con las diferentes dosis de harina de sagú y PDA

Tratamientos	Áreas de crecimiento de <i>R. solani</i> (h)	
	48	72
Sagú a 60 g.L ⁻¹	11,23 c	21,34 c
Sagú a 70 g.L ⁻¹	30,19 b	37,66 b
Sagú a 80 g.L ⁻¹	8,11 c	14,92 c
Sagú a 90 g.L ⁻¹	36,90 a	46,79 a
PDA [†]	42,96 a	51,51 a

[†] Medio de cultivo constituido de 200 g de papa, 15 g de agar y 20 g de Sacarosa.L⁻¹ de agua y para el medio de cultivo empleando la harina de sagú la cual sustituyó al agar en cada una de las dosis indicadas. Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes de acuerdo a la prueba de Tukey a 5% de probabilidad.

Los resultados de esta investigación abren una nueva opción de uso de los almidones en los laboratorios y, en este caso, en el de fitopatología, donde el empleo de agar es de rutina para la preparación de medios de cultivo. La potencialidad de los almidones por su inocuidad, vista su importancia en la industria de alimentos (Agroindustria Mandioca, 2006), ahora pueden ser utilizados en el aislamiento, conservación y estudios de patogenicidad de hongos fitopatógenos. Los resultados obtenidos por Romay *et al.*, (2006) y León (2007), se ratifican en esta investigación; particularmente, la fécula del maíz y la de sagú que también son almidones o sus derivados, pueden ser empleados en condiciones de laboratorio para la gelificación de medios de cultivos que sirven de sustratos para el estudio de biología de patógenos en condiciones controladas.

En este experimento donde se introdujeron agentes solidificantes como la Maizina Americana® y la harina de sagú que son alimentos para humanos y que particularmente para la maizina se indica poseer aminoácidos y hierro en su composición nutricional, podría ocurrir que estos elementos estén involucrados en la variabilidad estadística tolerable, observada en el experimento, particularmente si ellos intervienen en la fisiología del patógeno. Estas observaciones no están descritas en la literatura para estas féculas y que por primera vez se relatan como solidificantes de medio de cultivo en condiciones de laboratorio, específicamente de fitopatología de enfermedades de plantas; sin embargo, los resultados obtenidos ratifican la potencialidad de uso de estos solidificantes con ventajas competitivas importantes sobre el agar.

El uso de almidones ha sido de ampliamente discutido en la industria de alimentos (Pastelería Vegana, 2012) donde se han empleado como espesantes y solidificantes, particularmente, para el caso de la maizina que posee alto contenido de almidón y de manera similar como ocurre con el sagú, los hace potencialmente ingredientes de alto valor agregado para formar parte de medios de cultivo como agentes gelificantes y donde no es afectado el desarrollo de la colonia fúngica.

CONCLUSIONES

Tanto la maizina como la harina de sagú pueden ser empleadas como agentes solidificantes en los medios de cultivo sustituyendo al agar. Se debe emplear las dosis de 75 g.L⁻¹ de Maizina Americana® ó 90 g.L⁻¹ de la harina de sagú, en mezcla con la dextrosa y la decocción de papa utilizada en la preparación del medio de cultivo.

LITERATURA CITADA

- Agroindustria Mandioca C. A. 2006. Productos y servicios. Disponible en: <http://mandioca.com.ve>. Octubre del 2006).
- Food and Agriculture Organization (FAO). 1990. Fundamentos teórico-prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Estudio FAO producción y protección vegetal. No. 105, Roma, Italia. p. 15-94.
- Hennderson, W. E. and P. Kinnersley. 1988. Corn starch as an alternative gelling agent for plant tissue culture. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 15: 17-22.
- Jain, N. and S. Babbar. 2006. Xantham gum-and economical substitute for agar in plant tissue culture media. *Plant Cell Rep.* 25: 81-84.
- León B., L. M. I. 2007. Uso del almidón de yuca como sustituto económico del agar en medio de cultivo para el crecimiento *in vitro* de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivar Chandler. Trabajo de Grado para Ingeniero Agrónomo, Universidad de Oriente, Venezuela. 112 p.
- La Pastelería Vegana. 2012. Almidones, espesantes y gelatinizantes. Capítulo VIII. Abril 2012. Disponible en: <http://vegonizando.wordpress.com>. (04/2012).
- Perea, M. 1987. Cultivos de tejidos vegetales y sus aplicaciones en la agricultura. Universidad de Oriente, Organismo de Energía Atómica. Maturín, Monagas, Venezuela
- Roca, W. 1980. El cultivo de meristemas de yuca. Guía de estudios. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia. p. 1-40.
- Romay, G.; J. Matheus, A. Gerstl, R. Rueda y M. Santana. 2006. Almidón modificado de yuca como sustituto económico del agente solidificante para medios de cultivo de tejidos vegetales. *Interciencia* 31(9): 686-689.
- Soffia, V. 2005. Utilización de biofungicida Serenade® en el control de enfermedades de importancia económica en frutales. Santiago, Chile, Facultad de Ciencias Agronómicas, Universidad de Chile. http://mazinger.sisib.uchile.cl/repositorio/lb/ciencias_agronomicas/montealegre_j/5.html.
- Steel, R. y J. Torrie. 1985. Bioestadística: principios y procedimientos. McGraw Hill. Bogotá. 102 p.
- Trigiano, R. N. y D. J. Gray. 2000. Plants tissue culture. Concepts and laboratory exercises. RCP Press, Washington, United States of America. 454 p.
- Valdés, R. M. P.; G. S. Ortiz y T. Sánchez. 2010. Morfología de la planta y características de rendimiento y calidad de almidón sagú. *Acta Agronómica* 59 (3): 372-380.