

ALTERNATIVAS SUSTENTABLES PARA EL CONTROL DEL MANCHADO DEL GRANO/SEMILLA EN ARROZ

Bedoya Castañeda D¹, Pinciroli M.², Bezus R.³, Sisterna M¹.

Palabras clave: micoflora, biocontrol, *Chaetomium*, *Trichoderma*

INTRODUCCIÓN

A nivel mundial, el manchado del grano de arroz se presenta en la mayor parte de las regiones de producción. Se han identificado alrededor de 50 géneros fúngicos responsables del deterioro interno o externo del grano. Para el control de las enfermedades de semillas, el método más frecuentemente utilizado es el tratamiento con fungicidas (MEW y MISRA, 1994), pero el uso continuo e indiscriminado de estas sustancias puede conducir a la aparición de formas resistentes de los patógenos, además de afectar al ambiente y al hombre.

En arroz, hay referencias de *Trichoderma* spp. como biocontrolador frente a patógenos fúngicos y específicamente a patógenos transmitidos por semilla (HALGEKAR *et al.*, 2014). Algunos investigadores (PÉREZ *et al.*, 2013) han observado que *in vitro* hay cepas de *T. harzianum* que manifiestan los mecanismos de acción de competencia por el sustrato, micoparasitismo y antibiosis sobre los aislados de los fitopatógenos fúngicos del arroz *Bipolaris oryzae* y *Sarocladium oryzae*. Khalili *et al.* (2012) observaron que 2 cepas de *T. harzianum* controlaron *B. oryzae* y una cepa de *T. atroviride* favoreció la germinación de las semillas de arroz. Manimegalai *et al.* (2011) encontraron que *T. harzianum*, aislada de suelo, produce inhibición de *Bipolaris oryzae*. Paralelamente existen antecedentes con resultados promisorios en el empleo de *Chaetomium* spp. como agente biocontrolador. Es uno de los más numerosos géneros de ascomicetes saprófitos, con más de 300 especies en todo el mundo. Al igual que *Trichoderma*, activan varios mecanismos como competencia por el espacio y los nutrientes, por lo que estimulan el crecimiento de las plantas y/o disparan los mecanismos de defensa de las mismas. Según estudios realizados por Soyong (2014) las especies *C. cupreum* y *C. globosum* resultaron antagonistas de *Pyricularia oryzae*, la enfermedad más dañina de este cultivo. Tongon y Soyong (2015) han observado que cepas de *C. globosum* y *C. cochliodes* inhibieron a *Curvularia lunata* que causa la mancha marrón (brown leaf spot) en arroz.

Por otro lado, se ha señalado el efecto positivo que tiene el extracto de ajo (*Allium sativum*; Fam. Liliaceas) como antioxidante, antibacteriano, antifúngico, y antiparasitario. Ha sido citada su acción fungicida sobre numerosas especies de hongos: *Penicillium* spp.; *Aspergillus* spp.; *Fusarium* spp.; *Alternaria* spp.; *Colletotrichum* spp.; *Pythium* spp.; *Rhizoctonia* spp., entre otras. Estas cualidades son atribuidas a que el ajo posee sustancias azufradas bioactivas como la alicina y alil-sulfuros. Con referencia al arroz, se citan pruebas de laboratorio *in vitro* con inhibición del crecimiento micelial para *Curvularia lunata* y sobre *Bipolaris oryzae*.

El objetivo fue evaluar la capacidad antagonica de diferentes aislamientos de *Chaetomium* spp. y *Trichoderma* spp. y el efecto del extracto vegetal (*Allium* spp.) en la micoflora asociada al manchado del grano/semilla de arroz.

¹ Ingeniera agrónoma, Centro de Investigaciones de Fitopatología – Comisión de Investigaciones Científicas de la Prov. Bs. As. (CIDEFI-CICPBA); Facultad de Cs. Agr. y F. de la Universidad Nacional de La Plata 60 y 119, CP. 1900 La Plata, Buenos Aires, Argentina e-mail: mnsisterna@gmail.com

² Doctora, Cátedra de Climatología y Fenología Agrícola, (mpinciroli@agro.unlp.edu.ar)

³ Ingeniero agrónomo, Cátedra de Mejoramiento Genético Vegetal (bezus@agro.unlp.edu.ar)

MATERIALES Y MÉTODOS

Se analizaron muestras de granos de arroz de los genotipos Yerua y H419 procedentes de tres localidades argentinas: La Plata (Prov. Buenos Aires), Villa Elisa y Urdinarrain (Prov. Entre Ríos). Se calculó la incidencia como porcentaje de granos manchados. Los hongos patógenos se aislaron a partir de los granos/semillas de arroz (manchados y no manchados), mediante el método del agar, según normas impartidas por la International Seed Testing Association (ISTA) (NEERGAARD, 1979), y se incubaron en cámara de cría climatizada ($21 \pm 1^\circ\text{C}$; 75% HR; 12hs de luz + UV/12hs de oscuridad). Se seleccionaron aquellos hongos más representativos para la enfermedad y con mayor potencial de daño en planta: *Curvularia lunata*, *Bipolaris oryzae* y *Fusarium graminearum*. Las tres especies fueron determinadas mediante técnicas de extracción de ADN genómico basadas en el CTAB. Los tratamientos de biocontrol fueron: **a)** 7 cepas de *Trichoderma* del CIDEFI (T2, T3, T4, T7, T8, T9, T10), **b)** 7 cepas de *Chaetomium* (C1, C3 y C4 provenientes de aislamientos de plantas de arroz y C2, C5, C6, C7 pertenecientes a aislamientos del CIDEFI en plantas de cebada), y **c)** 3 concentraciones de extracto acuoso de ajo incorporado en APG fundido y enfriado a una temperatura de 25-30 °C previa desinfección con hipoclorito de sodio al 5%.

El potencial antagónico de las cepas de *Trichoderma* y *Chaetomium* se evaluó con la técnica del cultivo dual (DAL BELLO *et al.*, 1994). Se colocaron dos discos de 5 mm de diámetro del patógeno y de los antagonistas, extraídos con un sacabocado, dentro de cajas de Petri conteniendo 9 ml de APG y distanciados 4 cm uno del otro. Se incubaron en estufa a 25°C por 6 días. El porcentaje de inhibición micelial (MGI) se calculó según la fórmula:

$$\text{MGI (\%)} = (\text{MGC} - \text{MGT}) / \text{MGC} \times 100$$

Donde, MGC= longitud media del crecimiento micelial testigo y MGT= longitud media del crecimiento micelial frente al patógeno.

Con los datos obtenidos se realizó un Análisis de la Varianza (ANOVA), en los ensayos de cultivos duales y crecimiento micelial, para cada uno de los patógenos evaluados. Las medias se compararon por el test de Duncan ($p < 0,05$). Se realizaron 6 repeticiones por muestra/tratamiento con sus respectivos testigos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el fin de caracterizar las diferentes muestras de grano se determinó la **incidencia** en los dos genotipos y las tres localidades. Las muestras de Yerua FA presentaron valores de 50,0; 18,7 y 35,0 % en La Plata, Villa Elisa y Urdinarrain y las de H419-12-1-1-1 valores de 32,0; 13,7 y 21,7 % en las mismas localidades respectivamente.

La **presencia** fúngica en orden de abundancia creciente promedio de todas las muestras (2 genotipos y 3 localidades) resultó *Alternaria* con un 41,3% de semillas infectadas, *Nigrospora* (26,6%), *Epicoccum* (12,2%), *Fusarium* (8,0%), *Curvularia* (0,9%), *Cladosporium* (0,7%), *Bipolaris* (0,3%), y *Exserohilum* (0,1%).

De este análisis preliminar se seleccionó la variedad Yerua de La Plata por ser la de mayor incidencia y los patógenos elegidos fueron: *Curvularia lunata*, *Bipolaris oryzae* y *Fusarium graminearum*.

En la Tabla 1 se puede observar el porcentaje de inhibición micelial de las 7 cepas de *Trichoderma*. La cepa T3 presentó la mayor capacidad de inhibición frente a la especie *Curvularia lunata*, le sigue T2, T9 y el resto de las cepas no se diferenciaron entre sí; los valores oscilaron entre 7,2 y 25,7 %. La capacidad de inhibición frente a la *Bipolaris oryzae* fue máxima en la cepa T2

mientras que frente a *Fusarium graminearum* se observó alta capacidad de inhibición en las cepas T2, T3, T4, T7, T8, menor en T10 y mínima en T9 (Tabla 1). Analizando la inhibición en los tres géneros de patógenos evaluados, las cepas con mejor comportamiento resultaron ser T2 y T3 con valores de 23,5 y 20,8 % de MGI respectivamente. PÉREZ *et al.*, (2013) registraron porcentajes de inhibición de 64,4% y 67,1% de *Trichoderma harzianum* frente a aislados de las especies *Bipolaris oryzae* y *Sarocladium oryzae* respectivamente.

En la Tabla 2 se presentan los valores de MGI de cepas de *Chaetomium* frente a *Curvularia lunata*, *Bipolaris oryzae* y *Fusarium graminearum*. La cepa C1 presentó mayor capacidad de inhibición frente a *Curvularia lunata*, la menor resultó C5. Frente a *Bipolaris oryzae*, las de mejor comportamiento resultaron C4 y C1, mientras que frente a *Fusarium graminearum* mejores resultaron C4, C2, C1 y C6.

Tabla 1. Valores medios de porcentaje de inhibición miceliar (MGI) de 7 cepas del genero antagonista *Trichoderma* spp. frente a los patógenos *Curvularia lunata*, *Bipolaris oryzae*, y *Fusarium graminearum* en cultivos duales

Cepa	<i>Curvularia lunata</i>	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	Promedio
T2	19,60 b	27,50 a	23,36 a	23,49 a
T3	25,69 a	12,30 bc	24,50 a	20,83 a
T4	11,72 cd	14,40 b	22,43 a	16,18 b
T7	10,06 cd	6,73 cd	23,78 a	13,52 bc
T8	8,40 cd	8,54 cd	22,95 a	13,30 bc
T9	14,48 bc	6,17 d	14,90 c	11,85 c
T10	7,15 d	10,77 bcd	19,75 b	12,56 c

Letras distintas en las columnas expresan diferencias significativas (Duncan, p<0,05).

Tabla 2. Valores medios de porcentaje de inhibición miceliar (MGI) de 7 cepas del genero antagonista *Chaetomium* spp. frente a los patógenos *Curvularia lunata*, *Bipolaris oryzae*, y *Fusarium graminearum* en cultivos duales

Cepa	<i>Curvularia lunata</i>	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	Promedio
C1	34,50 a	39,26 ab	25,49 a	33,10 a
C2	11,51 de	21,32 c	26,08 a	19,65 cd
C3	16,11 cd	32,26 b	8,53 c	18,98 cd
C4	27,95 b	42,01 a	27,35 a	32,47a
C5	7,19 e	23,43 c	19,61 b	16,78 d
C6	17,92 c	21,60 c	24,80 a	21,45 c
C7	26,84 b	32,08 b	22,94 ab	27,32 b

Letras distintas en las columnas expresan diferencias significativas (Duncan, p<0,05).

Si analizamos la capacidad promedio de inhibición de *Chaetomium* sp. frente a las tres especies patógenas estudiadas, los valores fueron máximos y no se observaron diferencias entre C1 y C4, ambas provenientes de aislamientos propios de arroz, con valores de 33,1 y 32,5% respectivamente (Tabla 2).

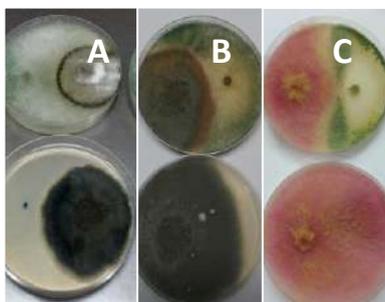


Figura 1. Cultivos duales de *Trichoderma* spp. frente a *Curvularia lunata* (A), *Bipolaris oryzae*, (B) y *Fusarium graminearum* (C) en cultivos duales.

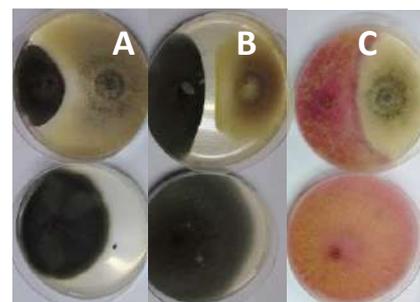


Figura 2. Cultivos duales de *Chaetomium* spp. frente a *Curvularia lunata* (A), *Bipolaris oryzae* (B) y *Fusarium graminearum* (C) en cultivos duales.

Al analizar el efecto de biocontrol del producto natural estudiado, el extracto de ajo, se observó una respuesta diferencial sobre los hongos patógenos. *Fusarium graminearum* resultó más sensible, inhibiendo su crecimiento a partir de una concentración del extracto de 10%, mientras *Curvularia lunata* y *Bipolaris oryzae* lo hicieron a partir del 15% (Tabla 3).

Tabla 3. Valores medios de MGI de *Curvularia lunata*, *Bipolaris oryzae*, y *Fusarium graminearum* en APG con distintas concentraciones de extracto de ajo

Concentración (%)	<i>Curvularia lunata</i>	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	Promedio
10	54,31 b	47,18b	94,44a	70,06b
15	94,06 a	89,94a	94,44a	92,65a
20	93,56 a	89,94a	94,44a	92,82a

Letras distintas en las columnas expresan diferencias significativas (Duncan, $p < 0,05$).

CONCLUSIONES

Si bien la mayor inhibición de crecimiento micelial correspondió a las cepas T2 y T3 de *Trichoderma* spp. y C1 y C4 de *Chaetomium* todas las cepas evaluadas podrían producir un efecto control sobre los patógenos evaluados: *Curvularia lunata*, *Bipolaris oryzae*, y *Fusarium graminearum* en semillas de arroz. Asimismo los resultados permiten confirmar el efecto biocontrolador del extracto natural de ajo sobre hongos patógenos de manchado de arroz. Esta investigación avala la posibilidad de un control alternativo que podría representar un avance para disminuir la propagación de enfermedades a través de las semillas, así como para obtener un alimento de mejor calidad a partir del grano.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- DAL BELLO, G.M.; MÓNACO, C.I.; SISTERNA, M.N. Efecto de *Trichoderma* spp. sobre el control del tizón de la plántula en trigo ocasionada por *Bipolaris sorokiniana*. *Fitopatologia Brasileira*, 19 (3), 394-400, 1994.
- HALGEKAR, N. Y.; GIRI, G. K.; ASHWINI, C. Efficacy of bioagents against seed borne fungi of rice. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*, 5 (3), 157-158, 2014.
- KHALILI, E.; SADRAVI, M.; NAEIMI, S.; KHOSRAVI, V. Biological control of rice brown spot with native isolates of three *Trichoderma* species. *Brazilian Journal of Microbiology*, 43 (1), 297-305, 2012.
- MANIMEGALAI, V.; AMBIKAPATHY, V.; PANNEERSELVAM, A. Biological control of paddy brown spot caused by *Bipolaris Oryzae* (Breda de Haan). *European Journal of Experimental Biology*, 1 (4), 24-28, 2011.
- MEW, T.W.; MISRA, J. K. Eds. *A Manual of Rice Seed Health Testing*. IRRI International Rice Research Institute, 113 p. Manila, Philippines, 1994.
- NEERGAARD, P. *Seed Pathology*, Revised Edition, London, Mac Millan Press, I and II, 1191, 1979.
- PÉREZ TORRES, E.J.; MILANÉS VIRELLES, P.; BERNAL CABRERA, A.; LEIVA MORA, M.; GARCÍA RIVERO, G.; LOBATO CAISA, L.P.; CAÑAR AGUIRRE, L.M.; SIERRA REYES, Y.; MENA CASTRO, O. "In vitro" antagonism of *Trichoderma harzianum* against *Bipolaris oryzae* and *Sarocladium oryzae* isolated from Camagüey. *Centro Agrícola*, 40 (3), 29-36, 2013
- SOYTONG, K. Bio-Formulation of *Chaetomium cochliodes* for Controlling Brown Leaf Spot of Rice. *International Journal of Agricultural Technology*, 10 (2), 321-337, 2014.
- TONGON, R.; SOYTONG, K. Application of nano-particles from *Chaetomium globosum* to control leaf spot of rice. *Journal of Agricultural Technology*, 11 (8), 1919-1926, 2015.