

Búsqueda de métodos alternativos para el control de *Pyricularia oryzae* Cavara

F. Sempere, M.P Santamarina (Departamento de Ecosistemas Agroforestales. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universitat Politècnica de València. Valencia. E-mail: frasemfe@yahoo.es).

Se investigó *in vitro* la especie *Trichoderma harzianum* como posible agente de control biológico de *Pyricularia oryzae*. El experimento se realizó en distintas condiciones medioambientales. Los mecanismos desarrollados sinérgicamente por *Trichoderma harzianum* para antagonizar al patógeno fueron competencia por el espacio y nutrientes y micoparasitismo.

INTRODUCCIÓN

Pyricularia oryzae Cavara (telemorfo: Magnaporthe grisea (Hebert) Barr.) es el principal patógeno del arroz produciendo pérdidas muy importantes en el cultivo. Este hongo filamentosos es el agente causal de la Pyriculariosis.

El estudio de nuevos métodos alternativos a los fungicidas para su control constituye un campo prometedor sobre el que queda mucho que investigar. Una de estas alternativas es el control biológico que incluye estrategias y métodos para controlar las enfermedades a través de la actividad de organismos vivos distintos del hombre (SEMPERE y col., 2005)

Los hongos como agentes de control biológico juegan un papel muy importante en este sentido. Dentro de estos, la especie *Trichoderma harzianum* ha sido aplicada con éxito para el control de diferentes patógenos en distintos cultivos. En el arroz, estudios preliminares han demostrado su eficiencia frente a especies como *Alternaria alternata*, *Nigrospora oryzae*, *Fusarium culmorum* y *Fusarium verticillioides* (SEMPERE y SANTAMARINA, 2006b; 2008; 2009; 2010).

El objetivo de este estudio fue realizar una investigación en condiciones *in vitro* para determinar si *Trichoderma harzianum* actúa como agente de control biológico de *Pyricularia oryzae*.

Materiales y métodos

Aislados fúngicos

Las cepa *Pyricularia oryzae* cedida por el Instituto Valenciano de Investigaciones Agrarias, fue aislada de material vegetal de arroz procedente de las principales zonas productoras de la provincia de Valencia.

Trichoderma harzianum CECT 20736 fue cedida por la colección de la Unidad Docente de Ecología y Botánica del Departamento de Ecosistemas Agroforestales de la Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural.

Medios de cultivo

Inicialmente, se utilizó Patata Dextrosa Agar (PDA) para la recuperación de las especies liofilizadas. Las cepas se sembraron en este medio y se incubaron a 25°C durante 5 días.

Posteriormente se extrajeron discos de 8 mm de diámetro de la periferia de las colonias de *T. harzianum* y *P. oryzae* y se transfirieron en condiciones asépticas dos discos –uno de cada especie– en cada una de las placas Petri con Agar Extracto de Arroz a distintas actividades de agua, separados por una distancia de 45 mm. Las placas se incubaron a 29°C y a 15°C.

El medio de cultivo Agar Extracto de Arroz (AEA) se obtuvo a partir de granos de arroz cáscara y los distintos valores de agua experimentados (0.85,

0.90, 0.95, 0.98 y 0.995), se obtuvieron añadiendo al medio distintas cantidades de glicerol (SEMPERE y SANTAMARINA, 2006a).

Ratios de crecimiento

El crecimiento de las especies *T. harzianum* y *P. oryzae* inoculadas conjuntamente fue registrado diariamente mediante la medición por colonia fúngica de dos diámetros perpendiculares según el método descrito por SEMPERE y SANTAMARINA (2007).

Ensayo macro y microscópico de la interacción

Después de obtener los gráficos del estudio ecofisiológico de las cepas, las placas Petri se dejaron durante 8 semanas en las mismas condiciones, observando en todo momento la evolución macroscópica de las colonias. Al final de este periodo, se estableció el tipo de interacción y según este, a cada hongo se le asignó un valor numérico para obtener el Índice de Dominancia: crecimiento en común (1); inhibición mutua por contacto o con espacio entre colonias < 2 mm (2); inhibición mutua a distancia (3); inhibición de un microorganismo por contacto (4 para la especie dominante, 0 para la especie inhibida); inhibición de un microorganismo a distancia (5 para la especie dominante, 0 para la especie inhibida) (MAGAN y LACEY, 1984).

Para ensayo microscópico se realizó un microcultivo dual que se analizó con un microscopio óptico Olympus PM-10AK3 y un microscopio electrónico

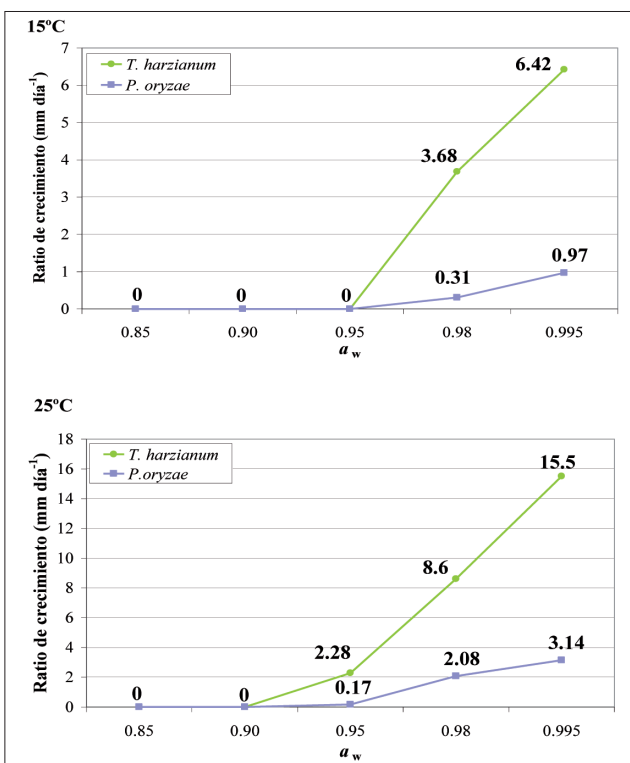


Figura 1. Influencia de la actividad de agua (a_w) en función de la temperatura sobre el ratio de crecimiento de *T. harzianum* y *P. oryzae* crecidos conjuntamente en Agar Extracto de Arroz.

de barrido de bajas temperaturas JEOL JSM 5410 (SEMPERE y SANTAMARINA, 2006b).

Análisis estadístico

Para determinar el efecto de los factores abióticos actividad de agua (a_w) y temperatura (T°) y sus factor doble sobre el crecimiento medio de las dos cepas inoculadas conjuntamente, se realizó el test de análisis de la varianza (ANOVA) con valores de significación de $P \leq 0.01$. El programa utilizado fue STATGRA-PHICS Plus 5.0 (Stat Point, Inc., Rendón, Virginia (EEUU)).

Resultados y discusión

Ecofisiología de las especies

La diferencia entre las ratios de crecimiento de *T. harzianum* y *P. oryzae* inoculadas conjuntamente fue muy acentuada en las dos temperaturas experimentadas a las actividades de agua de 0.98 y 0.995 (Figura 1).

El desarrollo inicial de *T. harzianum* y *P. oryzae* cuando se inocularon en un mismo sustrato, fue muy similar al que experimentaron las especies cuando se inocularon individualmente observándose una ligera variación no significativa en las ratios de crecimiento (SEMPERE y col., 2005).

Tanto para *T. harzianum* como para *P. oryzae*, la actividad de agua en la que se observó un máximo y mínimo desarrollo fue de 0.995 y 0.90 a_w respectivamente. Aunque en el caso de *P. oryzae* éste no se vio reflejado en los gráficos en algunas condiciones por registrar su crecimiento durante cinco días.

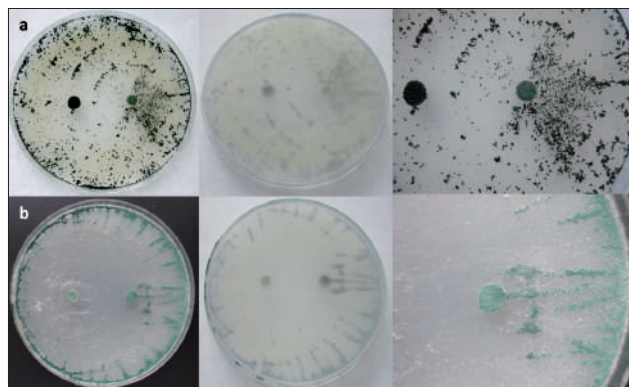


Figura 2. Interacción entre *T. harzianum* y *P. oryzae* con un periodo de 8 semanas a 25°C. Inhibición de *P. oryzae* por contacto. Fila a: 0.995 a_w . Fila b: 0.98 a_w . Izquierda: *T. harzianum*. Derecha: *P. oryzae*.

Los factores abióticos actividad de agua y temperatura, y el factor biótico especie analizados, registraron diferencias significativas sobre el crecimiento medio de los dos aislados con un nivel de confianza del 99% (Tabla 1).

FACTOR	GL	CM	F-ratio	P-valor
a_w	4	3792.44	84.34	0.0000**
T	1	2983.89	66.36	0.0000**
E	1	5932.85	131.95	0.0000**
$a_w \times T$	4	900.006	20.02	0.0000**
$a_w \times E$	4	2103.25	46.78	0.0000**
TxE	1	1305.02	29.02	0.0000**

Tabla 1. Análisis de la varianza del crecimiento dual de *T. harzianum* y *P. oryzae*; significancia de los factores simples actividad de agua (a_w), temperatura (T), especie fúngica (E) y los factores dobles ($a_w \times T$), ($a_w \times E$), (T x E). GL: Grados de libertad. CM: cuadrado medio. F-Ratio: F-Snedecor. ** Indica que el factor tuvo un efecto significativo ($P < 0.01$).

Índice de Dominancia

Se descartó el estudio a 15°C y a la actividad de agua de 0.95 25°C debido al mínimo crecimiento que *P. oryzae* registró en estos valores de experimentación. Tanto a 0.98 como a 0.995 a_w a 25°C *T. harzianum* inhibió por contacto a *P. oryzae*. Es importante señalar que la colonia del patógeno sufrió cambios morfológicos, pasando completamente desapercibida (Figura 2).

Según el Índice de Dominancia *T. harzianum* fue una especie más competitiva que *P. oryzae* (Tabla 2).

Temperatura	Especie fúngica	0.995 a_w	0.98 a_w	I_D
25 °C	<i>T. harzianum</i>	4	4	8
	<i>P. oryzae</i>	0	0	0

Tabla 2. Índice de Dominancia (I_D). El I_D se obtuvo de sumar los valores asignados a cada especie según el tipo de interacción a las distintas temperaturas. Inhibición de *P. oryzae* por contacto (4 para la especie dominante –*T. harzianum*–; 0 para la especie inhibida –*P. oryzae*–).

El análisis microscópico de la interacción mostró que *T. harzianum* parasitó a *P. oryzae*, penetrando sus hifas, conidióforos y conidios.

Los mecanismos por los que *T. harzianum* antagonizó a *P. oryzae* fueron micoparasitismo y competencia por el espacio y los nutrientes.

Algunos agentes de biocontrol han sido probado con distinto éxito frente a *P. oryzae* como las bacterias *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter agglomerans*,

Serratia liquefaciens, *Xanthomonas luminescens*, y los hongos *Bipolaris sorokiniana*, razas avirulentas de *P. oryzae*, *Chaetomium cochlioides*, *C. cuniculorum*, constituyendo un campo prometedor sobre el que queda mucho que investigar (AMUTHARAJ y col., 2013; MANANDHAR y col., 1998; SUPRAPTA, 2012). Aunque se necesitan más investigaciones al respecto, *Trichoderma harzianum* podría ser una alternativa de control de este patógeno.

BIBLIOGRAFÍA

- AMUTHARAJ, P.; SEKAR, C.; ESATH NATHEER, S. (2013) *Development and use of different formulations of Pseudomonas fluorescens siderophore for the enhancement of plant growth and induction of systemic resistance against Pyricularia oryzae in lowland rice*. International Journal of Pharma and Bio Sciences 4 (2), B831-B838 .
- MAGAN, N.; LACEY, J. (1984) *The effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi*. Transactions of the British Mycological Society 82, 83-93.
- MANANDHAR, H.K.; JORGENSEN, H.J.L.; MATHUR, S.B.; SMEDEGAARD-PETERSEN, V. (1998) *Suppression of rice blast by preinoculation with avirulent Pyricularia oryzae and the nonrice pathogen Bipolaris sorokiniana*. Phytopathology 88, 7.
- SEMPERE, F.; ROSELLÓ, P.; SANTAMARINA, M.P. (2005) *Conocer a Pyricularia oryzae Cavara*. PHYTOMA España 172, 108-112.
- SEMPERE, F.; SANTAMARINA, M.P. (2006a) *Ecofisiología de Drechslera oryzae Subram. & Jain en condiciones in vitro*. PHYTOMA España 178, 49-51.
- SEMPERE, F.; SANTAMARINA, M.P. (2006b) *In vitro biocontrol analysis of Alternaria alternata (Fr.) Keissler under different environmental conditions*. Mycopathologia 163, 183-190.
- SEMPERE, F.; SANTAMARINA, M.P. (2007) *Competitive interactions between Fusarium sambucinum Fuckel and Phoma glomerata (Corda) Wollenweber & Hochapfel under in vitro conditions*. Revista Iberoamericana de Micología 24(1), 29-33.
- SEMPERE, F.; SANTAMARINA, M.P. (2008) *Biological control of one species belonging to the dominant mycobiota of rice of Valencia*. Annals of Microbiology 58 (1), 7-14.
- SEMPERE, F.; SANTAMARINA, M.P. (2009) *Antagonistic interactions between fungal rice pathogen Fusarium verticillioides (Sacc.) Nirenberg and Trichoderma harzianum Rifai*. Annals of Microbiology 59 (2), 259-266.
- SEMPERE, F.; SANTAMARINA, M.P. (2010) *Efficacy of Trichoderma harzianum in suppression of Fusarium culmorum*. Annals of Microbiology 60 (2), 335-340.
- SUPRAPTA, D.N. (2012) *Potential of microbial antagonists as biocontrol agents against plant fungal pathogens*. Journal of the International Society for Southeast Asian Agricultural Sciences 18 (2), 1