

**Hongos patógenos del grano/semilla de
arroz (*Oryza sativa*) asociados al manchado:
Alternativas sustentables de control**

*Tesis presentada para optar al título de Magister Scientiae de la
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad
Nacional de La Plata*

Diana Carolina Bedoya Castañeda

Ingeniera Biológica- Universidad Nacional de Colombia



Facultad de
Ciencias Agrarias
y Forestales



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

Directora de tesis

Marina Sisterna

Ingeniera Agrónoma (Universidad Nacional de La Plata)

Co-directora de tesis

María Pincioli

Dra. (Universidad Nacional de La Plata)

JURADO EVALUADOR

Ing. Agr. Dra. Susana A. Gutiérrez



Ing. Agr. (M. Sc.) María Agueda Cúndom



Ing. Agr. (M. Sc.) Alfonso Damian Lovato Echeverría



Fecha defensa tesis

22 de Noviembre de 2022

Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales
La Plata, Argentina
2022

AGRADECIMIENTOS

Al Universo infinito por darme la fuerza de voluntad y esperanza de terminar esta maestría, afrontar las dificultades que se han presentado y encontrar a personas maravillas en este camino.

A mi Directora Marina Sisterna y Co-directora María Pincioli por su paciencia, atención, guía y apoyo.

A Josefina Cipollone por su apoyo, compañía y ayuda incondicional. A Cecilia Mourellos por su enseñanza y colaboración en la identificación molecular.

Al Centro de Investigaciones en Fitopatologías (CIDEFI) de la Universidad Nacional de La Plata y a todos los que hacen parte de él, por su ayuda y amistad.

Al Dr. Fernando Pieckenstain, investigador del Instituto Tecnológico de Chascomús (INTECH) por permitirme terminar algunos ensayos en su laboratorio, por su gran disposición y apoyo.

A mis compañeros y compañeras de curso por la amistad brindada y el acompañamiento.

A mi familia y pareja por la paciencia, la fuerza y tanto amor.

PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS

XI Congreso Brasileiro de Arroz Irrigado (SOSBAI). Resumen: “Alternativas sustentables para el control del manchado del grano/semilla en arroz”. Bedoya Castañeda D., Pincioli, M. Bezus, R. y Sisterna M. Balneário Camboriú, Brasil. 2019.

1º Congreso Argentino de Semillas (Modalidad Virtual). Expositora de trabajo científico: “Alternativas sustentables para el control del manchado de grano de arroz”. Bedoya Castañeda D., Pincioli, M. y Sisterna. Córdoba, Argentina. 2020.

Artículo científico: “Alternativas sustentables para el manchado de grano/semilla en arroz”. Brazilian Journal of Development, Vol. 7, N°6. Bedoya Castañeda, D., Pincioli, M., Bezus, R. y Sisterna, M. La Plata, Argentina. 2021.

ÍNDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS.....	i
PUBLICACIONES.....	ii
ÍNDICE GENERAL.....	iii
ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xi
ABREVIATURAS.....	xvii
RESUMEN.....	xviii
ABSTRACT.....	xix

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	3
1.1 Generalidades.....	4
1.2 Origen.....	4
1.3 El cultivo de arroz.....	5
1.4 Producción mundial.....	6
1.5 Producción en Argentina.....	6
1.6 Principales enfermedades del cultivo del arroz.....	7
1.7 Manchado del grano y síntomas.....	8
1.7.1 Patógenos.....	9
1.7.2 Fuentes de inóculo.....	10
1.7.3 Manejo de la micoflora de la enfermedad.....	11
1.8 Alternativas Biológicas.....	12
1.8.1 Control biológico.....	12
1.8.1.1 <i>Trichoderma</i> spp.....	12
1.8.1.2 <i>Chaetomium</i> spp.	13
1.8.2 Derivados botánicos.....	14
1.8.2.1 Extractos naturales.....	14
1.8.2.1.1 Extracto de Ajo.....	14
1.9 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	15
1.9.1 Hipótesis.....	15
1.9.2 Objetivos generales.....	15
1.9.3 Objetivos particulares.....	16

BIBLIOGRAFÍA.....	17
CAPITULO II	
EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.....	23
2.1 Introducción.....	24
2.1.1 Objetivo.....	25
2.2 Materiales y Métodos.....	25
2.2.1 Muestras.....	25
2.2.2 Porcentaje de Incidencia.....	25
2.2.3 Aislamiento de microorganismos.....	26
2.2.3.1 Micoflora del grano/semilla de arroz.....	26
2.2.3.2 Hongos Antagonistas.....	27
2.3 Resultados.....	28
2.3.1 Porcentaje de Incidencia.....	28
2.3.2 Aislamiento de microorganismos.....	29
2.3.2.1 Micoflora del grano/semilla de arroz.....	29
2.3.2.2 Hongos Antagonistas.....	32
2.3.2.2.1 Aislamientos de plántulas de arroz.....	32
2.4 Discusión.....	32
BIBLIOGRAFÍA.....	36
CAPITULO III	
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS SELECCIONADOS Y EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL EFECTO BIOCONTROLADOR DE LOS AISLAMIENTOS DE <i>Trichoderma harzianum</i> Y <i>Chaetomium</i> spp.....	39
3.1 Introducción.....	40
3.1.1 <i>Trichoderma</i> spp.....	40
3.1.2 <i>Chaetomium</i> spp.	41
3.1.3 <i>Bipolaris</i> spp.....	42
3.1.4 <i>Curvularia</i> spp.....	42
3.1.5 <i>Fusarium</i> spp.....	42
3.1.6 Objetivos.....	43

3.2 Materiales y Métodos.....	44
3.2.1 Cultivos monospóricos.....	44
3.2.2 Caracterización morfocultural.....	45
3.2.2.1 <i>Trichoderma</i> spp.....	45
3.2.2.2 <i>Chaetomium</i> spp., <i>Bipolaris</i> spp. <i>Curvularia</i> spp. y <i>Fusarium</i> spp.....	45
3.2.3 Identificación molecular.....	46
3.2.3.1 <i>Trichoderma</i> spp.....	36
3.2.3.2 <i>Chaetomium</i> spp, <i>Bipolaris</i> spp., <i>Curvularia</i> spp. y <i>Fusarium</i> spp.....	36
3.2.4 Cultivos duales.....	47
3.3 Resultados.....	49
3.3.1 Caracterización morfocultural.....	49
3.3.1.1 <i>Trichoderma</i> spp.....	49
3.3.1.2 <i>Chaetomium</i> spp.....	49
3.3.1.3 <i>Bipolaris</i> spp.....	49
3.3.1.4 <i>Curvularia</i> spp.....	50
3.3.1.5 <i>Fusarium</i> spp.....	51
3.3.2 Identificación molecular.....	51
3.3.2.1 <i>Trichoderma harzianum</i>	51
3.3.2.2 <i>Chaetomium</i> spp., <i>Bipolaris</i> spp., <i>Curvularia</i> spp. y <i>Fusarium</i> spp.....	51
3.3.3 Cultivos duales.....	53
3.3.3.1 <i>Trichoderma harzianum</i>	53
3.3.3.2 <i>Chaetomium</i> spp.....	57
3.4 Discusión.....	64
BIBLIOGRAFÍA.....	68

CAPITULO IV

EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DE <i>Trichoderma harzianum</i>, <i>Chaetomium globosum</i> Y EL EXTRACTO DE AJO.....	72
4.1 Introducción.....	73
4.1.1 Objetivos.....	74
4.2 Materiales y Métodos.....	74
4.2.1 Extracto de ajo.....	74
4.2.1.1 Crecimiento miceliar.....	74
4.2.1.1.1 Extracto de ajo comercial.....	74

4.2.1.1.2	Extracto de ajo natural.....	75
4.2.1.2	Análisis de la sensibilidad de los patógenos (<i>B. oryzae</i> , <i>C. lunata</i> y <i>F. graminearum</i>) frente al tratamiento con extracto de ajo natural.....	76
4.2.2	Tratamientos biológicos.....	76
4.2.2.1	Adherente en grano/semilla.....	76
4.2.3	Actividad antifúngica de las cepas seleccionadas de <i>T. harzianum</i> , <i>C. globosum</i> , extracto de ajo natural y fungicida en los granos/semillas de arroz.....	77
4.3	Resultados.....	78
4.3.1	Extracto de ajo.....	78
4.3.1.1	Crecimiento miceliar.....	78
4.3.1.1.1	Extracto de ajo comercial.....	78
4.3.1.1.2	Extracto de ajo natural.....	80
4.3.1.2	Análisis de sensibilidad para los patógenos (<i>B. oryzae</i> , <i>C. lunata</i> y <i>F. graminearum</i>) frente al tratamiento con extracto de ajo natural..	85
4.3.2	Tratamientos biológicos.....	87
4.3.2.1	Adherente en grano/semilla.....	87
4.3.3	Actividad antifúngica de las cepas seleccionadas de <i>T. harzianum</i> , <i>C. globosum</i> , extracto de ajo natural y fungicida en los granos/semillas de arroz.....	87
4.3.3.1	<i>Trichoderma harzianum</i>	87
4.3.3.2	<i>Chaetomium globosum</i>	88
4.3.3.3	Extracto de ajo natural a la concentración del 13% a 8 horas, 12 horas y 24 horas.....	91
4.3.3.4	Fungicida Rovral.....	93
4.4	Discusión.....	94
	BIBLIOGRAFÍA.....	97

CAPITULO V

	EVALUACIÓN <i>IN VITRO</i> DEL EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS CON <i>T. harzianum</i> , <i>C. globosum</i> y EL EXTRACTO DE AJO NATURAL SOBRE LA GERMINACIÓN Y EL VIGOR DEL GRANO/SEMILLA DE ARROZ.....	99
--	---	----

5.1	Introducción.....	100
5.1.1	Objetivo.....	101

5.2 Materiales y métodos.....	101
5.2.1 Germinación y vigor de la semilla.....	101
5.3 Resultados.....	103
5.3.1 Tratamientos biológicos.....	103
5.3.1.1 Porcentaje de germinación final (PGF).....	103
5.3.1.2 Índice de Vigor de la Plántula (IV).....	103
5.3.1.3 Índice de vigor basado en el porcentaje de germinación y la longitud de la plúmula (IVP) y basado en el porcentaje de germinación y la longitud de la radícula (IVR).....	105
5.3.2 Extracto de ajo natural.....	106
5.3.2.1 Porcentaje de germinación final (PGF).....	106
5.3.2.2 Índice de Vigor de la Plántula (IV).....	107
5.3.2.3 Índice de vigor basado en el porcentaje de germinación y la longitud de la plúmula (IVP) y basado en el porcentaje de germinación y la longitud de la radícula (IVR).....	109
5.3.3 Comparación de los tratamientos biológicos (<i>T. harzianum</i> y <i>C. globosum</i>) y los tratamientos con extracto de ajo natural.....	111
5.3.3.1 Porcentaje de germinación final (PGF).....	111
5.3.3.2 Índice de Vigor de la Plántula (IV).....	112
5.3.3.3 Índice de vigor basado en el porcentaje de germinación y la longitud de la plúmula (IVP) y basado en el porcentaje de germinación y la longitud de la radícula (IVR).....	114
5.4 Discusión.....	117
BIBLIOGRAFÍA.....	119

CAPITULO VI

EVALUACIÓN <i>IN VIVO</i> DEL EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS CON <i>T. harzianum</i>, <i>C. globosum</i> y EL EXTRACTO DE AJO NATURAL SOBRE <i>Bipolaris oryzae</i>.....	121
6.1 Introducción.....	122
6.1.1 Objetivo.....	123
6.2 Materiales y métodos.....	123
6.2.1 Ensayos de invernáculo.....	123
6.2.2 Preparación del inóculo.....	125

6.2.3 Inoculación.....	126
6.3 Resultados.....	128
6.3.1 Incidencia y severidad de la enfermedad.....	128
6.4 Discusión.....	130
BIBLIOGRAFÍA.....	134
CONCLUSIONES GENERALES.....	136

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	CAPÍTULO I	
1	Evolución de la producción de arroz en Argentina.....	7
Tabla	CAPÍTULO II	
1	Número de colonias de los géneros fúngicos encontrados en las siembras (primera repetición) en los granos/semillas de arroz manchado y no manchado del año cosecha 2016.....	30
2	Número de colonias de los géneros fúngicos encontrados en las siembras (segunda repetición) en los granos/semillas de arroz manchado y no manchado del año cosecha 2016.....	31
3	Aislamientos de <i>Chaetomium</i> spp. por localidad.....	32
Tabla	CAPÍTULO III	
	Regiones que fueron amplificadas de los aislamientos de <i>Chaetomium</i> spp.	
1	<i>Bipolaris</i> spp. y <i>Curvularia</i> spp. y resultado de la identificación molecular.....	52
2	Valores medios del porcentaje de inhibición miceliar (MGI) de las 7 cepas del género antagonista <i>T. harzianum</i> frente a los patógenos <i>B. oryzae</i> , <i>C. lunata</i> y <i>F. graminearum</i> en cultivos duales.....	53
3	Mecanismos de interacción patógeno - <i>Trichoderma harzianum</i> a nivel microscópico.....	57
4	Valores medios del porcentaje de inhibición miceliar (MGI) de las 7 cepa/aislamientos del género antagonista <i>Chaetomium</i> spp. frente a los patógenos <i>B. oryzae</i> , <i>C. lunata</i> y <i>F. graminearum</i> en cultivos duales.....	58
5	Mecanismos de interacción patógeno - <i>Chaetomium</i> spp. a nivel microscópico.....	63
Tabla	CAPÍTULO IV	
1	Clasificación para Rovral de los principios activos usados según la FRAC Code List 2021.....	77
2	Tratamientos con extracto de ajo comercial para los patógenos <i>B. oryzae</i> , <i>C. lunata</i> y <i>F. graminearum</i>	78
3	Valores medios y promedios del porcentaje de inhibición miceliar (MGI) para <i>B. oryzae</i> , <i>C. lunata</i> y <i>F. graminearum</i> a diferentes	

	concentraciones del extracto de ajo natural.....	84
4	Ecuaciones de regresión no lineales utilizadas para el cálculo de la concentración inhibitoria media (CI50). CMe: Cuadrado medio del error.....	85
Tabla CAPÍTULO V		
1	Índice de vigor de la plántula para los tratamientos biológicos (<i>T. harzianum</i> y <i>C. globosum</i>) y el testigo.....	103
2	Datos adicionales para los tratamientos biológicos (<i>T. harzianum</i> y <i>C. globosum</i>) y el testigo.....	106
3	Índice de vigor de la plántula para los tratamientos con extracto de ajo natural.....	107
4	Datos adicionales para los tratamientos con extracto de ajo natural y el testigo.....	110
5	Diferencia en el porcentaje de germinación final (PGF) con respecto al testigo.....	112
6	Índice de vigor de la plántula para los tratamientos biológicos (<i>T. harzianum</i> y <i>C. globosum</i>), con extracto de ajo natural y el testigo.....	113
7	Datos adicionales para los tratamientos biológicos (<i>T. harzianum</i> y <i>C. globosum</i>), con extracto de ajo natural y el testigo.....	116
Tabla CAPÍTULO VI		
1	Tratamientos y patógeno seleccionado para ensayo <i>in vivo</i>	123
2	Información principal y detalles técnicos del fungicida Allegro.....	124
3	Clasificación para Allegro de los principios activos usados según la FRAC code list 2021.....	125
4	Concentraciones de las suspensiones de conidios para el patógeno (<i>B. oryzae</i>) y los hongos antagonistas (<i>T. harzianum</i> y <i>C. globosum</i>).....	126
5	Escala de severidad recomendada por el IRRI (sistema de evaluación estándar para arroz).....	127
6	Valores para la severidad en los tratamientos con <i>T. harzianum</i> , <i>C. globosum</i> , extracto de ajo natural, fungicida y el testigo.....	130

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. CAPÍTULO I	
1	Origen y rutas de dispersión del arroz (Acevedo <i>et al</i> , 2006).....5
2	Manchado de las glumas (A); decoloración del endosperma (B); puntuaciones negras en el endosperma (C).....9
3	Vista microscópica de conidios de <i>Trichoderma</i> spp. (A); peritecio de <i>Chaetomium</i> spp. (B).....14
Fig. CAPÍTULO II	
1	Comparación de granos/semillas de arroz con mayor (A) y menor (B) grado de manchado.....26
2	Crecimiento de las plántulas de arroz (A). Desinfección y siembra de las hojas obtenidas a partir de las plántulas de arroz para los aislamientos de <i>Chaetomium</i> spp.....28
3	Porcentaje de incidencia para las muestras en el año 2016 (localidades y genotipos).....29
4	Crecimiento de las colonias de los hongos presentes en los granos/semillas de arroz provenientes de la localidad de Los Hornos (La Plata, Provincia de Buenos Aires).....29
5	Porcentaje de presencia fúngica por localidad.....30
6	Porcentaje de presencia fúngica por genotipo.....30
7	Porcentaje de presencia fúngica por géneros de las muestras de granos/ semillas de arroz (2 genotipos y 3 localidades).....31
Fig. CAPÍTULO III	
1	Medio de cultivo Carboximetil celulosa (CMC) líquido para el crecimiento de <i>Fusarium graminearum</i> (A). Vista al microscopio con aumento de 40X del cultivo monospórico de <i>Fusarium graminearum</i> (B).....45
2	<i>Chaetomium</i> spp. (C4) en medio de cultivo APG. Anverso de la placa de Petri (A)(B); reverso de la placa de Petri (C); ascosporas (D)(E).....49
3	<i>Bipolaris</i> spp. en medio de cultivo APG. Anverso de la placa de Petri (A)(B); reverso de la placa de Petri (C); conidios (D)(E)(F).....50
4	<i>Curvularia</i> spp. en medio de cultivo APG. Anverso de la placa de Petri (A)(B); reverso de la placa de Petri (C); conidios (D)(E).....50

5	<i>Fusarium</i> spp. en medio de cultivo APG. . Anverso de la placa de Petri (A)(B); reverso de la placa de Petri (C); macroconidias (D)(E).....	51
6	Resultado de la PCR para la identificación de <i>Fusarium graminearum</i>	52
7	Valores medios del porcentaje de inhibición miceliar (MGI) de las 7 cepas de <i>T. harzianum</i> frente a los patógenos <i>B. oryzae</i> , <i>C. lunata</i> y <i>F. graminearum</i>	54
8	Valores promedio del porcentaje de inhibición miceliar (MGI) de las 7 cepas de <i>T. harzianum</i>	54
9	T7 frente a <i>B. oryzae</i> y testigos (A); T3 frente a <i>C. lunata</i> y testigos (B); T8 frente a <i>F. graminearum</i> y testigos (C).....	55
10	T2 frente a <i>B. oryzae</i> y testigo (A); T4 frente a <i>C. lunata</i> y testigos (B); T3 frente a <i>F. graminearum</i> y testigo (C).....	55
11	T7 frente a <i>B. oryzae</i> y testigo (A); T8 frente a <i>B. oryzae</i> y testigo (B); T9 frente a <i>F. graminearum</i> y testigo (C); T10 frente a <i>F. graminearum</i> y testigo (D).....	56
12	Micelio de <i>B. oryzae</i> deformado por adelgazamiento (A); hifas de <i>T. harzianum</i> enrolladas al micelio de <i>C. lunata</i> (B); hifas de <i>T. harzianum</i> enrolladas al micelio de <i>B. oryzae</i> (C); conidios de <i>B. oryzae</i> sin presencia de septos (D); conidios de <i>C. lunata</i> enrollados por hifas de <i>T. harzianum</i> (E)(F); las flechas amarillas señalan las zonas de interacción patógeno-antagonista.....	56
13	Valores medios del porcentaje de inhibición miceliar (MGI) de las 7 cepas/aislamientos de <i>Chaetomium</i> spp. frente a los patógenos <i>B. oryzae</i> , <i>C. lunata</i> y <i>F. graminearum</i>	58
14	Valores promedio del porcentaje de inhibición miceliar (MGI) de las 7 cepas/aislamientos de <i>Chaetomium</i> spp.....	59
15	C3 frente a <i>B. oryzae</i> y testigos (A); C1 frente a <i>C. lunata</i> y testigos (B); C4 frente a <i>F. graminearum</i> y testigos (C).....	59
16	C1 (A); C2 (B); C3 (C); C4 (D) frente a <i>B. oryzae</i> . Las flechas amarillas señalan las zonas de antibiosis en las cajas de Petri.....	60
17	C5 (A); C6 (B); C7 (C) frente a <i>B. oryzae</i> . Las flechas amarillas señalan la zona de antibiosis en las cajas de Petri.....	60
18	C2 (A) y C3 (B) frente a <i>C. lunata</i> . Las flechas amarillas señalan la	

	zona de antibiosis en las cajas de Petri.....	60
19	C1 (A); C4 (B); C5 (C); C6 (D); C7 (E) frente a <i>C. lunata</i>	61
20	C1 (A); C2 (B); C4 (C); C6 (D) frente a <i>F. graminearum</i> . Las flechas amarillas señalan la zona de interacción con coloración en las cajas de Petri.....	62
21	C3 (A); C5 (B); C7 (C) frente a <i>F. graminearum</i> . Las flechas amarillas señala la zona de interacción en las cajas de Petri.....	62
22	Conidios de <i>C. lunata</i> enrolladas en los pelos ascomatales de <i>Chaetomium</i> spp. (A); conidios de <i>C. lunata</i> albinizados (B); conidios de <i>B. oryzae</i> sin presencia de septos (C); micelio vacuolizado de <i>F. graminearum</i> (D); micelio engrosado al borde de la colonia de <i>C. lunata</i> (E). Las flechas amarillas señalan las zonas de interacción patógeno-antagonista.....	63
23	Vista ampliada del micelio engrosado de <i>B. oryzae</i> frente a <i>Chaetomium</i> spp. (B).....	64
Fig.	CAPÍTULO IV	
1	Valores promedio del crecimiento radial de las colonias de los patógenos (<i>B. oryzae</i> , <i>C. lunata</i> y <i>F. graminearum</i>) tratadas con el extracto de ajo comercial y sus testigos.....	79
2	Comparación del crecimiento radial de las colonias de <i>B. oryzae</i> , <i>C. lunata</i> y <i>F. graminearum</i> con extracto de ajo comercial a diferentes concentraciones y sus testigos.....	79
3	Crecimiento miceliar de <i>B. oryzae</i> (A); <i>C. lunata</i> (B) y <i>F. graminearum</i> (C) en las cajas de Petri con medio de cultivo APG y extracto de ajo comercial a diferentes concentraciones y sus testigos.....	80
4	Porcentaje de inhibición miceliar (MGI) de <i>B. oryzae</i> a varias concentraciones de extracto de ajo natural.....	80
5	Crecimiento miceliar de <i>B. oryzae</i> a varias concentraciones de extracto de ajo natural; testigo (A); al 5% (B); al 10% (C); al 12% (D); al 14% (E); al 15% (F).....	81
6	Porcentaje de inhibición miceliar (MGI) de <i>C. lunata</i> a varias concentraciones de extracto de ajo natural.....	81
7	Crecimiento miceliar de <i>C. lunata</i> a varias concentraciones de extracto de ajo natural; testigo (A); al 5% (B); al 10% (C); al 12% (D); al 14% (E);	

	al 15% (F).....	82
8	Porcentaje de inhibición micelial (MGI) de <i>F. graminearum</i> a varias concentraciones de extracto de ajo natural.....	82
9	Crecimiento micelial de <i>F. graminearum</i> a varias concentraciones de extracto de ajo natural; testigo, al 5% y al 10% (A); al 12%, al 14% y al 15% (B).....	83
10	Crecimiento micelial de <i>F. graminearum</i> a varias concentraciones de extracto de ajo natural; testigo (A); al 6% (B); al 7% (C); al 8% (D); al 9% (E).....	83
11	Valores medios del porcentaje de inhibición micelial (MGI) de <i>B. oryzae</i> , <i>C. lunata</i> y <i>F. graminearum</i> a varias concentraciones de extracto de ajo natural.....	84
12	Valores promedio del porcentaje de inhibición micelial (MGI) de <i>B. oryzae</i> , <i>C. lunata</i> y <i>F. graminearum</i> a varias concentraciones de extracto de ajo natural.....	85
13	Gráficas de los modelos de regresión no lineales para el cálculo de la concentración inhibitoria media (CI_{50}) de los patógenos <i>B. oryzae</i> (modelo Gompertz) (A), <i>C. lunata</i> (modelo Gompertz) (B); <i>F. graminearum</i> (modelo Logístico) (C).....	86
14	Tratamiento control (A); tratamiento <i>C. globosum</i> (C4) adherido con sacarosa (B); tratamientos con <i>C. globosum</i> (C4) adherido con Tween al 1% (C).....	87
15	Tratamiento control (A)(B); tratamiento antifúngico con <i>T. harzianum</i> (C)(D).....	87
16	Crecimiento de <i>T. harzianum</i> alrededor y sobre los granos/semillas de arroz.....	88
17	Promedio de granos/semillas con micoflora propia del manchado y promedio de granos/semillas con crecimiento de <i>T. harzianum</i>	88
18	Tratamiento control (A); tratamiento antifúngico con <i>C. globosum</i> (B).....	89
19	Crecimiento de <i>C. globosum</i> alrededor y sobre los granos/semillas de arroz.....	89

20	Promedio de granos/semillas con micoflora propia del manchado y promedio de granos/semillas con crecimiento de <i>C. globosum</i>	90
21	Valores medios del porcentaje de granos/semillas con crecimiento de <i>T. harzianum</i> y <i>C. globosum</i>	90
22	Promedio de granos/semillas tratadas con extracto de ajo natural al 13% (8 horas).....	91
23	Promedio de granos/semillas tratadas con extracto de ajo natural al 13% (12 horas).....	92
24	Promedio de granos/semillas tratadas con extracto de ajo natural al 13% (24 horas).....	92
25	Promedio de granos/semillas tratadas con fungicida Rovral.....	93
26	Valores medios del porcentaje de granos/semillas tratadas con fungicida y extracto de ajo natural al 13% (8, 12 y 24 horas).....	93
27	Tratamiento testigo (A); tratamiento con fungicida (B); tratamiento con extracto de ajo natural al 13% (8 h) (C); tratamiento con extracto de ajo natural al 13% (12 h) (D); tratamiento con extracto de ajo natural al 13% (24 h) (E).....	94
Fig.	CAPÍTULO V	
1	Granos/semillas de arroz enrollados en toalla de papel.....	102
2	Porcentaje de germinación de los tratamientos biológicos (<i>T. harzianum</i> , <i>C. globosum</i>) y el testigo.....	103
3	Índice de vigor y porcentaje de germinación para los tratamientos biológicos (<i>T. harzianum</i> , <i>C. globosum</i>) y el testigo.....	104
4	Crecimiento de micelio de la micoflora sobre el grano/semilla en toalla de papel (A); crecimiento de <i>T. harzianum</i> sobre el grano/semilla (B).....	104
5	Índices de vigor basados en el porcentaje de germinación y la longitud de la plúmula (IVP) y la longitud de la radícula (IVR) para los tratamientos biológicos (<i>T. harzianum</i> , <i>C. globosum</i>) y el testigo.....	105
6	Semillas germinadas en toalla de papel. Tratamiento con <i>T. harzianum</i> (Cepa T2) (A); tratamiento con <i>C. globosum</i> (cepa C4) (B); testigo (C).....	106
7	Porcentaje de germinación de los tratamientos con extracto de ajo natural y el testigo.....	107
8	Índice de vigor y porcentaje de germinación para los tratamientos con	

	extracto de ajo natural y el testigo.....	108
9	Índice de vigor basados en el porcentaje de germinación y la longitud de la plúmula (IVP) y la longitud de la radícula (IVR) para los tratamientos con extracto de ajo natural y el testigo.....	109
10	Semillas germinadas en toalla de papel. Tratamiento con extracto de ajo al 13% 24 h (A); tratamiento con extracto de ajo al 13% 12 h (B); testigo (C).....	111
11	Porcentaje de germinación final (PGF) para los tratamientos biológicos (<i>T. harzianum</i> (Cepa T2) y <i>C. globosum</i> (Cepa C4)), con extracto de ajo natural y el testigo.....	111
12	Índice de vigor (IV) y porcentaje de germinación final (PGF) para los tratamientos biológicos (<i>T. harzianum</i> (Cepa T2) y <i>C. globosum</i> (Cepa C4)), con extracto de ajo natural y el testigo.....	114
13	Índices de vigor basados en el porcentaje de germinación y la longitud de la plúmula (IVP) y la longitud de la radícula (IVR) para los tratamientos biológicos (<i>T. harzianum</i> (Cepa T2) y <i>C. globosum</i> (Cepa C4)), con extracto de ajo natural y el testigo.....	115
14	Semillas germinadas en toalla de papel. Testigo (A); semilla testigo (izquierda) y semilla con tratamiento de extracto de ajo al 13% 12 h (derecha) (B).....	117
Fig.	CAPÍTULO VI	
1	Germinación de semillas (A), plántulas de arroz en crecimiento (B).....	125
2	Preparación del inoculo de <i>C. globosum</i> para ensayo <i>in vivo</i>	126
3	Porcentaje de incidencia de la enfermedad para los tratamientos biológicos (<i>T. harzianum</i> (Cepa T2) y <i>C. globosum</i> (Cepa C4)), con extracto de ajo natural al 13%, con fungicida y el testigo.....	128
4	Plántulas inoculadas con los tratamientos. Testigo (A); <i>C. globosum</i> (B); <i>T. harzianum</i> (C); extracto de ajo natural (D); fungicida (E).....	129
5	Hojas con síntomas de la mancha castaña producida por <i>B. oryzae</i>	129

ABREVIATURAS

Ch: *Chaetomium* spp.

Bi: *Bipolaris* spp.

Cu: *Curvularia* spp.

Fus: *Fusarium* spp.

MGI: Porcentaje de inhibición miceliar

MGC: Longitud media de crecimiento miceliar testigo

MGT: Longitud media de crecimiento miceliar tratado

csp: cantidad suficiente para

Ng: Número total de granos/semillas germinadas

Nt: Total número de granos/semillas evaluadas

PGF: Porcentaje de germinación final

IV: Índice de vigor de la plántula

IVP: Índice vigor plúmula

IVR: Índice vigor radícula

SSG: Semillas sin germinar

LP: Longitud plántula

RESUMEN

El manchado del grano de arroz es una de las enfermedades más importantes presentes en la mayoría de las regiones productoras, causa pigmentación del grano y afecta el rendimiento/calidad del mismo. Se utilizaron muestras de arroz de los genotipos Yerúa y H-419, procedentes de tres localidades (Urdinarrain, Villa Elisa y Los Hornos). Esta tesis tiene como objetivos: i. Evaluar la capacidad antagónica de *Trichoderma harzianum*, *Chaetomium* spp. y determinar el efecto del extracto de ajo sobre patógenos (*B. oryzae*, *C. lunata* y *F. graminearum*) aislados a partir de la micoflora asociada al manchado del grano/semilla; ii. Evaluar el efecto de dichos tratamientos sobre la germinación y el vigor de la semilla y sobre un patógeno foliar (*Bipolaris oryzae*) en ensayos en invernáculo. Con los datos obtenidos se realizaron ANOVA una vía y las medias se compararon por el test de Duncan ($p \leq 0,05$). Con los datos no paramétricos (severidad) se realizó la prueba de Kruskal-Wallis; En todos los casos se utilizó InfoStat-Statistical Software, versión libre estudiantil, 2017. Los porcentajes de inhibición micelial promedio más efectivos frente a los tres patógenos fueron: T2 y T3 (*T. harzianum*); C1 y C4 (*Chaetomium* spp.) con valores de 23.5; 20.8; 33.1 y 32.5% respectivamente. Para el extracto de ajo natural la concentración más efectiva fue del 14% con valores mayores al 90%. Los tratamientos biológicos demostraron un efecto positivo sobre la germinación, mientras el extracto de ajo natural al 13%, favoreció el vigor y la longitud de las plántulas. El uso de alternativas biológicas para el control de los granos/semillas podría convertirse en una opción sustentable, más amigable con el medio ambiente y que contribuya a la disminución del uso indiscriminado de fungicidas. Además, podría representar un avance para disminuir la propagación de enfermedades a través de las semillas.

Palabras clave: Extracto de ajo, Biocontrol, *Chaetomium* spp., *Trichoderma harzianum*, Granos/Semillas

ABSTRACT

Rice grain discoloration is one of the most important diseases present in most of the cropping regions, it causes grain pigmentation and affects grain yield/quality. Rice samples of Yerúa and H-419 genotypes from three localities (Urdinarrain, Villa Elisa and Los Hornos) were used. The aims of this research were: i. To assess the antagonistic capacity of *Chaetomium* spp. and *Trichoderma* spp. and determine the effect of garlic extract on the pathogens (*B. oryzae*, *C. lunata* y *F. graminearum*) isolated from the mycoflora associated with grain/seed discoloration; ii. To assess the effect of those treatments on the seed vigor and germination and on a foliar pathogenic fungus (*Bipolaris oryzae*) in greenhouse assays. One way ANOVA test was performed, the means were compared by Duncan's test ($p < 0,05$). Kruskal-Wallis test was used for testing non-parametric data (severity). The analysis was run on by InfoStat-Statistical Software, version, 2017. The most effective average of mycelial inhibition percentages against three pathogens were: T2 y T3 (*T. harzianum*); C1 y C4 (*Chaetomium* spp.) with values of 23.5; 20.8; 33.1 y 32.5%, respectively. Natural garlic extract showed a concentration of 14% as the most effective parameter with values greater than 90%. The biological treatments showed a positive effect on germination, and a natural garlic extract's concentration 13% favored the seedlings vigor and length. Using biological alternatives control of grains/seeds could become a sustainable option, more environment friendly that contributes to the reduction of the indiscriminating use of fungicides. Furthermore, it could help to decrease the disease spread through seeds.

Keywords: Garlic extract, Biocontrol, *Chaetomium* spp., *Trichoderma harzianum*, Grains/Seeds

CAPITULO I

INTRODUCCION GENERAL

1.1 Generalidades

El arroz (*Oryza sativa* L.) es un cultivo que realiza la humanidad desde hace más de 10.000 años. Considerando la superficie cosechada es el segundo cereal de importancia para la alimentación después del trigo, pero desde el punto de vista alimenticio, el arroz proporciona más calorías por hectárea que cualquiera de los otros cereales cultivados. El componente principal del arroz es el almidón, en un rango entre el 70% y 80% (Informes de cadena de valor, 2017). Otra particularidad del cultivo de arroz es que, a diferencia de los otros, su valor económico principalmente radica en el grano entero para consumo humano, sin otra elaboración que el molinado; por lo cual, factores que puedan afectar esta característica afectarán su valor comercial (Pincioli *et al.* 2015).

El International Rice Genome Sequencing Project (IRGSP), un consorcio público internacional integrado por investigadores de diez países, dio a conocer la secuencia completa del genoma del arroz. En Argentina, el desarrollo genético comprende la acción mancomunada del INTA y la Fundación Proarroz, cuyas especies cubren el 70 % del área de cultivos en Latinoamérica; además existen variedades de alto rendimiento, de elevada calidad para la gastronomía, resistente a plagas y enfermedades. (Franzese, 2017; Informes de cadena de valor, 2017).

1.2 Origen

Se estima que el origen geográfico es el estado de *Oryza* en el noreste de India, sobre las laderas del Himalaya. Esta hipótesis está apoyada por la presencia y conservación de la variabilidad genética existente en la zona, debido a la diseminación de cruzamientos y favorecido por el aislamiento de dichas condiciones ambientales (Pincioli *et al.*, 2015). Según Acevedo *et al.* (2006), la dispersión del arroz en el mundo se inició desde el sureste asiático (India) hacia China, 3000 años antes de Cristo (A.C). De allí fue llevado a Corea y posteriormente al Japón, en el siglo I A.C. También de la India fue llevado para las islas del Océano Indico, principalmente Indonesia y Sri Lanka, en la misma época. Las rutas de dispersión del arroz en el mundo se muestran en la Figura 1.

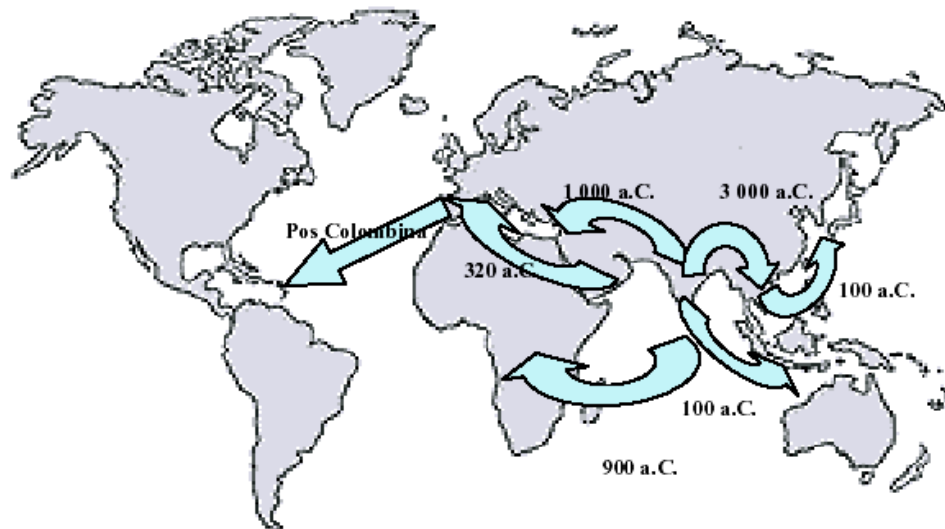


Figura 1. Origen y rutas de dispersión del arroz (Acevedo *et al.*, 2006)

1.3 El cultivo de arroz

El arroz es una planta herbácea anual de origen subtropical, clasificada como planta C3 por su vía fotosintética, y con gran capacidad de adaptación a diferentes condiciones ambientales; monocotiledónea perteneciente a la familia *Poaceae* cuya inflorescencia es una panícula. La altura de la planta varía entre 40cm (enanas) y más de 7 metros (flotantes) (Pincioli, *et al.*, 2015). Es una planta semiacuática que se desarrolla en suelos inundados dada la presencia de un tejido parenquimático denominado “aerénquima”, tejido especializado que permite la llegada de oxígeno del aire hasta las raíces, oxigenando la rizósfera. Por esta razón, la inundación del sembradío es un requisito fundamental para obtener altos rendimientos (De Bernardi, 2017).

En la producción a campo se obtiene el arroz cáscara, que luego se destina a la molienda. Allí se somete el arroz cáscara a un proceso de secado y descascarillado, para hacerlo comestible. Así se obtiene el arroz integral, también llamado arroz cargo o pardo. Luego se realiza un segundo descascarillado, para sacar el salvado y el germen, para de ahí pasar al momento en que se pule, tras lo cual se obtiene un arroz con aspecto blanco brillante (Informes de cadena de valor, 2017). El arroz es el único cereal que se consume como grano entero sin otro procesamiento que la molienda que separa la cáscara, el embrión y el pericarpio del endosperma. Sólo el 5% de la producción es usado en alimentos procesados, productos industrializados y bebidas alcohólicas. (Dirchwolf *et al.*, 2018, Gutiérrez *et al.*, 2002, Pincioli *et al.*, 2013; Sisterna *et al.*, 1994).

1.4 Producción mundial

El cultivo de arroz tiene un destacado valor en la alimentación humana y es de gran importancia socioeconómica, particularmente en Asia, donde continúa monopolizando la cosecha de este tipo de cereal, con aproximadamente el 80% de la producción mundial de 2018, tal y como reflejan los datos de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). De hecho, solo entre China e India aglutinan el 50% de toda la producción del planeta. En estas zonas el arroz no solo es la base de la dieta, sino también de la economía nacional, ya que su recolección necesita una inversión en mano de obra mayor a la de los demás cereales. (<https://elordenmundial.com/mapas/paises-mas-arroz-producen/>)

En el continente asiático se encuentran los principales países productores, consumidores, importadores, exportadores y el mayor consumo por persona (China, India, Indonesia, Bangladesh, Vietnam y Tailandia); aunque, actualmente existen numerosos países de occidente (Costa Rica, Cuba, Haití, Brasil y Colombia) que cultivan arroz en aquellas áreas ubicadas en zonas tropicales húmedas y subhúmedas, en las que también constituye su principal fuente de alimento.

1.5 Producción en Argentina

En la Argentina, la producción local de arroz se concentra en la región litoral, en las provincias de Entre Ríos, Corrientes, Santa Fe, Chaco, Formosa y Misiones. En la campaña 2017/2018 la superficie sembrada fue de 210.650ha, siendo Corrientes (con el 47%) la provincia que más superficie destina a la producción de arroz, seguida por Entre Ríos (31.1%), Santa Fe (15,9%), Formosa (3.6%) y Chaco (2.5%). La producción nacional alcanzó los 1.434.300Tn, de las cuales el 47% fue aportado por Corrientes (ACPA & Bolsa de cereales de Entre Ríos, 2018) (Pawlizki *et al.*, 2020).

La producción en el ciclo 2019/2020 alcanzó las 1.270.880Tn, Según el Sistema de Información Simplificado Agrícola, (SISA) la ubicación geográfica de los lugares en los que se registra la siembra, señaló que Corrientes es la provincia donde se informó mayor superficie sembrada, representando el 46,79%, en el segundo y tercer lugar, están las provincias de Entre Ríos y Santa Fe con 28,91% y 12,41%, respectivamente. Entre las tres provincias representan el 88,11% de la superficie sembrada total.

La campaña 2020/2021 alcanzó 1.521.005Tn, registrando un aumento del 20% con respecto al ciclo anterior, es decir unas 250.000Tn más. (<https://www.elagrario.com/actualidad-arroz-la-produccion-registro-un-aumento-del-20-55778.html>).

En la Tabla 1 se detalló la evolución de la producción de arroz en Argentina. Fuente: <https://www.agrositio.com.ar/noticia/217708-evolucion-de-la-produccion-de-arroz-en-argentina>

Tabla 1. Evolución de la producción de arroz en Argentina

Campaña	Superficie Sembrada (ha)	Variación (%)	Rendimiento Promedio Kg/ha	Variación (%)	Producción (t)	Variación (%)
2009/10	222.367	---	5.657	---	1.258.019	---
2010/11	260.477	17	6.761	20	1.761.200	40
2011/12	228.440	- 12	6.670	- 1	1.523.787	- 13
2012/13	229.184	0	6.094	- 9	1.396.722	- 8
2013/14	231.054	1	6.378	5	1.473.729	6
2014/15	233.970	1	6.330	- 1	1.481.040	0
2015/16	209.500	- 10	5.974	- 6	1.251.599	- 15
2016/17	196.710	- 6	6.555	10	1.289.525	3
2017/18	201.650	3	7.113	9	1.434.325	11
2018/19	197.050	- 2	6.241	- 12	1.229.700	- 14
2019/20	190.250	- 3	6.680	7	1.270.880	3
2020/21	199.700	5	7.616	14	1.521.005	20

La superficie sembrada en el país en el ciclo 2020/2021 experimentó un crecimiento interanual de 5%, 9.450ha más; se detectó la siembra de arroz en 23 departamentos de las siguientes provincias: Chaco (1), Corrientes (9), Entre Ríos (9), Formosa (2) y Santa Fe (2). La mayor concentración del cereal se produjo en los departamentos de Curuzú Cuatiá y Mercedes (provincia de Corrientes), San Javier (provincia de Santa Fe) y Villaguay (provincia de Entre Ríos), que cubrieron el 40% (80.400ha) del total implantado y un rango de cultivadas, que osciló entre 17.001 a 22.000ha. (<https://www.agrositio.com.ar/noticia/217708-evolucion-de-la-produccion-de-arroz-en-argentina>)

1.6 Principales enfermedades del cultivo de arroz

El cultivo de arroz es afectado a nivel mundial por innumerables enfermedades producidas por hongos, bacterias y virus que tienen influencia en la producción y calidad sanitaria de la semilla (Ou, 1985). En Argentina, existen 19 enfermedades causadas por hongos. Los daños producidos por las enfermedades pueden variar cada año y de un

cultivo a otro, dependiendo de las condiciones ambientales, de la susceptibilidad de las variedades, de las razas de los microorganismos y de las condiciones predisponentes. (Gutiérrez y Cúndom, 2013)

En Argentina, las enfermedades en orden de importancia son: la podredumbre del tallo (*Sclerotium oryzae*), manchado de la vaina (*Rhizoctonia oryzae*), podredumbre de la vaina (*Sarocladium oryzae*, *Acrocyldrium oryzae*) y el manchado del grano (varias especies de hongos y bacterias asociados) (Pincioli *et al.*, 2015). En el nordeste de Argentina se han reportado además el tizón o quemado (*Pyricularia grisea*), escaldadura de la hoja (*Microdochium oryzae*), mancha foliar castaña angosta (*Cercospora oryzae*), mancha castaña (*Bipolaris oryzae*), mancha foliar, alternariosis (*Alternaria padwickii*), carbón de la hoja (*Entyloma oryzae*), eyespost (*Drechslera gigantea*), tizón de la vaina (*Rhizoctonia solani*), mancha agregada de la vaina (*Rhizoctonia oryzae-sativae*), podredumbre de las vainas del cuello o pie (*Gaeumannomyces graminis*), podredumbre castaño rojiza de la vaina (*Helicoceras oryzae*), carbón del grano (*Tilletia barclayana*), falso carbón (*Ustilaginoidea virens*), decoloración de vaina (*Pyrenochaeta oryzae*) y la podredumbre de la vaina y del tallo (*Sclerotium hydrophyllum*) (Gutiérrez y Cúndom, 2013).

1.7 Manchado del grano y síntomas

De las enfermedades fúngicas presentes en las zonas arroceras, el manchado del grano de arroz es una de las más importantes por su amplia distribución e incidencia en los cultivos de arroz. En condiciones de campo se manifiesta en el periodo que comprende desde la floración hasta la maduración del arroz. Es producida por un complejo de hongos, se caracteriza por manchas en las glumas que varían desde pequeños puntos oscuros a extensas áreas que pueden alcanzar hasta el 100 % de su superficie. La decoloración puede profundizar afectando el endosperma y a veces el embrión (Figura 2) (Ou, 1985; Webster y Gunnell, 1992). A nivel mundial el manchado del grano se presenta en la mayor parte de las regiones de producción de arroz (Huang *et al.*, 2011a,b; Mew y Gonzales, 2002; Ou, 1985; Webster y Gunnell, 1992).

La enfermedad afecta los componentes de calidad del producto, provocando la disminución de granos enteros, granos quebradizos en el proceso de molino y granos yesosos con coloraciones anormales. Por otra parte, también afecta a los componentes del

rendimiento, porque genera disminución del poder germinativo, del vigor y tamaño de las plantas, disminuye el número de granos por panoja y el peso de granos manchados (Batalla, 2014; Gutiérrez, 2002, Gutiérrez *et al.*, 2002, Pincioli *et al.*, 2003; Quintana *et al.*, 2017). De igual manera la calidad nutritiva del grano resulta peligrosa para sus consumidores debido a la presencia de micotoxinas, sustancias altamente riesgosas para la salud humana (Chhabra y Vij, 2019).



Figura 2. Manchado de las glumas (A); decoloración del endosperma (B); puntuaciones negras en el endosperma (C)

El manchado de grano es causado generalmente por la acción combinada de muchos factores bióticos y abióticos que incluyen: ataques fúngicos, bacterianos y virales, alta humedad, alta temperatura, debilidad del sistema de defensa de la planta, alta presión del viento durante la polinización, deficiencia de nutrientes, falta de polinización/fertilización adecuada, llenado de granos inmaduros, precipitaciones en la etapa de madurez (Chhabra y Vij, 2019). La severidad en el campo depende de la variedad de arroz, del microorganismo causal, del momento de la infección, y si se produce al emerger la panoja, provoca los mayores prejuicios (Castaño, 1985; Mew y Gonzales, 2002).

1.7.1 Patógenos

Los agentes causales de esta enfermedad varían de una región a otra (Agarwal *et al.*, 1975). Se han identificado alrededor de 50 géneros fúngicos responsables del deterioro

interno o externo del grano. (Huang *et al.*, 2011a,b; Neninger *et al.*, 2002; Ou, 1985; Roy, 1983).

En Argentina, la enfermedad ha sido descrita por Marchionatto (1943), pero el estudio en profundidad de la patología es más reciente (Dirchwolf *et al.*, 2018; Gutiérrez, 2002; Lovato y Gutiérrez, 2012; Pincirolí *et al.*, 2003, 2013; Sisterna *et al.*, 2005). En estos estudios, los hongos observados fueron: *Alternaria alternata*, *A. longissima*, *Alternaria padwickii*, *Alternaria* spp., *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *Bipolaris oryzae*, *Bipolaris* spp., *Cercospora oryzae*, *Cladosporium* spp., *Curvularia lunata*, *C. oryza-sativae*, *C. pallescens*, *C. protuberata*, *Curvularia* spp., *Epicoccum* sp., *Fusarium semitectum*, *F. equiseti*, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *F. verticillioides*, *Microdochium oryzae*, *Nigrospora* spp., *Penicillium* sp., *Phoma* spp., *Phyllosticta* sp., *Rhizoctonia* sp, *Rhizopus* sp., *Sordaria fimicola* (Batalla, 2014, Dirchwolf *et al.*, 2018; Gutiérrez y Cúndom 2009; Gutiérrez *et al.*, 2009, 2010; Pincirolí *et al.*, 2004; Sisterna y Carranza, 1990; Sisterna *et al.*, 1994; Sisterna y Dal Bello, 1998).

El manchado de grano de arroz es una de las enfermedades de importancia creciente en los cultivos de arroz de la región nordeste del país, por su amplia distribución en los últimos veinte años; se menciona a *Alternaria padwickii* como el principal patógeno asociado a semillas de arroz y que es causando de manchas foliares y además integra el complejo causal del manchado del grano (Lovato *et al.*, 2015).

1.7.2 Fuentes de inóculo

La semilla de arroz sirve como microcosmo importante de saprófitos y de microorganismos patógenos que la colonizan e invaden tanto en las etapas previas como posteriores a la cosecha; los tratamientos realizados a las semillas para controlar las enfermedades fúngicas transmitidas a través de ellas, resultan ser más seguros y económicos y ayudan prevenir el deterioro de los granos (Mohana *et al.*, 2009). Sin embargo, el hecho de que la enfermedad se pueda presentar externamente sobre las glumas e internamente sobre el endosperma, o en ambos, sugiere que aún las semillas limpias y desinfectadas pueden llevar dentro estructuras de microorganismos, sugiriendo que los patógenos involucrados son hongos de semilla (Batalla, 2014).

Es importante destacar que en los campos de producción de semillas el problema obliga al descarte de muchos lotes, ya que los hongos causantes de enfermedades pueden ser transmitidos por dicho órgano, siendo un eficiente agente de diseminación y un abrigo seguro para la sobrevivencia de patógenos. Su transmisión a campo puede originar enfermedades en la parte aérea, como manchas foliares y en vaina (Castaño, 1985; Malavolta y Bedendo, 1999; Mew y Gonzales, 2002; Ou, 1985; Webster y Gunnell, 1992). Mew y Gonzales (2002) mencionan que los microorganismos transportados por las semillas se pueden clasificar como patógenos, no patógenos y no patógenos con propiedades de control biológico. Además, no todos los patógenos transportados por la semilla de arroz, se transmite al campo cuando la semilla se ha desarrollado. La transmisión varía de un patógeno a otro y el mismo puede reaccionar de manera diferente cuando la semilla se siembra en diferentes condiciones de crecimiento.

1.7.3 Manejo de la micoflora de la enfermedad

El método más frecuentemente utilizado para el control de las enfermedades de semillas es el tratamiento con fungicidas (Mew y Misra, 1994). Su uso puede lograr un control eficaz y eficiente de los hongos transmitidos a través de ellas (Mohana *et al*, 2009), pero el uso continuo e indiscriminado de estos productos químicos han recibido una atención cada vez mayor. Esto es debido a que más patógenos se han vuelto resistentes a los fungicidas químicos utilizados, a la contaminación ambiental resultante, la toxicidad para los organismos no objetivo y los desequilibrios ecológicos (FRAC, <http://www.frac.info/docs/default-source/publications/pathogen-risk/pathogen-risk-list.pdf>). Debido a esto, actualmente existe una gran demanda de nuevos métodos para complementar las estrategias de manejo de las enfermedades existentes (Zhang *et al.*, 2013).

La concientización ecológica globalizada exige productos más naturales, lo que ha llevado a implementar el manejo integrado para una producción de semillas libres de residuos tóxicos. Dentro de éste, el control biológico y los derivados botánicos aparecen como nuevas alternativas que pueden contribuir a minimizar los daños causados por los patógenos y reducir el uso de productos químicos, ofreciendo seguridad para el medio ambiente y una eficiente opción agronómica.

1.8 Alternativas biológicas

1.8.1 Control biológico

Las aplicaciones de agentes de control biológico y sus metabolitos secundarios son estrategias importantes en el control agrícola contra las enfermedades de las plantas. Con el creciente interés en el control biológico, se ha demostrado que muchos agentes de control biológico como *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus vallismortis*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptomyces globisporus*, *Chaetomium globosum* y *Trichoderma harzianum* juegan papeles importantes en el control biológico de enfermedades de las plantas en la agricultura debido a su actividad biológica potencial (Zhang *et al.*, 2013).

1.8.1.1 *Trichoderma* spp.

Entre los agentes de control biológico, las especies del género fúngico *Trichoderma* spp. (Figura 3-A) se han estudiado desde hace más de 70 años (Samuels y Lodge, 1996). Debido a sus propiedades antagónicas, morfológicas y de cultivo se ha convertido en uno de los representantes fúngicos más comúnmente usados en este tipo de control. Estas propiedades de antagonismo se basan en la activación de diversos mecanismos como competencia por el espacio y los nutrientes, estimulando el crecimiento de las plantas y/o disparando los mecanismos de defensa de las mismas. Además, *Trichoderma* spp. micoparásita penetrando directamente las hifas del hospedador, otras veces produce enzimas extracelulares y/o antibióticos. Otro efecto importante de *Trichoderma* es que al estar en la rizósfera, induce a las plantas a producir fitoalexinas, proteínas relacionadas con la defensa (PR) y la acumulación de polímeros estructurales tales como callosa y lignina entre otros (Yedidia *et al.*, 1999). Especies del género *Trichoderma* han sido usadas para el control de patógenos foliares en plantas de la familia crucíferas, solanáceas y gramíneas (Elad y Kirschner, 1993; Michereff *et al.*, 1995; Scharen y Bryan, 1981).

En arroz, hay referencias de *Trichoderma* spp. como biocontrolador frente a patógenos fúngicos

(www.knowledgebank.irri.org/ericeproduction/.../Control_of_Rice_Diseases.pdf) y específicamente a patógenos transmitidos por semilla (Halgekar *et al.*, 2014; Khalili *et al.*, 2012; Watanabe *et al.*, 2005).

1.8.1.2 *Chaetomium* spp.

Por otro lado, los organismos endófitos, particularmente los hongos, han recibido una creciente atención en los años recientes. Este grupo de microorganismos vive asintómicamente dentro de tejidos vegetales sanos y ha mostrado poseer un gran potencial económico en áreas como la agronomía y la medicina. Tanto los patógenos como los endófitos, pueden co-existir en las plantas, pudiendo interactuar entre ellos.

Existen antecedentes con resultados promisorios sobre el empleo del endófito *Chaetomium* spp. (Figura 3-B) como agente biocontrolador. *Chaetomium* es uno de los más numerosos géneros de ascomicetes saprófitos con más de 300 especies en todo el mundo (Soytong *et al.*, 2001). 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. También involucra mecanismos de producción de antibióticos como el chaetoglobosin que suprime el crecimiento de patógenos como *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Phytophthora* y *Rhizoctonia* (Soytong *et al.*, 2001). Está citado como antagonista tanto de patógenos del suelo (Soytong *et al.*, 2001) como de patógenos foliares en cereales (Agarwal *et al.*, 2004; Soytong, 1991). Varias especies de *Chaetomium* han sido encontradas como endófitos en hojas de trigo (Dingle y McGee, 2003).

Algunas de estas especies como sus extractos culturales han reducido la severidad de la roya anaranjada del trigo (*Puccinia triticina*) (Dingle y McGee, 2003) y existen antecedentes para la mancha amarilla del trigo, causada por *Drechslera tritici-repentis*, sobre el empleo de *Chaetomium* spp. con resultados promisorios (Istifadah y McGee, 2006; Istifadah *et al.*, 2006). También hay citas de este hongo actuando como biocontrolador de otros patógenos de trigo como *Pythium ultimum* (Di Pietro *et al.*, 1992) y *Bipolaris sorokiniana* (Agarwal *et al.*, 2004). También se ha investigado el efecto antagónico de *Chaetomium* spp. en patógenos de arroz (www.knowledgebank.irri.org/ericeproduction/.../Control_of_Rice_Diseases.pdf); (Park *et al.*, 2005; Soytong, 1992a,b) y de patógenos de semillas de este cultivo (Soytong 1988).

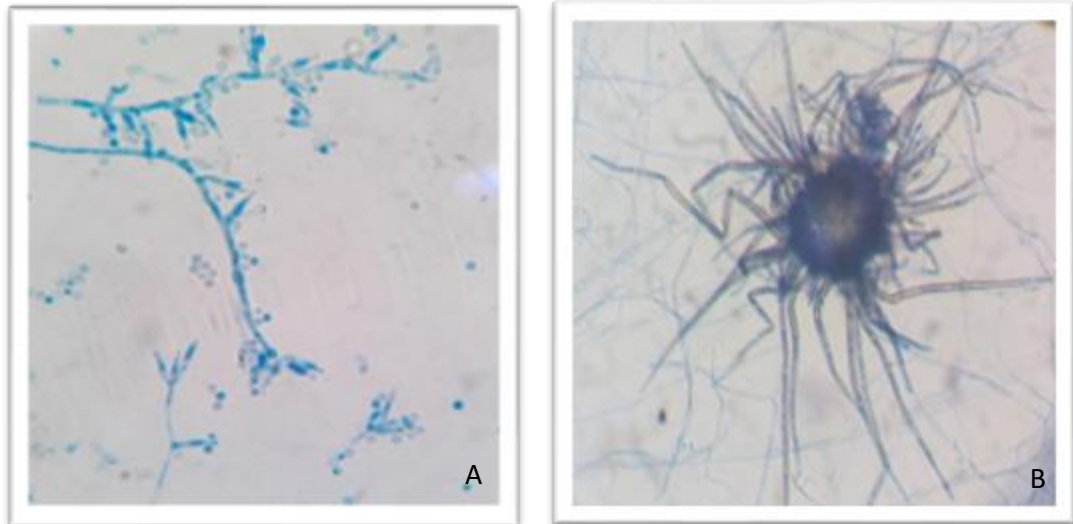


Figura 3. Vista microscópica de conidios de *Trichoderma* spp. (A); peritecio de *Chaetomium* spp. (B)

1.8.2 Derivados botánicos

En el ámbito mundial, las investigaciones relacionadas con la utilización de las plantas como materia prima de productos bioactivos experimentaron un auge extraordinario. Muchos compuestos del metabolismo de las plantas poseen actividad fungicida contra algunos fitopatógenos en general (Kumar *et al.*, 2010) y para hongos de semillas en particular (Dal Bello y Sisterna, 2010, 2015; Sisterna y Dal Bello, 2007). Para estos últimos existen además antecedentes locales (Alanis *et al.*, 2014; Lampugnani *et al.*, 2011; Pozueta *et al.*, 2009).

1.8.2.1 Extractos naturales

1.8.2.1.1 Extracto de Ajo

Entre los derivados botánicos, se ha señalado el efecto positivo que tiene el extracto de ajo (*Allium sativum*; Fam. *Liliaceas*) como antioxidante, antibacteriano, antifúngico, hipocolesterolémico, antivírico y antiparasitario. Ha sido citada su acción fungicida sobre siete especies de hongos: *Penicillium* sp.; *Aspergillus* sp.; *Fusarium* sp.; *Alternaria* sp.; *Colletotrichum* sp.; *Pythium* sp. y *Rhizoctonia* sp. Estas cualidades son atribuidas a que el ajo posee sustancias azufradas bioactivas como la alicina y alil-sulfuros (Arévalo, 1990). Con referencia al arroz, se citan pruebas de laboratorio con inhibición del crecimiento micelial para *Curvularia lunata* (Lalitha *et al.*, 2011; Sawatdikarn, 2011); otros autores (Ahmed *et al.*, 2002) probaron su eficiencia sobre *Bipolaris oryzae*, en ensayos *in vitro*.

La alicina es un componente oxidante producido por el ajo cuando sus células se rompen por la acción de un corte o triturado, permitiendo la interacción de la enzima aliinasa la cual cataliza la conversión de aliína en alicina, en contacto con el aire y pH superior a 3. La reacción se completa de 0,2 a 0,5 minutos después de haber iniciado. La alicina experimenta degradación en forma rápida, permitiendo la formación de nuevos compuestos sulfurados tales como sulfuro de dialílico, disulfuro de dialilo y trisulfuro de dialilo. Asimismo, en presencia del calor, la alicina puede transformarse en ajoeno y viniloditiínas. Los compuestos obtenidos del ajo pueden variar según las condiciones de temperatura, pH y el método de extracción empleado (Córdova-Betancourt, 2010)

El presente trabajo de investigación representa un abordaje preliminar en el control alternativo de los microorganismos asociados al manchado del grano/semilla de arroz, con miras a su posible aplicación. Considerando que esta micoflora, en diferentes situaciones de cultivo y manejo post-cosecha puede afectar los índices de calidad del producto, su estudio podría presentar un avance para el logro de una mejora en el alimento.

1.9 Hipótesis y Objetivos

1.9.1 Hipótesis

Las hipótesis planteadas fueron:

- a. Especies de los géneros *Chaetomium* spp. y *Trichoderma* spp. pueden tener un efecto antagónico sobre la micoflora asociada al manchado del grano/semilla de arroz.
- b. El extracto de ajo presenta eficiencia en controlar la micoflora asociada al manchado del grano/semilla de arroz.

1.9.2 Objetivos generales

- Evaluar la capacidad antagónica de diferentes aislamientos de *Chaetomium* spp. y *Trichoderma* spp. en la micoflora asociada al manchado del grano/semilla de arroz.
- Determinar el efecto del extracto de ajo sobre los hongos asociados al manchado del grano/semilla de arroz.

1.9.3 Objetivos particulares

- Aislar e identificar los hongos asociados al manchado del grano/semilla de arroz de distintas regiones productoras.
- Seleccionar y caracterizar morfológica y molecularmente los hongos más representativos asociados al manchado.
- Analizar la interacción de *Trichoderma* spp. y *Chaetomium* spp. con los hongos seleccionados en ensayos *in vitro*.
- Obtener el extracto de ajo en diferentes concentraciones y evaluar su efecto en el crecimiento micelial de los patógenos seleccionados.
- Evaluar el efecto antifúngico de los tratamientos biológicos y el extracto de ajo sobre la micoflora asociada al manchado del grano/semilla en ensayos *in vitro*.
- Evaluar el efecto de los distintos tratamientos sobre la germinación y vigor de la semilla.
- Determinar el efecto de cada uno de los tratamientos sobre un hongo patógeno foliar transmitido por semilla, en ensayos de invernáculo.

BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, M.A., Castrillo, W.A. y Belmonte, U.C. (2006). Trabajo especial: Origen, evolución y diversidad del arroz. *Agronomía Tropical*, volumen 56 n.2. Maracay, Venezuela.
- Agarwal, V.K., Singh, O. V., & Modgal, S. C. (1975) Influence of different doses of nitrogen and spacing on seed-borne infection of Rice. *Indian Phytopathology*, 28(2), 38-40.
- Agarwal, R., Tewari, A.K., Srivastava, K. D., & Singh, D.V. (2004) Role of Antibiosis in the Biological Control of Spot Blotch (*Cochliobolus sativus*) of Wheat by *Chaetomium globosum*. *Mycopathologia*, 157, 369 – 377.
- Ahmed, F., Khalequzzaman, K.M., Islam, N., Anam, M.K., & Islam, M.T. (2002) Effect of plant extracts against *Bipolaris oryzae* of rice under *in vitro* conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 5, 442-445.
- Alanis, D., Castro, F., Sisterna, M., y Lampugnani, G. (2014) Duración y efecto de derivados botánicos en la germinación de semillas de tomate platense. 3er. Congreso Argentino de Fitopatología, 4 al 6 de junio de 2014, San Miguel de Tucumán, Tucumán, Argentina.
- Arévalo C., H. A. (1990) Olerresinas Componentes de las especias. *Alimentaria*. Revista de tecnología e higiene de los alimentos, 6(25), 26-30. Bogotá, Colombia.
- Batalla, A. (2014) Incidencia del manchado de grano en arroz. Ingeniero Agrónomo y Asesor técnico en cultivo de arroz. Argentina. http://www.lafranqueraweb.com.ar/web/archivos/menu/Incidencia_del_manchado_de_grano_en_arroz.pdf.
- Castaño Zapata, J. (1985) Efecto del manchado del grano de arroz sobre algunos estados de desarrollo de la planta de arroz. *Arroz*, 34(338), 22-26.
- Chhabra, R. and Vij, L. (2019). Grain discoloration and its management an emerging threat to paddy cultivation. *Journal of Plant Diseases and Protection*. 127, 1-8. <https://doi.org/10.1007/s41348-01900272-2>
- Córdova-Betancourt, M. (2010) Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas. Instituto Politécnico Nacional. Tesis Maestría en ciencias en conservación y aprovechamiento de los recursos naturales. Santa Cruz Xoxocotlán, Oaxaca.
- Dal Bello, G., & Sisterna, M. (2010) Use of plant extracts as natural fungicides in the management of seed borne diseases. p. 51-66. En: “Management of fungal plant pathogens” CABI International. Ed. Arun Arya, A. Perelló. 388 pp. ISBN-13: 978 1 84593 603 7
- Dal Bello G., & Sisterna M. (2015) Use of natural plant compounds against fungal diseases of grains. p. 35-48. En: Sustainable crop disease management using

natural products. CABI International. Ed. S. Ganesan, K. Vadivel, J. Jayaraman. 413 pp. ISBN – 1-3: 978 1 78064 323 6.

- De Bernardi, L. A. (2017) Perfil del mercado de arroz. Recuperado el 20 de Julio de 2017, de Ministerio de Agroindustria: <http://www.agroindustria.gob.ar/new/0-0/programas/dma/granos/Perfil%20de%20Mercado%20de%20Arroz%202017.pdf>
- Di Pietro, A., Gut-Rella, M., Padhalattko, J.P., & Scheimm, F.K. (1992) Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium ultimum*, a causal agent of damping off. *Phytopathology*, 82, 131-135.
- Dingle J., & McGee, P.A. (2003) Some endophytic fungi reduce the density of pustules of *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in wheat. *Mycological Research*, 107, 310-316.
- Dirchwolf, P.M., Gutiérrez, S.A and Carmona, M.A. (2018) Assessment of grain discoloration in the main rice genotypes of Corrientes Province, Argentina. *Summa Phytopathologica*. DOI: 10.1590/0100-5405/178172
- Elad, Y., & Kirschner, B. (1993) Survival in the phylloplane of an introduced biocontrol agent (*Trichoderma harzianum*) and population of the plant pathogen *Botrytis cinerea* in modified by abiotic conditions. *Phytoparasitica*, 21, 303-313.
- Franzese, F. (2017) Situación Mundial y Nacional del Mercado de Arroz. XXVIII Jornadas Técnicas Nacionales del Cultivo de Arroz 2017. Concordia: Fundación Proarroz.
- Gutiérrez, S.A. (2002). Micoflora asociada a granos manchados de arroz. XI Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Río Cuarto, Córdoba, Argentina. pp. 29.
- Gutiérrez, S.A., Mazzanti de Castañón, M.A., y Cúndom, M.A. (2002). Hongos presentes en semillas de arroz del noreste Argentino. *Fitopatología*, 37(2), 156-163.
- Gutiérrez, SA., y Cúndom, MA. (2009) Incidencia y prevalencia de hongos en semillas de arroz. En: VI Congreso Latinoamericano de Micología, Mar del Plata.
- Gutiérrez, SA., Carmona, M., & Reis, EM., (2010) Methods for detection of *Alternaria padwickii* on rice seeds. *Journal of Phytopathology* 158(7-8), 523-526.
- Gutiérrez, S.A., y Cúndom, M.A. (2013). Guía para la identificación de enfermedades del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L) en la Provincia de Corrientes. Corrientes, Argentina.
- Halgekar, NY., Giri, GK., & Ashwini, C. (2014) Efficacy of Bioagents Against Seed Borne Fungi of Rice. *International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology*. Jul-Sept; 5(3):157-158. <http://imsear.hellis.org/handle/123456789/168075>

- Huang, S.W., Wang, L., Liu, L.M., Tang, S.Q., Zhu, D.F. and Savary, S. (2011a) Rice spikelet rot disease in China – 1. Characterization of fungi associated with the disease. *Crop Protection* 30 (1), 1-9.
- Huang, S.W., Wang, L., Liu, L.M., Tang, S.Q., Zhu, D.F. and Savary, S. (2011b). Rice spikelet rot disease in China – 2. Pathogenicity tests, assessment of the importance of the disease, and preliminary evaluation of control options. *Crop Protection* 30 (1), 10-17.
- Informes de cadena de valor. Arroz. Ministerio de hacienda de la Nación. Subsecretaria de programación microeconómica. Año 2 - N°33 Noviembre de 2017.
- Istifadah, N., & McGee, P. A. (2006) Endophytic *Chaetomium globosum* reduces development of tan spot in wheat caused by *Pyrenophora tritici-repentis*. *Australasian Plant Pathology*, 35(4), 411–418.
- Istifadah, N., Saleeba, J., & McGee, P. A. (2006) Isolates of endophytic *Chaetomium* spp. inhibit the fungal pathogen *Pyrenophora tritici-repentis* in vitro. *Canadian Journal of Botany*, 84(7), 1148- 1155.
- Khalili, E.; Sadravi, M.; Naeimi, S., & Khosravi, V. (2012) Biological control of rice brown spot with native isolates of three *Trichoderma* species. *Braz. J. Microbiol.*, 43(1), 297-305. doi: 10.1590/S1517-838220120001000035
- Kumar, A., Singh, P., & Dubey, N.K. (2010) Botanicals in agricultural pest management. En: *Management of fungal plant pathogens*. Eds. A. Arya y A. Perelló. CAB International. ISBN: 978-184593-603-7. 388 pp.
- Lalitha, V., Kiran, B., & Raveesha, K.A. (2011) Antifungal and antibacterial potentiality of six essential oils extracted from plant source. *Int. J. Eng. Sci. Technol. (IJEST)*, 3(4), 3029-3038.
- Lampugnani, G., Sisterna, M., Abramoff, C., Dal Bello, G., y Garat, J. (2011) Actividad antifúngica de derivados botánicos para el control de patógenos de semillas en tomate platense y ají vinagre. II Congreso Argentino de Fitopatología, 1,2 y 3 de junio de 2011, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
- Lovato Echeverría, A.D. y Gutiérrez, SA. (2012) Incidencia de *Alternaria padwickii* (Ganguly) en semillas de arroz. XVIII Reunión de comunicaciones Científicas y Tecnológicas. Universidad Nacional del Nordeste.
- Lovato Echeverría, A.D., Gutiérrez, S. A. y Carmona, M.A. (2015) Evaluación de medios de cultivos en el crecimiento de *Alternaria padwickii*. *Fitosanidad*. 19(1):69-71.
- Malavolta, V.M.A, Bedendo, I.P. (1999) Daños debidos a manchas de granos de arroz causadas por hongos. *Summa Phytopathologica*, 25(4):324-330.

- Marchionatto, J.B. (1943). El “manchado” de los granos de arroz y los hongos que lo acompañan. *Revista Argentina de Agronomía*, 10(2):114-116.
- Mew, T.W. and Misra, J.K. Eds. (1994) A Manual of Rice Seed Health Testing. *IRRI International Rice Research Institute*, 113 p. Manila, Philippines.
- Mew, T.W., & Gonzales, P. eds. (2002) A handbook of rice seedborne fungi. *IRRI International Rice Research Institute, and Enfield, N.H (USA)*. Science Institute, Inc 83p. Los Baños, Philippines.
- Michereff, N., Da Silveira, S., Reis, A., Mariano R. (1995) Greenhouse screening of *Trichoderma* isolates for control of *Curvularia* leaf spot of Yam. *Mycopathology*, 130, 103-108.
- Mohana, D.C., Sridharamurthy, S., and Koteswara, A.R. (2009). Antifungal activity of 2-hidroxy-4-methoxybenzaldehyde isolated from *Decalepsis hamiltonii* (Wight & ARN) on seed-borne fungi causing biodeterioration of paddy. *Journal of Plant Protection Research* 49(3):250-256.
- Neningen, H., Barrios, LM. & Hidalgo, EI. (2002) Micobiota asociada y patogénica presente en semillas de arroz (*Oryza sativa* L.) nacional e importada en Cuba. *Phytopathology*, 92(6), S128 (Abstracts).
- Ou, S.H. (1985). Rice Diseases. 2nd, ed., Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, UK, 380 p.
- Park, JH., Choi, GJ., Jang, KS., Lim, HK., Kim, HT., Cho, KY, & Kim, JC. (2005) Antifungal activity against plant pathogenic fungi of chaetoviridins isolated from *Chaetomium globosum*. *FEMS Microbiology Letters*, 252(2), 309–313. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.femsle.2005.09.013>
- Pawlizki, M.E., Peichoto, M.C. y Pachecoy, M.I. (2020). Evaluación fuente-destino en tres genotipos de arroz: implicancias en el llenado de granos y en la estructura del tallo. Proyecto Arroz: Resultados campaña 2019/2020. Volumen XXVIII. Primer encuentro técnico virtual del cultivo de arroz en el nordeste argentino. Corrientes, Argentina. INTA.
- Pinciroli, M., Sisterna, M.N, Bezus, R. & Vidal, A. (2003) Manchado del grano de arroz: efecto de la fertilización nitrogenada. *Rev. Fac. Agron.* 105 (2): 88-96.
- Pinciroli, M., Sisterna, MN., Bezus R. y Vidal, A. (2004) Manchado del grano de arroz: efecto de la fertilización nitrogenada. *Revista de la Facultad de Agronomía (UNLP)*, 105 (2):88-96. Argentina.
- Pinciroli, M.; Gribaldo, A.; Vidal, A.; Bezus, R.; Sisterna, M.N. (2013). Mycobiota evolution during storage of paddy, brown and milled rice in different genotypes. *Summa Phytopathologica*, 3, 157-161.

- Pinciroli, M. Ponzio, N.R., Salsamendi, M. (2015). El arroz: alimento de millones. 1a ed. Tandil: Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. E-Book. ISBN 978-950-658-374-3
- Pozueta, J.L., Dal Bello, G.M., Ringuelet J., Sisterna, M.N. (2009) Actividad antifúngica de los extractos vegetales para el control de hongos patógenos en semillas de cereales. XIII Jornadas Fitosanitarias Argentinas, 30 de septiembre al 2 de octubre de 2009. Termas de Río Hondo, Sgo. del Estero, Argentina.
- Quintana, L., Gutiérrez, S., Arriola, M. (2017) Microorganismos asociados al manchado de grano del arroz (*Oryza sativa*) en el distrito de Coronel Bogado. Revista sobre Estudios e Investigaciones del Saber Académico. Año 11-Nº 11 Itapúa, diciembre de 2017. ISSN 2078-5577
- Roy, A.K. (1983) Rice grain discoloration in Assam, India. *International Rice Research Newsletter*, 8(5), 10.
- Samuels, G.J. and Lodge, D.J. (1996) Three species of *Hypocrea* with stipitate stromata and *Trichoderma* anamorphs. *Mycologia*, 88(2): 302-315. doi: 10.2307/3760935
- Sawatdikarn, S. (2011) Antifungal activity of twenty-four medicinal crude extracts against *Curvularia* sp., the pathogen of dirty panicle disease in rice. 37th Congress on Science and Technology of Thailand. Disponible en: <http://gallery.aru.ac.th/~sci/QA/SAR%2054%20PDF.pdf>
- Scharen, A., & Bryan, D. (1981) A possible control agent for net blotch of barley. *Phytopathology*, 71, 902-903.
- Sisterna, M.N. y Carranza, M.R. (1990) *Curvularia oryzae-sativae* sobre arroz (*Oryza sativa*) en la Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 26(3-4), 260-261. Argentina.
- Sisterna, M.N., Lori, G.A. y Marassi, J.J. (1994). Sintomatología y hongos asociados al manchado del grano de arroz en el cultivar Irga 409. *Rev. de la Fac. de Agronomía, U.N.L.P.*, 70, 13-21. Argentina.
- Sisterna, M.N. and Dal Bello, G. (1998) *Curvularia protuberata*, a new seed-borne pathogen of rice. *Acta Phytopathologica et Entomologica Hungarica*, 33(1-2), 111-114. Hungría.
- Sisterna M.N., Pinciroli, M., Bezus, R., y Vidal, A. (2005) Manchado del grano de arroz (cáscara e integral): micoflora asociada bajo dos sistemas de manejo de agua. XIII Congreso Latinoamericano de Fitopatología y III Taller de la Asociación Argentina de Fitopatólogos, 19-22 de abril de 2005, Villa Carlos Paz, Córdoba, Argentina.
- Sisterna M.N. and Dal Bello, G. (2007) Natural plant extracts: an alternative control of seed borne fungi. Part. I, pp:15-36 En: "Seed Borne Diseases:

Ecofriendly Management". Eds. Arun Arya, C. Mónaco. University of Baroda; Scientific Publishers, Jodhpur, India, 326 pp. ISBN 81-7233-468-0

- Soyong K. (1988) Identification of species of *Chaetomium* in the Philippines and screening for their biocontrol properties against seed borne fungi of rice. <http://agris.fao.org/agris-search>
- Soyong K. (1991) Antagonism of *Chaetomium globosum* to leaf spot disease of corn (*Zea mays*). 29th Kasetsart University Annual Conference, Bangkok (Thailand), 4-7 Feb 1991.
- Soyong, K. (1992a) Biological Control of rice blast disease by seed coating with antagonistic fungi. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 14:59-65.
- Soyong, K. (1992b) Antagonism of *Chaetomium cupreum* to *Pyricularia oryzae*. J. of Plant Protection in the Tropics, 9(3),17-23.
- Soyong K., Kanokmedhakul S., Kukongviriyapa V., & Isobe M. (2001) Application of *Chaetomium* species (Ketomium®) as a new broad spectrum biological fungicide for plant disease control: A review article. Fungal Diversity, 7:1-15.
- Watanabe, S., Kumakura, K., Kato, H., Iyozumi, H., Togawa, M., and Nagayama, K. (2005) Identification of *Trichoderma* SKT-1, a biological control agent against seedborne pathogens of rice. J. Gen Plant Pathol, 71, 351-356.
- Webster, R.K., Gunnell, P.S. eds. (1992) Compendium of Rice Diseases. St. Paul, Minnesota, USA. *The American Phytopathological Society*. pp:92.
- Yedidia, I, Benhamou, N, and Chet, I. (1999) Induction of defense responses in cucumber plants (*Cucumis sativus* L.) by the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. Applied and Environmental Microbiology, 65(3):1061-1070.
- Zhang, G. Wang, F. Qin, J. Wang, D. Zhang, J., Zhang, Y., Zhang, S. and Pan, H. (2013). Efficacy assessment of antifungal metabolites from *Chaetomium globosum* No-05, a new biocontrol agent, against *setosphaena turcicca*. Biological Control. 64:90-98.

CAPITULO II

EVALUACIÓN DE LA INCIDENCIA Y AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

2.1 Introducción

La sanidad de la semilla refiere a la presencia o ausencia de organismos causantes de enfermedades (hongos, bacterias y virus) y plagas (insectos) (ISTA, 2011). La mayoría de los cultivos destinados a la producción de alimentos pueden sufrir algún tipo de enfermedad y sus agentes causales pueden ser transmitidos a través de la semilla, por tal motivo un buen cultivo debe iniciarse con la siembra de semillas de alta calidad, que incluyan atributos como pureza, poder germinativo, vigor, entre otros (Gutiérrez *et al.*, 2010). La semilla manchada es fuente de inóculo primario y un eficiente medio de dispersión de patógenos importantes y de microorganismos saprófitos. (Gutiérrez *et al.*, 2010, Reis *et al.*, 1999). Las semillas transportan patógenos que pueden causar daños a la germinación, o cuando son transmitidas a los órganos aéreos pueden causar enfermedades en el cultivo afectando la producción (Moraes, 1995).

Los procedimientos de análisis de la sanidad de las semillas implican técnicas como: examen directo de semillas secas, examen de semillas germinadas, examen de organismos eliminados por lavado, examen de plantas en crecimiento (por ejemplo, test de síntomas en plántulas), métodos de conteo de embriones, técnicas moleculares y serológicas (Mew & Gonzales, 2002). Para la cuantificación de los hongos presentes en las semillas o para la detección de determinados patógenos, existen medios de cultivos selectivos para patógenos específicos y medios de cultivo no selectivos. Morato de Amaral (1987) menciona algunos métodos utilizados en la detección de los principales patógenos asociados a los granos/semillas de arroz como: a) Método de papel filtro, b) Método de papel filtro con congelamiento, c) Método de la placa de agar y d) Método del tubo de ensayo con agar. Mew & Misra (1994) consideran a los métodos del papel de filtro y de la placa agar, como métodos patrones para el análisis de semillas de arroz.

Con los avances en las técnicas moleculares, el énfasis en la identificación y taxonomía de hongos ha cambiado de un enfoque morfológico (por ejemplo, tamaño y forma de las esporas) a un enfoque más funcional basado en aspectos del ciclo de vida, mecanismos de producción y liberación de esporas, relaciones de ADN y atributos fisiológicos. Las técnicas de análisis de ADN como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y el análisis de ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) son las técnicas más comúnmente usadas para la detección de microorganismos en semillas y estudios de taxonomía (Mew & Gonzales, 2002).

2.1.1 Objetivo

El objetivo planteado en el presente capítulo fue:

- Aislar e identificar los hongos asociados al manchado del grano/semilla de arroz de distintas regiones productoras.

2.2 Materiales y Métodos

2.2.1 Muestras

Se utilizaron las muestras de granos/semillas de arroz de ensayos conducidos por el Programa Arroz de Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, provenientes de tres localidades: Urdinarrain (32°41' de latitud Sur-58°53' de longitud Oeste), Villa Elisa (32°.10' latitud Sur-58 ° 24' longitud Oeste), ubicados en la Provincia de Entre Ríos y Los Hornos (34 ° 52' Latitud Sur-57 ° 57' Longitud Oeste) ubicado en la Provincia de Buenos Aires. De cada localidad se analizaron los genotipos pertenecientes a la variedad Yeruá y la línea H-419.

2.2.2 Porcentaje de incidencia (%)

A través del examen visual se determinó el porcentaje de incidencia (%) de la enfermedad (porcentaje de grano manchado). Se tomaron 300 granos/semillas de cada una de las muestras y se contabilizaron aquellos en los que se observaron manchas del tipo puntuaciones (puntos negros u oscuros en su superficie) hasta manchas que cubrían gran parte del grano/semilla (Figura 1).

Se realizó un ANOVA una vía, donde las fuentes de variación resultaron en un caso las localidades (Los Hornos, Villa Elisa, Urdinarrain), y en otro los genotipos (Yerua y H419). Las medias se compararon por el test de Duncan, con una probabilidad de 5 % ($p \leq 0,05$). En todos los casos se utilizó la versión libre de InfoStat estudiantil, año 2017 (InfoStat-Statistical Software).



Figura 1. Comparación de granos/semillas de arroz con mayor (A) y menor (B) grado de manchado.

2.2.3 Aislamiento de microorganismos

2.2.3.1 Micoflora del grano/semilla de arroz

El total de los microorganismos pertenecientes a la micoflora del grano/semilla de arroz se aislaron a partir de los granos/semillas (manchados y no manchados), mediante el método del agar, según normas impartidas por la International Seed Testing Association (ISTA, 2011) (Neergaard, 1979).

Los granos/semillas se desinfectaron previamente con hipoclorito de sodio al 5% durante 10 minutos, posteriormente se lavaron con agua destilada estéril y se secaron sobre papel de filtro estéril; se sembraron 100 semillas en cajas de Petri con medio de cultivo agar papa glucosado al 2% (APG), que contenían los granos/semillas de arroz para cada localidad (Urdinarrain, Villa Elisa y Los Hornos) y de cada genotipo perteneciente a la variedad Yeruá y a la línea H-419, se mantuvieron en cámara de cría climatizada ($21^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$; 75% HR; 12hs de luz + UV/12hs de oscuridad). Se realizaron dos repeticiones de este ensayo.

Una vez desarrolladas las colonias se contabilizaron las mismas y se aislaron los agentes fúngicos en tubos de repique para su identificación, la cual se realizó mediante la observación del crecimiento de las colonias y la descripción de las características morfológicas como: tamaño, forma, coloración, distribución y agrupación de las estructuras vegetativas y/o reproductivas con el empleo de microscopio óptico y estereoscopio.

Para la determinación género/especie, se usaron las claves taxonómicas y mediante observación microscópica se compararon las estructuras fúngicas siguiendo la bibliografía específica (Booth, 1977; Ou, 1985; Ellis, 1971, 1976; Sivanesan, 1987).

Se calculó la presencia fúngica mediante la suma de las colonias de los microorganismos aislados a partir de los granos/semillas (manchados y no manchados) en cada repetición, dichos microorganismos se agruparon por géneros y se realizó un ANOVA una vía, donde las fuentes de variación resultaron en un caso las localidades (Los Hornos, Villa Elisa, Urdinarrain), y en otro los genotipos (Yerua y H419). Las medias se compararon por el test de Duncan, con una probabilidad de 5 % ($p \leq 0,05$). En todos los casos se utilizó la versión libre de InfoStat estudiantil, año 2017 (InfoStat-Statistical Software).

De los aislamientos obtenidos y previa identificación morfológica, se seleccionaron aquellos hongos de mayor importancia para el manchado y con mayor potencial de daño en planta; para luego efectuar su caracterización morfológica/molecular y utilizarlos en ensayos *in vitro* e *in vivo* con los distintos tratamientos, *Trichoderma* spp., *Chaetomium* spp. y extracto de ajo.

2.2.3.2 Hongos Antagonistas

Los hongos antagonistas fueron obtenidos de la siguiente manera:

- a) Se utilizaron 7 cepas de *Trichoderma harzianum* pertenecientes al CIDEFI, las cuales se han aislado e identificado de ensayos previos de biocontrol. En Moya, *et al.* (2018) se hace referencia a la caracterización morfocultural y molecular de las cepas de *Trichoderma harzianum* utilizadas en el desarrollo de esta tesis de Maestría.

Las especies estudiadas de *Trichoderma harzianum* fueron nombradas como sigue: T2 (cepa 1), T3 (cepa 3), T4 (cepa 4), T7 (cepa 7), T8 (cepa 8), T9 (cepa 9) y T10 (cepa 10).

- b) Se utilizaron 4 cepas de *Chaetomium* spp. pertenecientes al CIDEFI y aislados previamente de plantas de cebada. Las especies estudiadas de *Chaetomium* spp. fueron nombradas como sigue: C2 (cepa 2), C5 (cepa 5), C6 (cepa 6) y C7 (cepa 7).

c) Aislamientos de las plántulas de arroz

Otros aislamientos se obtuvieron a partir de plántulas de arroz, sin presencia de síntomas y germinadas a partir de los granos/semillas de arroz provenientes de las tres localidades (Urdinarrain, Villa Elisa y Los Hornos), mediante métodos fitopatológicos de rutina. Las partes de hoja cortadas se desinfectaron previamente con alcohol al 70% (minuto y medio), luego en hipoclorito al 5% (minuto y medio) y posteriormente se lavaron con agua destilada estéril y se secaron sobre papel filtro estéril. Se sembraron en cajas de Petri con medio de cultivo agar papa glucosado (APG), y se mantuvieron en cámara de cría climatizada ($21^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$; 75% HR; 12hs de luz + UV/12hs de oscuridad).

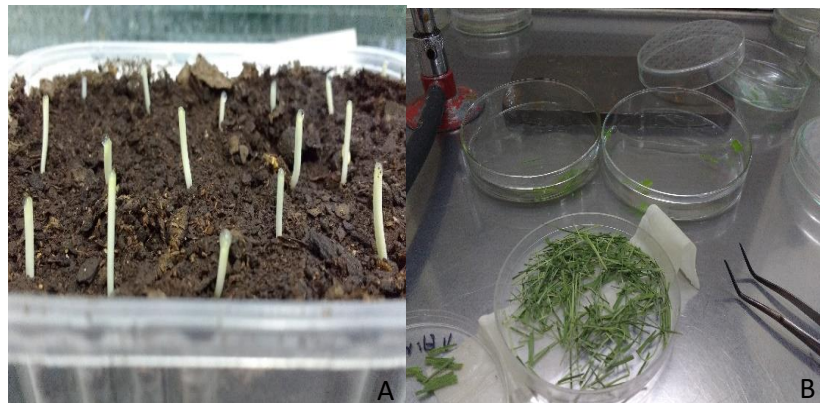


Figura 2. Crecimiento de las plántulas de arroz (A). Desinfección y siembra de las hojas obtenidas a partir de las plántulas de arroz para los aislamientos de *Chaetomium* spp. (B).

2.3 Resultados

2.3.1 Porcentaje de incidencia (%)

El porcentaje de grano manchado (%) se determinó para el año 2016. En las diferentes muestras de grano/semilla se determinó la incidencia en los dos genotipos y las tres localidades (Figura 3). Las muestras de Yerúa presentaron valores de 50%; 18,7% y 35% en Los Hornos, Villa Elisa y Urdinarrain, respectivamente y las de H-419 mostraron valores de 32%; 13,7% y 21,7% en las mismas localidades.

Para dar continuidad a los ensayos, se eligió la variedad Yerúa de la localidad de Los Hornos (ubicada en la Provincia de Buenos Aires), la cual obtuvo el más alto porcentaje de grano manchado para el año 2016. Teniendo en cuenta lo anterior para los granos/semillas de la misma localidad y genotipo, se determinó el porcentaje de incidencia para el año 2018 y se confirmó que era relevante (57%).

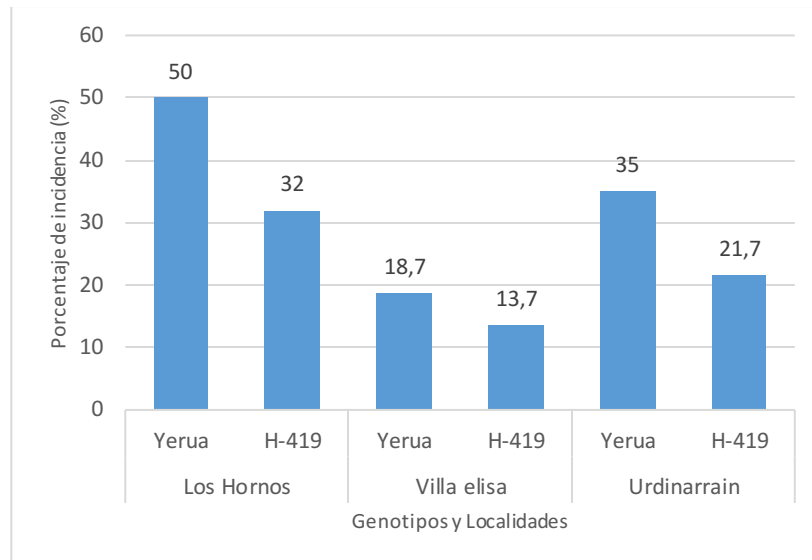


Figura 3. Porcentaje de incidencia para las muestras en el año 2016 (localidades y genotipos).

2.3.2 Aislamiento de microorganismos

2.3.2.1 Micoflora del grano/semilla de arroz

En los ensayos *in vitro* de granos/semillas de arroz se obtuvieron colonias de diferentes agentes fúngicos, dichos aislamientos se mantuvieron en tubos de repique para posterior identificación (Figura 4).



Figura 4. Crecimiento de las colonias de los hongos presentes en los granos/semillas de arroz provenientes de la localidad de Los Hornos (La plata, Provincia de Buenos Aires).

Los datos de presencia fúngica por localidad presentaron valores de 10,2; 10 y 10,5% en Los Hornos, Villa Elisa y Urdinarrain, respectivamente y por genotipo se mostraron valores de 10,2 y 10,3% de Yerúa y H-419, respectivamente. No se encontraron diferencias significativas en los porcentajes de presencia fúngica por localidad, ni por genotipo, los valores se detallan a continuación (ver figuras 5 y 6).

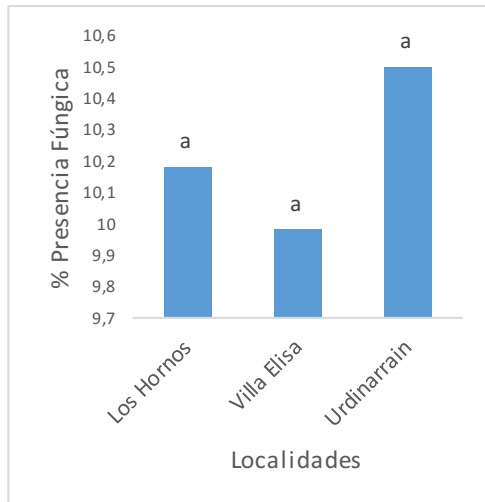


Figura 5: Porcentaje de presencia fúngica por localidad. Letras distintas expresan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test de Duncan ($p < 0,05$).

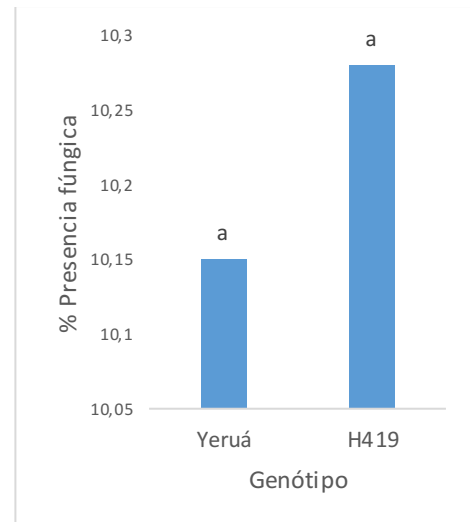


Figura 6: Porcentaje de presencia fúngica por genotipo. Letras distintas expresan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test de Duncan ($p < 0,05$).

Se contabilizaron la cantidad de colonias, identificándose por su morfología y mediante observaciones microscópicas los siguientes géneros fúngicos: *Alternaria* spp., *Bipolaris* spp., *Curvularia* spp., *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp., *Exserohilum* spp., *Fusarium* spp., *Nigrospora* spp., *Trichoderma* spp. y las especies que no fueron identificadas se etiquetaron como Sin Identificar (SI).

Tabla 1: Número de colonias de los géneros fúngicos encontrados en las siembras (primera repetición) en los granos/semillas de arroz manchado y no manchado del año cosecha 2016

	LOS HORNOS		VILLA ELISA		URDINARRAIN		TOTAL Yeruá	TOTAL H-419
	Yeruá	H-419	Yeruá	H-419	Yeruá	H-419		
<i>Epicoccum</i> spp.	27	13	3	2	16	8	46	23
<i>Alternaria</i> spp.	50	58	58	28	30	25	138	111
<i>Fusarium</i> spp.	10	17	2		5	8	17	25
<i>Bipolaris</i> spp.					1		1	-
<i>Nigrospora</i> spp.	10	10	22	51	34	33	66	94
<i>Curvularia</i> spp.		1			4	1	4	2
<i>Cladosporium</i> spp.			4				4	-
<i>Exserohilum</i> spp.							-	-
<i>Trichoderma</i> spp.	2		1				3	-
SI			15	24	15	30	30	54

Tabla 2: Número de colonias de los géneros fúngicos encontrados en las siembras (segunda repetición) en los granos/semillas de arroz manchado y no manchado del año cosecha 2016

	LOS HORNOS		VILLA ELISA		URDINARRAIN		TOTAL Yeruá	TOTAL H-419
	Yeruá	H-419	Yeruá	H-419	Yeruá	H-419		
<i>Epicoccum</i> spp.	22	18	5	5	14	13	41	36
<i>Alternaria</i> spp.	49	46	51	43	29	29	129	118
<i>Fusarium</i> spp.	10	12	18	8	2	4	30	24
<i>Bipolaris</i> spp.		1			1		1	1
<i>Nigrospora</i> spp.	21	21	13	35	40	29	74	85
<i>Curvularia</i> spp.	1	1			2	1	3	2
<i>Cladosporium</i> spp.			2	2			2	2
<i>Exserohilum</i> spp.					1		1	-
<i>Trichoderma</i> spp.							-	-
SI	1	6	2	5	16	29	19	40

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

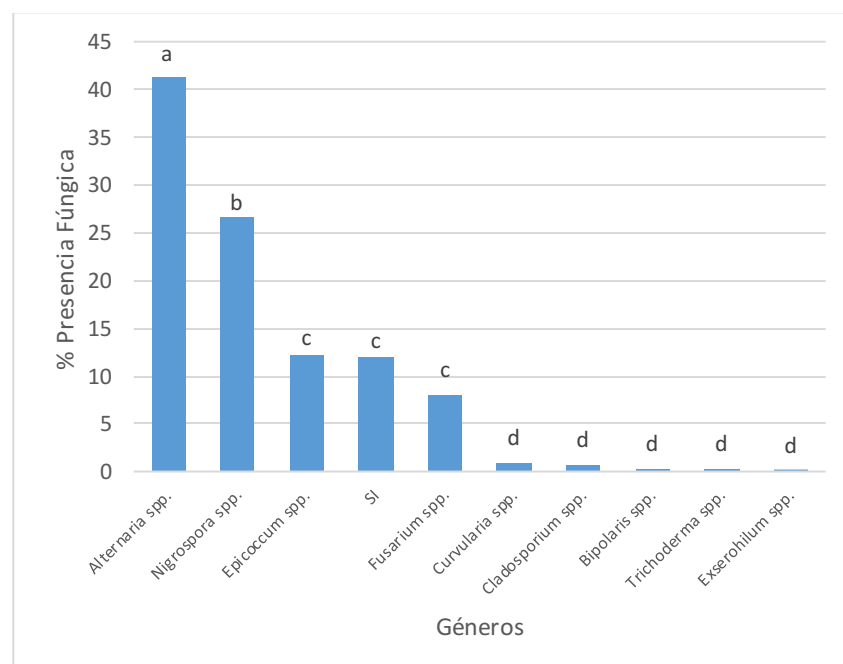


Figura 7. Porcentaje de presencia fúngica por géneros de las muestras de granos/semillas de arroz (2 genotipos y 3 localidades). Letras distintas expresan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test de Duncan ($p < 0,05$).

De este análisis preliminar, como se expresó anteriormente, se seleccionó la variedad Yeruá de la localidad de Los Hornos (Partido de La Plata) debido a los valores de mayor porcentaje de incidencia. De los microorganismos patógenos presentes y aislados, se seleccionaron dos (2) hongos “dematiáceos” de estructuras oscuras similares a *Curvularia* spp. y *Bipolaris* spp. (ambos aislados del genotipo Yeruá provenientes de Urdinarrain) y un (1) hongo “moniliáceo” de estructuras hialinas con características similares a *Fusarium* spp. (aislado del genotipo Yeruá proveniente de Los Hornos), los cuales debido a su importancia para la enfermedad y por su mayor potencial de daño en planta serán utilizados en ensayos posteriores frente a los tratamientos con los hongos antagonistas (*Trichoderma harzianum* y *Chaetomium* spp.) y el extracto de ajo.

2.3.2.2 Hongos Antagonistas

2.3.2.2.1 Aislamientos de plántulas de arroz

Se obtuvieron 3 aislamientos de *Chaetomium* spp. a partir de plántulas de arroz, germinadas de los granos/semillas provenientes de las tres localidades estudiadas; fueron nombrados como sigue:

Tabla 3: Aislamientos de *Chaetomium* spp. por localidad

LOCALIDAD	NOMBRE
Los Hornos (partido de La Plata)	C1 (Aislamiento 1)
Los Hornos (partido de La Plata)	C3 (Aislamiento 3)
Villa Elisa (Entre Ríos)	C4 (Aislamiento 4)

2.4 Discusión

La micoflora asociada al manchado del grano/semilla de arroz presente en las muestras analizadas, se agrupó en 9 géneros y concuerda con resultados de investigaciones a nivel nacional (Gutiérrez *et al.*, 2002; Pinciroli *et al.*, 2003, 2013; Sisterna *et al.*, 1994) e internacional (Neninger *et al.*, 2002; Ou, 1972).

En el presente estudio los géneros *Alternaria* spp. y *Nigrospora* spp. mostraron una alta frecuencia de aparición en las dos repeticiones, coincidiendo con los resultados de Mew & Gonzales (2002) que además, mencionan la detección de un total de más de 80 hongos en semillas de arroz, alrededor de 20 especies de patógenos fúngicos y una variación en

la frecuencia de detección. Marchio (2016) menciona a los géneros *Alternaria* spp. y *Epicoccum* spp. con mayor presencia en la localidad de La Plata, mientras que *Nigrospora* spp. tuvo mayor presencia en la localidad de Urdinarrain, resultados similares a los reportados en este estudio.

Pineda *et al.*, (2007) ha reportado un porcentaje de infección generalmente bajo en semilla, excepto para *Curvularia oryzae* y *Nigrospora* spp. Este último género fue detectado en todas las partes de la semilla presentando coloración gris ceniza con puntos negros, con incidencias de 24%, 16% y 6% para las tres variedades estudiadas. En Ecuador, Briones Huacón (2014) ha mencionado a *Curvularia* spp. y *Nigrospora* spp. como los microorganismos aislados de semillas de arroz con mayor porcentaje de incidencia con valores de 25-40% y 20-50%, respectivamente. Valores cercanos a los encontrados en nuestro estudio para *Nigrospora* spp.

En Pincioli *et al.*, (2003) de las especies halladas en el análisis de sanidad de semillas, *Alternaria alternata* fue el organismo con mayor porcentaje de contaminación. Según Ou (1985) y Neningen *et al.*, (2002) el género *Alternaria* spp. tiene varias especies parasitando semillas de arroz y existen registros de ser el de mayor presencia en granos con manchado reportados por Broggi *et al.*, (2007) y Ou, (1985). De Farias *et al.* (2007) han reportado una mayor prevalencia de *Alternaria* spp., *Bipolaris* spp. y *Nigrospora* spp. con valores de 9,61%, 9,3% y 8,56% respectivamente. Nuestros resultados fueron mucho mayores para *Alternaria* spp. y *Nigrospora* spp. y más bajos para *Bipolaris* spp., con valores de 41,3%, 26,6% y 0,3% respectivamente. Gutiérrez (2002) registra a *Alternaria padwickii*, *A. longissima* y *A. alternata* para las zonas de cultivo con temperaturas más elevadas.

Pineda *et al.* (2007) señalan que *Nigrospora* spp., *Cladosporium* spp. y *Curvularia oryzae*, no constituyen problemas de tipo patológico en arroz y muchas veces están presentes como hongos saprófitos en el tejido dañado; sin embargo, en otras regiones del mundo, estos mismos son señalados como fitopatógenos (Marchio, 2016). Winter *et al.* (1974); Sisterna *et al.* (1994) y Gutiérrez (2002), citan a las especies de *Epicoccum* spp. produciendo la llamada mancha roja del grano. Si bien no son considerados parásitos virulentos, su presencia es frecuente y constante en el complejo fúngico causante del manchado en Argentina.

Los porcentajes de presencia fúngica por localidad y por genotipo no presentaron diferencias significativas, sin embargo se observa una mayor presencia de hongos en la localidad de Urdinarrain; Estrada y Sandoval (2001) mencionan que es importante tener en cuenta que el manchado de los granos es una enfermedad muy compleja determinada por la interacción patógeno-hospedante-ambiente, lo que podría explicar las diferencias detectadas entre ambientes y genotipos.

Con respecto a la incidencia (porcentaje de grano manchado), el porcentaje fue superior para el genotipo Yeruá, aun cuando el genotipo H-419 presentó mayor cantidad de especies fúngicas. Según Batalla (2014), la micoflora que afecta al grano manchado puede presentar variación de acuerdo al mayor o menor grado de susceptibilidad de cada genotipo, se ha informado que en la cáscara de arroz están presentes aminoácidos proteicos y ácidos grasos, entre otros compuestos, que le confieren alto valor nutricional y pueden favorecer el desarrollo de hongos. Al estar compuesta por el pericarpio y la testa (siendo ésta última una membrana semipermeable) posibilitaría el paso hacia el interior de microorganismos que se pueden alimentar también de la capa de aleurona que rodea al endosperma y al embrión, lo que explica la presencia de esporulación, tanto en granos manchados como en granos aparentemente sanos. Además, es posible que las condiciones climáticas, las cuales no pudieron verificarse, influyan presentando diferencias entre genotipos como lo encontrado por Pinciroli *et al.* (2003) y Cárdenas Travieso *et al.* (2004).

De igual manera los porcentajes de presencia fúngica puede atribuirse a una mayor competencia interespecífica entre los hongos presentes en ambos genotipos, la falta o ineficacia en las medidas preventivas para el manejo de la enfermedad en campo, unido a las condiciones favorables para el desarrollo de la mayoría de los hongos (Rivero-González *et al.*, 2012).

Algunos autores han estudiado en profundidad esta enfermedad (Gutiérrez, 2002; Gutiérrez *et al.*, 2002; Gutiérrez y Cúndom, 2009; Mamone y Gaetán, 1999, Sisterna *et al.*, 1994, Pinciroli *et al.*, 2003), y han identificado numerosos hongos asociados al manchado: *Alternaria padwickii*, *A. longissima*, *Curvularia lunata*, *C. protuberata*, *C. pallescens*, *Bipolaris oryzae*, *Phoma* spp., *Epicoccum* spp., *Fusarium semitectum*, *F.*

equiseti, *F. graminearum*, *F. oxysporum*, *Microdochium oryzae*, *Nigrospora* spp., *Cercospora oryzae*, *Cladosporium* spp., *Phyllosticta* spp., *Rhizoctonia* spp., *Rhizopus* spp., *Penicillium* spp., *Aspergillus flavus* y *A. niger*.

La elección de los tres géneros estudiados frente a los tratamientos biocontroladores (tratamientos biológicos y extracto de ajo): *Bipolaris* spp., *Curvularia* spp. y *Fusarium* spp. fueron coincidentes con otros trabajos de antagonismo (Akila y Ebenezar 2009), donde *T. harzianum* obtuvo un porcentaje de inhibición de 66,85%, 45,51% y 59,89% frente a *D. oryzae*, *C. lunata* y *F. moniliforme* respectivamente, valores por encima de los resultados obtenidos en este estudio.

La composición de la flora fúngica en el grano de arroz puede estar influenciada por las condiciones meteorológicas de temperatura y precipitación durante el periodo de llenado del grano (Marchio, 2016). De Farias *et al.* (2007) mencionan que la sanidad de las semillas varía de un año a otro y de un lugar a otro, dependiendo de las variaciones naturales en las condiciones ambientales, la prevalencia de razas patógenas, la susceptibilidad de los cultivares y el manejo de las prácticas culturales.

BIBLIOGRAFÍA

- Akila, R. and Ebenezar, E. G. (2009) Ecofriendly approaches for the management of grain discolouration in rice. *J. Biol. Control*, 23(2):175-180.
- Batalla, A. (2014) Incidencia del manchado de grano en arroz. Ingeniero Agrónomo y Asesor técnico en cultivo de arroz. Argentina. http://www.latranqueraweb.com.ar/web/archivos/menu/Incidencia_del_manchado_de_grano_en_arroz.pdf.
- Booth, C. (1977) *Fusarium*. Laboratory guide to the identification of the major species. *Commonwealth Mycological Institute*. England.
- Briones, Huacón, G.L. (2014). Tesis de grado titulada “Calidad de semillas de arroz en función de la incidencia y severidad de enfermedades en la zona de Daule”. Universidad de Guayaquil. Facultad de Ciencias Agrarias. Ecuador.
- Broggi, L. E; Gonzales H. H. L; Resnik, S. L., Pacin A. 2007. *Alternaria alternata* prevalece in cereal grain and soybean seeds from Entre Ríos, Argentina. *Revista Iberoamericana de Micología*; Bilbao, 24: 47-51.
- Cárdenas-Travieso R.M., Cristo-Valdés E., Pérez-León N., González-Vázquez M., Cruz-Triana A. (2004) Comportamiento del manchado del grano en variedades de arroz (*Oryza sativa* Lin.) de ciclo medio. *Fitosanidad*, 8:39-44.
- De Farias, C.R.J., Afonso, A.P.S., Branco, M.F. y Pierobom, C.R. (2007). Incidencia de hongos asociados a sementes de arroz em seis regioes produtoras do Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Agrocincia, Pelotas*, v.13, n.4, p.487-490.
- Ellis MB. *Dematiaceous Hyphomycetes*. (1971) England, Commonwealth Mycological Institute; 608 p.
- Ellis MB. *More Dematiaceous Hyphomycetes*. (1976) England: Commonwealth Mycological Institute. 507 p.
- Estrada, G. y Sandoval, I. (2001) Incidencia de *Curvularia* spp. en el manchado del grano de arroz de algunas variedades de la provincia de Pinar del Río. *Fitosanidad*, vol. 5, no.4, pp. 3-5.
- ISTA (International Seed Testing Association), SW. (2011) International rules for seed testing. Zurich. Switzerland. P:159.
- Gutiérrez, S.A. (2002). Micoflora asociada a granos manchados de arroz. XI Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Río Cuarto, Córdoba, Argentina. pp. 29.
- Gutiérrez, S.A., Mazzanti de Castañón, M.A., y Cúndom, M.A. (2002). Hongos presentes en semillas de arroz del noreste Argentino. *Fitopatología*, 37(2), 156-163.

- Gutiérrez, SA., y Cúndom, MA. (2009) Incidencia y prevalencia de hongos en semillas de arroz. En: VI Congreso Latinoamericano de Micología, Mar del Plata.
- Gutiérrez, SA., Carmona, M., & Reis, EM., (2010) Methods for detection of *Alternaria padwickii* on rice seeds. *Journal of Phytopathology* 158(7-8), 523-526.
- Marchio, IA. (2016) Manchado del grano: Incidencia y micoflora presente en diferentes genotipos de arroz, cultivados en dos regiones agroecológicas argentinas. Trabajo final de grado. P. 27 N° 19.
- Mamone, C., Gaetán, S. (1999) Patógenos asociados a la semilla de arroz. En: X Jornadas Fitosanitarias Argentinas, San Salvador de Jujuy, Jujuy, p. 26.
- Mew, T.W. and Misra, J.K. Eds. (1994) A Manual of Rice Seed Health Testing. *IRRI International Rice Research Institute*, 113 p. Manila, Philippines.
- Mew, T.W., & Gonzales, P. eds. (2002) A handbook of rice seedborne fungi. *IRRI International Rice Research Institute, and Enfield, N.H (USA)*. Science Institute, Inc 83p. Los Baños, Philippines.
- Moraes, M.H.D. (1995) Testes de sanidade de sementes em rotina no Brasil: situação atual, contribuições e perspectivas. In: Menten, J.O.M. Patógenos em sementes: detecção, danos e controle químico. São Paulo: Ciba Agro, p. 37-51.
- Morato de Amaral, H. (1987) Testes de sanidade de sementes de arroz. En: Soave, J., e M.M. Veloso Da Silva Wetzel eds. Patología de sementes. Campinas, SP, Brasil, Fundação Cargill, Capítulo XV: 358-370.
- Moya P., Girotti J.R., Toledo A. V., Sisterna M.N. (2018) Antifungal activity of *Trichoderma* VOCs against *Pyrenophora teres*, the causal agent of barley net blotch. *Journal of Plant Protection Research* 58: 45-53.
- Neergaard, P. (1979) Seed Pathology, *Revised Edition, London, Mac Millan Press, I and II*, 1191.
- Neninger, H., Barrios, LM. & Hidalgo, EI. (2002) Micobiota asociada y patogénica presente en semillas de arroz (*Oryza sativa* L.) nacional e importada en Cuba. *Phytopathology*, 92(6), S128 (Abstracts).
- Ou, S.H. (1972) Rice Diseases. CAB Internacional Mycological Institute Kew, Surrey, England, 368 pp.
- Ou, S.H. (1985). Rice Diseases. 2nd, ed., Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, UK, 380 p.
- Pincioli, M., Sisterna, M.N, Bezus, R. & Vidal, A. (2003) Manchado del grano de arroz: efecto de la fertilización nitrogenada. *Rev. Fac. Agron.* 105 (2): 88-96.

- Pincioli, M.; Gribaldo, A.; Vidal, A.; Bezus, R.; Sisterna, M.N. (2013). Mycobiota evolution during storage of paddy, brown and milled rice in different genotypes. *Summa Phytopathologica*, 3, 157-161.
- Pineda, J.B; Colmenárez, O; Mendez, N y Gutiérrez L. (2007) Niveles de inóculo de hongos fitopatógenos asociados a la semilla de arroz (*Oryza sativa*). Rev. Facultad de Agronomía. 24: 481-500. Venezuela.
- Reis, EM., Barreto, D., Carmona, M. (1999) Patología de semillas de cereales de invierno. Gráfica Condal SRL. Buenos Aires, Argentina 94 p.
- Rivero-González, D., Cruz-Triana, A., Rodríguez-Pedroso, AT, Echevarría Hernández, A. y Marínez-Coca, B. (2012) Hongos asociados al manchado de grano en la variedad de arroz INCA LP-5 (*Oryza sativa* L.) en Cuba. Microbiol. Vol.32 N° 2. Caracas, Venezuela.
- Sisterna, M.N., Lori, G.A. y Marassi, J.J. (1994). Sintomatología y hongos asociados al manchado del grano de arroz en el cultivar Irga 409. *Rev. de la Fac. de Agronomía, U.N.L.P.*, 70, 13-21. Argentina.
- Sivanesan, A. (1987) Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *CAB International Mycological Institute (CMI)*. Mycological Papers 158. 1-261.
- Winter, W.E., Mathur, S.B., and Neergaard, P. (1974) Seedborne organisms of Argentina: A Survey. *Plant Disease Reporter* 58:507-511.

CAPITULO III

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LOS AISLAMIENTOS SELECCIONADOS Y EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO BIOCONTROLADOR DE LOS AISLAMIENTOS DE *Trichoderma harzianum* Y *Chaetomium* spp.

3.1 Introducción

El control biológico es el uso de organismos (o de sus metabolitos secundarios o subproductos) que son enemigos naturales de una plaga o patógeno, con el fin de reducir o eliminar sus efectos dañinos en las plantas o sus productos. Esta herramienta de manejo se sustenta en microorganismos beneficiosos que establecen interacciones directas de tipo antagonista con el patógeno y de tipo indirectas como la estimulación de defensas del huésped. Los mecanismos de efecto directo incluyen la competencia por el espacio y los nutrientes, la inactivación de los sistemas de ataque del patógeno, la modificación de la rizosfera, la secreción de metabolitos con efecto antibiótico y el ataque directo a otros hongos (Micoparasitismo) (Sandoval y Belesansky, 2020).

Trichoderma spp. es uno de los agentes de control biológico más estudiado a nivel mundial, del cual se ha demostrado que posee capacidad para interferir en los procesos vitales del patógeno (Martínez *et al.* 2013) y además de poseer tanto actividad antagonista como estimuladora del crecimiento vegetal (Sandoval y Belesansky, 2020). La capacidad de producir diversos metabolitos y de adaptación a diversas condiciones ambientales y sustratos, confiere la posibilidad de ser utilizada en la industria biotecnológica (Martínez *et al.* 2013).

Actualmente, existe muchos estudios con resultados prometedores sobre el uso de hongos endófitos como *Chaetomium* spp. Los mecanismos antagonistas de este hongo incluyen la competencia por el espacio y los nutrientes, el micoparasitismo y la producción de metabolitos (antibiosis) (Mandal *et al.*, 1999, Moya *et al.*, 2016). *Chaetomium* spp. también se ha informado como antagonista de patógenos foliares y del suelo (Soytong *et al.*, 2001).

3.1.1 *Trichoderma* spp.

Los hongos filamentosos del género *Trichoderma*, pertenecientes a la familia Hypocreaceae, son cosmopolitas en suelo, madera y hortalizas en descomposición, muestran una notable gama de estilos de vida e interacciones con otros hongos o plantas, lo que les confiere alta plasticidad ecológica, capacidad enzimática para degradar sustratos, metabolismo variable y resistencia a inhibidores microbianos (Lorito, 2006). Morfológicamente se caracteriza por presentar un talo fino, los conidióforos son

ramificados como árbol pequeño, penachos compactos en forma de anillo con sistema de ramas irregulares de manera piramidal, los cuales terminan en fiálides en forma de esporas asexuales o conidios, que pueden emerger directamente del micelio. Igualmente, como método de resistencia, los hongos de este género tienen la capacidad de producir clamidosporas, las cuales pueden producirse en zonas terminales del micelio, como zonas medias o intercalados (Mesa Vanegas, *et al.* 2019). Es fácilmente aislado del suelo por métodos convencionales, en gran parte debido a su rápido crecimiento, abundante conidiación, formación de clamidosporas y colonización de sustratos orgánicos, lo que facilita un rápido desarrollo en varios sustratos (Gupta *et al.* 2014). La mayoría presenta un color blanco, que se torna verde o amarillento con esporulación densa. En algunas especies, los conidios maduros aparecen de color verde oscuro en el microscopio, otras especies se caracterizan mejor por una completa falta de pigmento (Mesa Vanegas, *et al.* 2019). Los olores aromáticos que se asemejan al coco son producidos comúnmente por cepas de *T. viride* y algunas otras también por *T. atroviride* (Harman y Kubicek, 2014).

3.1.2 *Chaetomium* spp.

Chaetomium es uno de los principales géneros de ascomicetos saprotróficos y se han descrito más de 300 especies de *Chaetomium* spp. Las colonias son de crecimiento rápido, de color pardo, oliva o gris, de aspecto granular, algodonoso o lanoso, que pueden presentar o no exudados, o producir pigmentos difusibles en diversos medios de cultivo y que, por lo general, carecen de olor; ascomas ostiolados, generalmente superficiales, globosos, subglobosos, piriformes, ovoides, obovoides, ampliamente elipsoidales o ampuliformes, que pueden o no presentar un cuello largo, usualmente cubiertos de pelos o setas, que se fijan al sustrato mediante hifas especializadas (rizoides), presentan un ostiolo en el ápice, que generalmente está rodeado por pelos terminales. Las ascosporas son unicelulares, incoloras cuando son jóvenes, de color marrón o gris oliváceo al madurar, pueden tener uno o dos poros germinativos, los que varían de posición según la especie (Von Arx *et al.* 1986).

C. globosum, ha sido reportado como posible agente de control biológico de varios patógenos de plantas del suelo y del aire. El mecanismo por el cual *C. globosum* controla las poblaciones patógenas ha sido el resultado de la producción de antibióticos (Di Pietro *et al.* 1992).

3.1.3 *Bipolaris* spp.

El género *Bipolaris* spp. incluye varios patógenos vegetales importantes con distribución mundial. Estas especies se asocian comúnmente con machas foliares, tizón de las hojas, pudrición de raíces y otros síntomas de enfermedades principalmente en cultivos de arroz, maíz, trigo y sorgo y varias otras plantas hospedantes (Berbee *et al.* 1999; Ellis, 1971; Sivanesan 1987). *Bipolaris* pertenece los Ascomycota, Dothideomycetes, Pleosporales, Pleosporaceae. *Bipolaris oryzae* causa manchas marrones en hojas y semillas. Las manchas foliares son ovoides de hasta 1cm de largo, generalmente de color marrón, a veces de color púrpura, se forman centros blancos a grises que a menudo se fusionan cuando la hoja se seca. (Sivanesan, 1987).

Los conidios generalmente son curvos, rara vez rectos, naviculares, fusiformes, obclavados o casi cilíndricos, hialinos cuando esta inmaduros a ligeramente marrón cuando están maduros. Colonias esponjosas, algodonosas de coloración blanca cuando son jóvenes, tornándose ligeramente grises cuando maduran (Manamgoda *et al.*, 2014).

3.1.4 *Curvularia* spp.

Curvularia spp. pertenece al orden Pleosporales familia Pleosporaceae, es el estado anamórfico de *Cochliobolus lunatus* (telemorfo) (Sivanesan, 1987; Base de datos global de EPPO, 2002). *Curvularia lunata* es un patógeno facultativo que causa fallas en la germinación de semillas de cereales y otros cultivos (Sivanesan, 1987). En arroz causa manchado de las hojas y tizón a plántulas (Estrada y Sandoval, 2004).

A nivel microscópico desarrolla hifas vegetativas tabicadas, ramificadas, subhialinas a pardas, lisas a algo rugoso, con tamaño aproximado de 1,5 a 5µm de ancho. Conidióforos septados, simples o ramificados, a menudo con una base bulbosa y geniculados o doblados en el ápice, de color marrón claro a oscuro, con paredes celulares más gruesas que las de las hifas vegetativas (39-430µm de largo, 4-9µm de ancho en la base y 2,5-6µm de ancho hacia el centro). Conidios casi siempre de cuatro septos, a menudo curvados en el tercer septo desde la base, que es más grande que las otras células intermedias de color marrón a marrón oscuro (Manamgoda *et al.*, 2012).

3.1.5 *Fusarium* spp.

El género *Fusarium*, perteneciente a los ascomicetos, orden Hypocreales, familia Hypocreaceae, fue descrito por primera vez por Link en 1809. Los miembros de este

género son numerosos y se pueden encontrar como patógenos, endófitos y saprofitos en plantas y suelos de todo el mundo. La amplia distribución de las especies de *Fusarium* se puede atribuir a la capacidad de estos hongos para crecer en una amplia gama de sustratos y a sus eficientes mecanismos de dispersión. Estos hongos producen una serie de metabolitos secundarios, o micotoxinas, que son tóxicos para los humanos y animales, causando enfermedades que afectan la agricultura y horticultura y ha generado impactos económicos casi devastadores, es por esta razón que el género *Fusarium* se ha convertido en un importante foco de investigación.

La clasificación morfológica en el género *Fusarium* spp. se basa en las características macro y microscópicas del cultivo. El tipo de micelio aéreo, pigmentación y tasa de crecimiento de la colonia, así como la presencia o ausencia de esporodoquios, esclerocios o estroma. El color que desarrollan depende de la especie y puede ser blanquecino, crema, anaranjado, rosa, rojizo, púrpura, etc., estas coloraciones pueden variar según los diferentes medios de cultivo. El micelio aéreo suele ser abundante y de aspecto algodonoso. El medio de cultivo agar papa dextrosa (PDA) se usa mayormente para evaluar la morfología, pigmentación y velocidad de crecimiento de la colonia, ya que debido a su alto contenido de carbohidratos, generalmente favorece el crecimiento en detrimento de la esporulación. Las especies del género *Fusarium* pueden producir dos tipos de esporas asexuales: macroconidias y microconidias y un tipo de spora de resistencia: clamidosporas. Algunas especies producen los tres tipos, mientras que otras especies no, por tanto estas estructuras son claves para la caracterización de las especies (Caro, 2015).

3.1.6 Objetivos

Los objetivos planteados en el presente capítulo fueron:

- Seleccionar y caracterizar morfológica y molecularmente los hongos más representativos asociados al manchado
- Analizar la interacción de *Trichoderma harzianum*. y *Chaetomium* spp. con los hongos seleccionados en ensayos *in vitro*.

3.2 Materiales y métodos

Las cepas de *Trichoderma harzianum* que se utilizaron para este estudio, fueron identificadas y caracterizadas tanto morfológica como molecularmente, en estudios previos (Moya *et al.*, 2018). De los 7 aislamientos de *Chaetomium* spp. que serán utilizados en este ensayo, sólo el aislamiento de mejor comportamiento será identificado a nivel de especie, para dar continuidad a los siguientes objetivos de esta tesis.

3.2.1 Cultivos monospóricos

Para establecer una cepa que garantice la pureza del aislamiento utilizado y para contar con una genética homogénea se realizaron cultivos monospóricos de Ch (*Chaetomium* spp.), Bi (*Bipolaris* spp.), Cu (*Curvularia* spp.), Fus (*Fusarium* spp.). Se considerará un solo aislado monospóricos del cultivo polispórico de cada uno de los géneros.

Al cultivo polispórico inicial de Ch, Bi y Cu se le agregaron 20ml de agua destilada estéril y con una varilla de vidrio se realizó un raspado del micelio, con el fin de remover las esporas. Para el cultivo monospórico del hongo aislado e identificado con características similares a Fus, se realizó el repique mediante el uso de un ansa estéril en el medio de cultivo Carboximetil celulosa (CMC) líquido en baño térmico a 25°C en agitación a 45 revoluciones min^{-1} por 2 días (Cappellini y Peterson, 1965).

A partir de las suspensiones de esporas de Ch, Bi y Cu y del cultivo líquido y esporulado de Fus se realizaron diluciones sucesivas de 10^{-1} (1:10), 10^{-2} (1:100) y 10^{-3} (1:1000). De la última dilución, se depositaron 20 μl en el centro de las cajas de Petri que contenían los medios de cultivo: agar papa glucosado (APG) y Carboximetil celulosa (CMC); y se dispersaron con perlas de vidrio. Usando un microscopio con aumento de 40X se localizaron los conidios aislados, el área más próxima donde se encontraban dichos conidios en formación fue separada con una hoja de bisturí estéril. La fracción de agar cortada fue colocada en una caja de Petri con medio de cultivo APG y se incubo a 25°C en ciclos de luz de 12hs.

Se revisaron diariamente los cultivos monospóricos para verificar la aparición de la colonia a partir de los conidios aislados.

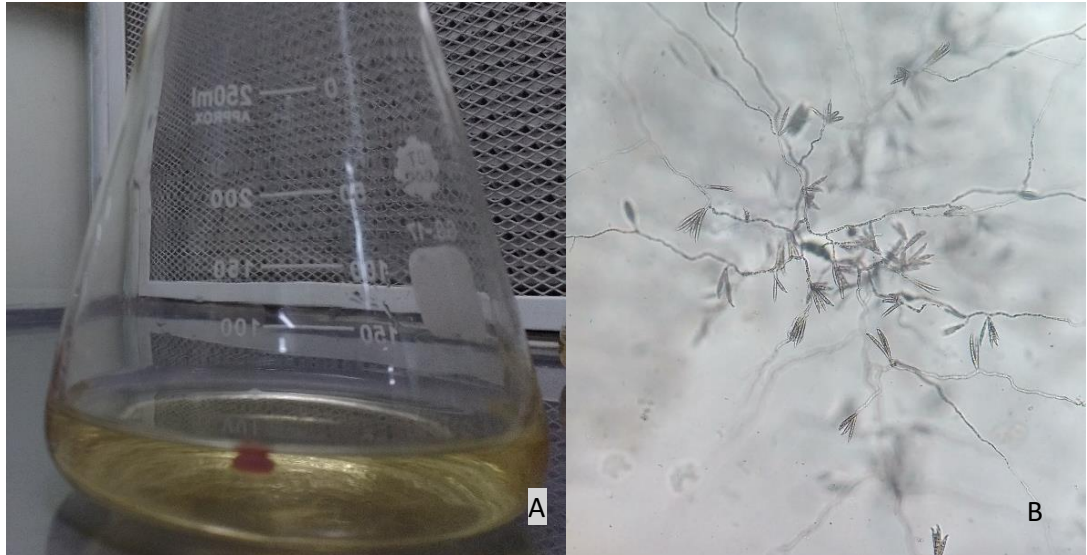


Figura 1. Medio de cultivo Carboximetil celulosa (CMC) líquido para el crecimiento de *Fusarium graminearum* (A). Vista al microscopio con aumento de 40X de cultivo monospórico de *Fusarium graminearum* (B)

3.2.2 Caracterización morfocultural

3.2.2.1 *Trichoderma* spp.

En Moya, *et al.*, (2018) se hace referencia a la caracterización morfocultural de las cepas de *Trichoderma harzianum* utilizadas en el desarrollo de esta tesis de Maestría.

3.2.2.2 *Chaetomium* spp., *Bipolaris* spp., *Curvularia* spp. y *Fusarium* spp.

Se observaron las características macroscópicas de las cepas; cada hongo se cultivó mediante la siembra de discos con micelio en crecimiento extraídos con un sacabocados en medio de cultivo agar papa dextrosa comercial (APD Britania) en placas de Petri de 90mm. Se incubaron a 25°C. La observación se realizó luego de 10 días.

Las características culturales evaluadas, fueron: aspecto y coloración de la colonia, liberación de pigmentos al medio. La identificación se realizó con la ayuda de claves taxonómicas (Ellis, 1971; Sivanesan, 1987; Von Arx *et al.* 1986). Por cada hongo se realizaron 3 repeticiones.

Para la observación bajo el microscopio óptico de la presencia o ausencia de estructuras microscópicas características de las cepas, se tomó una pequeña porción de micelio del hongo extraída con sacabocados y se colocó en 1ml de agua destilada estéril, se llevó a agitación y posteriormente se colocaron sobre un portaobjetos, donde se midieron el largo y ancho de 50 conidios por cada cepa.

3.2.3 Identificación molecular

3.2.3.1 *Trichoderma* spp.

En Moya, *et al.* (2018) se hace referencia a la caracterización molecular de las cepas de *Trichoderma harzianum* utilizadas en el desarrollo de esta tesis de Maestría.

3.2.3.2 *Chaetomium* spp., *Bipolaris* spp., *Curvularia* spp. y *Fusarium* spp.

Los aislamientos de *Chaetomium* spp., *Bipolaris* spp., *Curvularia* spp. y *Fusarium* spp. se sembraron en cajas de Petri de 60mm que contenían medio de cultivo líquido Agar-papa glucosado. El micelio formado se recolectó a los 7 días post-incubación a 25°C. Para la extracción del ADN se siguió la metodología desarrollada por Aljanabi y Martinez (1997) y la calidad de éste fue analizada mediante electroforesis en gel de agarosa 0,7% (P/V) suplementado con Bromuro de etidio (100 ng mL⁻¹). La cantidad de ADN fue estimada por comparación con el marcador de peso molecular de concentración conocida del genoma del fago Lambda digerido con la enzima Hind III (Promega, Biotech) usando un analizador de imágenes (SYNGENE GeneTools).

La identidad de los aislamientos fúngicos de *Chaetomium* spp., *Bipolaris* spp. y *Curvularia* spp. previamente descrita a partir de caracteres morfológicos, se corroboró por medio de la amplificación de las regiones ITS, TEF-1 α y GPDH, para *Bipolaris* spp. y *Curvularia* spp., y de las regiones ITS y TEF-1 α para *Chaetomium* spp.

Se utilizaron los primers universales ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') para amplificar el ITS, los primers 983F (5'-GCYCCYGGHCAYCGTGAYTTYAT-3') y 2218R (5'-ATGACACCRACRGCACRGTYTG-3') para amplificar el TEF y los primers gpd1 (5'-CAACGGCTTCGGTCGCATTG-3') y gpd2 (5'-GCCAAGCAGTTGGTTGTGC-3') para amplificar el GPDH. El programa de PCR consistió de un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 4 min; seguido por 30 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 min, 45 seg a 56°C para ITS, 50 seg a 54°C para TEF y 60 seg a 52°C para GPDH, 1 min a 72°C y un paso de elongación final a 72°C por 5 min. La mix de reacción contenía Buffer 1 X (500 mM KCl; 100 mM Tris-HCl, pH 9,0 a 25°C; 1% Triton X-100), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 μ M de cada primer, 1 Unidad de Taq ADN polimerasa y aproximadamente 20 ng de molde de ADN (reactivos Inbio Highway,

Tandil, Buenos Aires, Argentina). Las reacciones de PCR fueron realizadas en un ciclador MJ Research (PTC-150 MiniCycler).

Los fragmentos amplificados se precipitaron en un volumen de isopropanol y 0,1 volumen de acetato de amonio 3M. La mezcla fue incubada a -18°C durante 12 h y luego centrifugada a 15,000g por 15min. El pellet de DNA fue lavado con etanol 70%, secado y disuelto en agua destilada estéril. Los amplicones fueron secuenciados en MacroGen Inc. (Seúl-Corea). Las secuencias fueron editadas usando el programa BioEdit version 7.0.9.0 (Hall, 1999) y luego analizadas en la base de datos de genes GenBank database (www.ncbi.nlm.nih.gov).

Para *Fusarium* spp. la reacción de amplificación se llevó a cabo con los primers especie-específicos Fg16NF (5'-ACA GAT GAC AAG ATT CAG GCA CA-3') y Fg16NR (5'-TTC TTT GAC ATC TGT TCA ACC CA-3) desarrollados por Nicholson *et al.* (1998) acorde a las modificaciones del procedimiento descrito por Malbrán *et al.* (2012). La reacción se hizo en el termociclador PTC-150 MiniCycler™ (M.J.Research, INC, EE.UU.). La mezcla de reacción se realizó en volúmenes de 25µl, conteniendo 5-20 ng de ADN fúngico, 200 µM de cada nucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP), 0,5 µM de cada uno de los primers (FAGOS/Ruralex, Argentina), 0,8 unidades de Taq polimerasa (Highway Molecular Biology – InBio-UNICEN-Tandil, Argentina), 1,5µM MgCl₂, y 10X buffer de reacción (50mM KCl, 10mM Tris-Cl, 1% Triton X-100). El programa de ciclado consistió en un paso de desnaturalización (95°C) por 3 min, seguido por 38 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 segundos, annealing a 62°C por 20 segundos y extensión a 72°C por 45 segundos, seguidos por un ciclo final de extensión (72°C) durante 5 min. Hasta su recuperación las reacciones fueron mantenidas a 15°C.

Todas las reacciones incluyeron un control positivo, uno negativo y control de las condiciones de reacción.

3.2.4 Cultivos duales

Con el fin de seleccionar los mejores aislamientos de *Trichoderma harzianum* y *Chaetomium* spp. y evaluar su potencial antagónico, se utilizó la técnica del cultivo dual (Dal Bello *et al.*, 1994). Dicha técnica consiste en colocar, dentro de cajas de Petri conteniendo 9 ml de medio de cultivo agar papa glucosado (APG) y a 4 cm uno del otro,

dos discos de 5 mm de diámetro del patógeno y de los antagonistas, extraídos con un sacabocado.

Se realizaron 6 repeticiones por muestra/tratamiento con sus respectivos testigos, los cuales consistieron en discos de 5mm de diámetro de los patógenos dentro de cajas de Petri. Las cajas se incubaron en estufa a 25°C y la evaluación se realizó con los valores de los 6 días, tiempo en el que los testigos llegaron a su máximo de crecimiento en la placa de Petri.

Se calculó el porcentaje de inhibición micelar (MGI (%)), mediante la fórmula de Michereff *et al.*, (1994)

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

Donde,

MGC = Long. media del crecimiento micelar testigo

MGT =Long. media del crecimiento micelar tratado.

- En el caso de los patógenos confrontados con *T. harzianum*, y debido al crecimiento más rápido de esta especie los discos de 5 mm de diámetro se colocaron en el siguiente orden: primero el disco del patógeno y dos (2) días después el de *T. harzianum*.
- En cuanto a la siembra de los patógenos confrontados con *Chaetomium* spp. los discos de 5 mm de diámetro fueron colocados al mismo tiempo que el antagonista.

Adicionalmente a la evaluación a nivel macroscópico y para complementar el ensayo se hicieron observaciones microscópicas de la zona de interacción *T. harzianum* - patógenos y *Chaetomium* spp. - patógenos, con el fin de comprobar alteraciones en la morfología del patógeno.

Con los datos obtenidos del porcentaje de inhibición micelar (MGI) se realizó un análisis de la varianza (ANOVA), se utilizaron como fuentes de variación las 7 cepas de *Trichoderma* spp. y los 7 aislamientos/cepas de *Chaetomium* spp. para cada uno de los patógenos evaluados (*Curvularia lunata*, *Bipolaris oryzae* y *Fusarium graminearum*). Las medias se compararon por el test de Duncan, con una probabilidad de 5 % ($p \leq 0,05$).

En todos los casos se utilizó la versión libre de InfoStat estudiantil, año 2017 (InfoStat-Statistical Software).

3.3 Resultados

3.3.1 Caracterización morfo-cultural

3.3.1.1 *Trichoderma* spp.

En Moya, *et al.* (2018) se hace referencia a la caracterización morfo-cultural de las cepas de *Trichoderma harzianum* utilizadas en el desarrollo de esta tesis de Maestría.

3.3.1.2 *Chaetomium* spp.

Las colonias de *Chaetomium* spp. presentan una coloración olivácea a parda de aspecto granular y en algunas partes con micelio blanco de tipo algodonoso. A nivel microscópico se observan ascosporas limoniformes de color gris-oliváceo translúcidas a la luz reflejada (Figura 2).

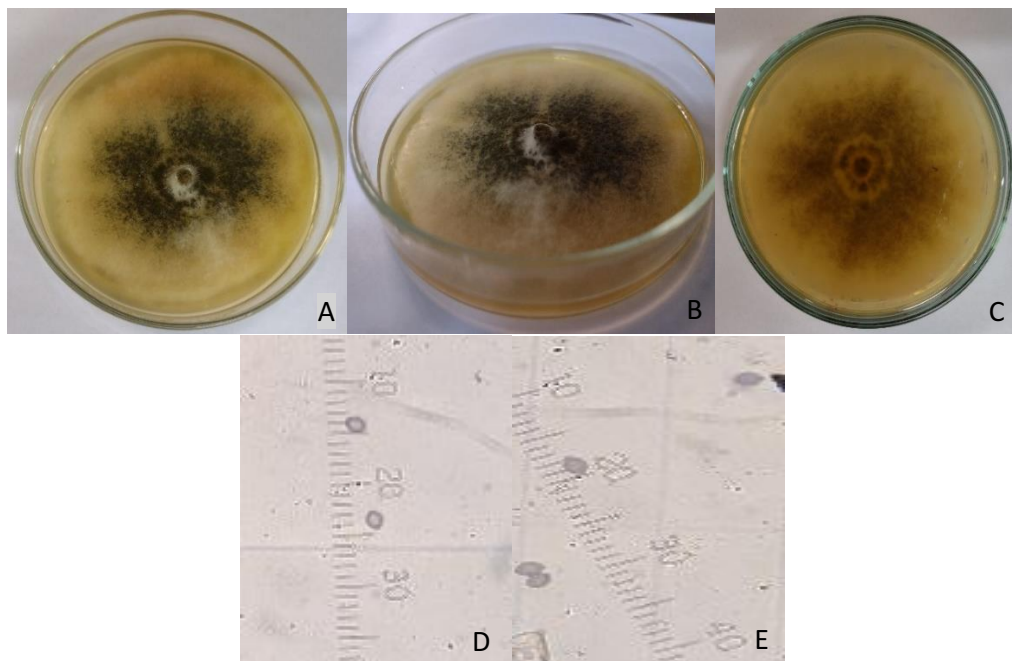


Figura 2. *Chaetomium* spp. (aislamiento C4) en medio de cultivo APG. Anverso de la placa de Petri (A)(B); reverso de la placa de Petri (C); ascosporas (D)(E)

3.3.1.3 *Bipolaris* spp.

Las características morfológicas observadas fueron: Colonias esponjosas de coloración grisácea, de consistencia algodonosa y en algunas partes de la colonia de coloración gris claro a blanquecina. En el reverso de la placa de Petri se observa una coloración gris oscura a negra. Los conidios algunas veces curvados, fusoides u obclavados, cilíndricos de color marrón claro, presentaron de 3 a 6 distoseptos y de 8-11 μm de largo (Figura 3).

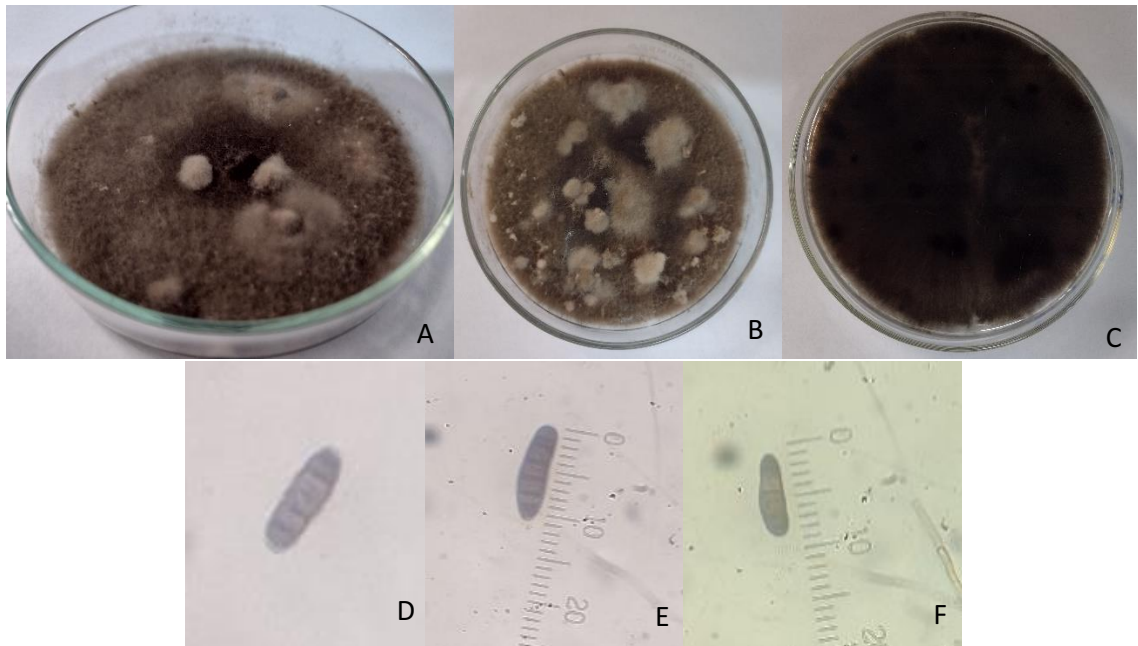


Figura 3. *Bipolaris* spp. en medio de cultivo APG. Anverso de la placa de Petri (A)(B); reverso de la placa de Petri (C); conidios (D)(E)(F)

3.3.1.4 *Curvularia* spp.

La colonia presenta micelio de apariencia aterciopelada que se expande hacia la periferia con un margen fimbriado, de coloración grisáceo oscura, en el reverso se observa una coloración negra, los conidios ligeramente curvados en forma de media luna con 3 septos de coloración pardo a marrón oscura de aproximadamente $4\mu\text{m}$ (Figura 4).

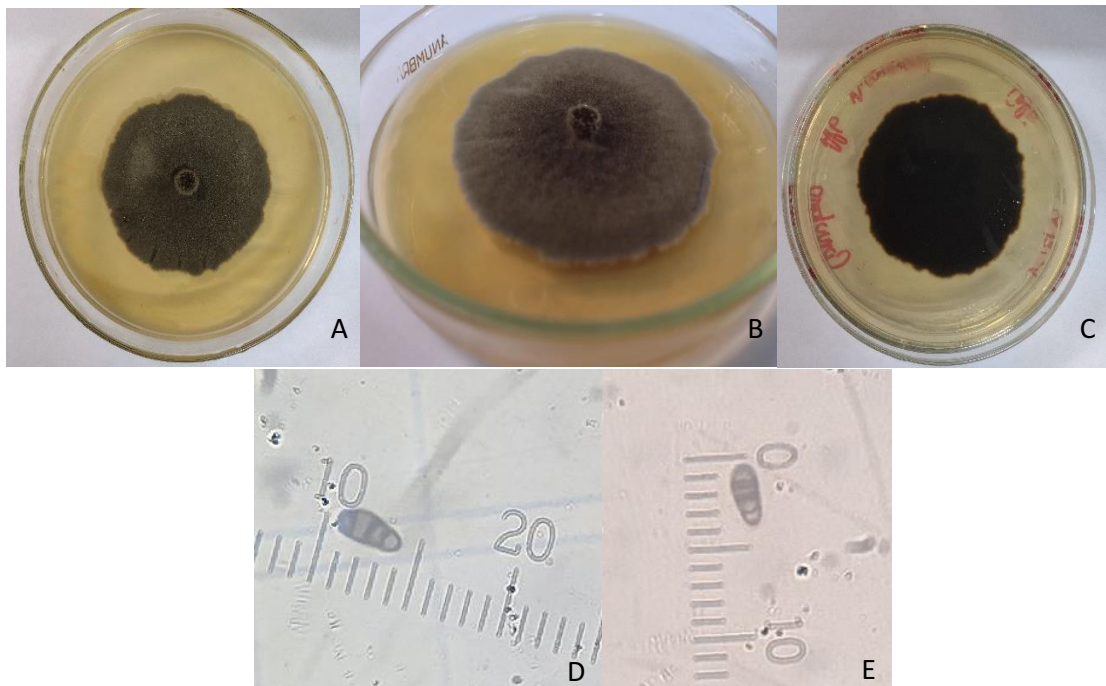


Figura 4. *Curvularia* spp. en medio de cultivo APG. Anverso de la placa de Petri (A)(B); reverso de la placa de Petri (C); conidios (D)(E)

3.3.1.5 *Fusarium* spp.

La colonia presenta un micelio algodonoso de coloración marrón amarillento con tintes rosados principalmente en el centro de la placa, hacia los extremos presenta áreas de color que van de marrón rojizo a naranja. En el reverso se observa una coloración marrón rojiza en el área central que se va haciendo más amarillenta a medida que se aleja del centro de la caja de Petri. Al microscópico óptico se observó la presencia de macroconidias con forma curvada, pluriseptadas y la célula basal presenta forma de pie (Figura 5).

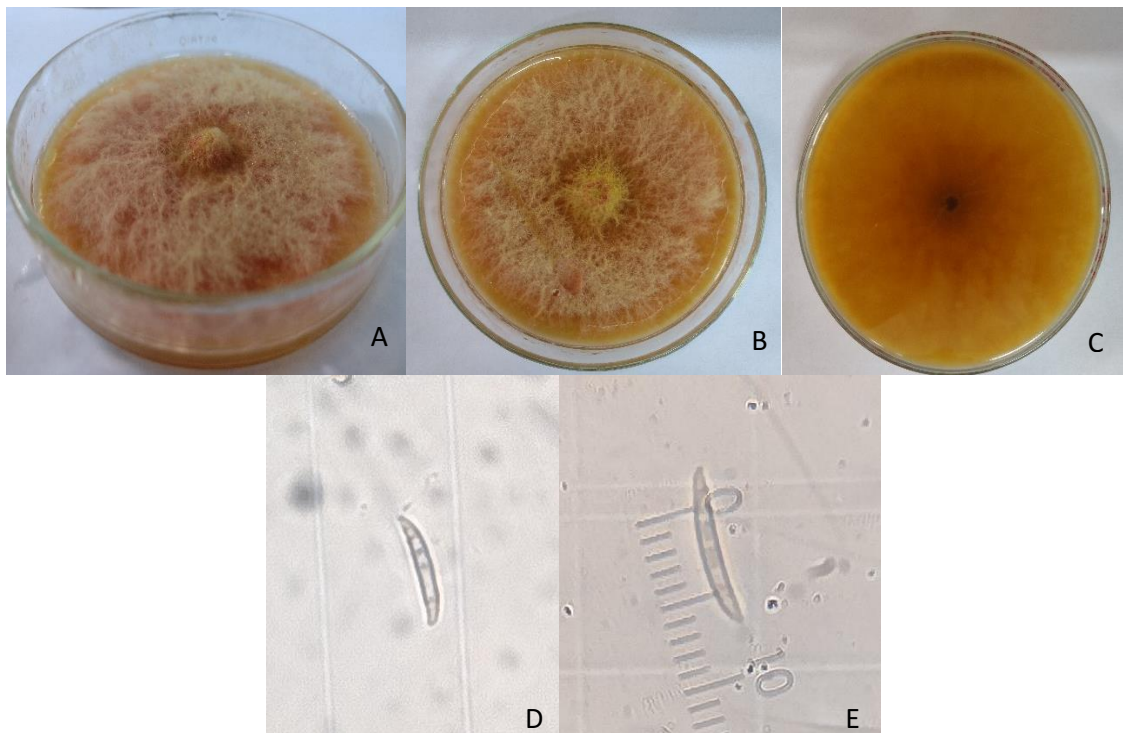


Figura 5. *Fusarium* spp. en medio de cultivo APG. Anverso de la placa de Petri (A)(B); reverso de la placa de Petri (C); macroconidias (D)(E)

3.3.2 Identificación molecular

3.3.2.1 *Trichoderma* spp.

En Moya, *et al.* (2018) se hace referencia a la caracterización molecular de las cepas de *Trichoderma harzianum* utilizadas en el desarrollo de esta tesis de Maestría.

3.3.2.2 *Chaetomium* spp., *Bipolaris* spp., *Curvularia* spp. y *Fusarium* spp.

El análisis de la secuencia del ITS, TEF y GPDH, confirmó la identificación a nivel específico de los aislamientos de *Chaetomium* spp., *Bipolaris* spp. y los de *Curvularia* spp., realizada morfo-culturalmente. En la tabla 1 se muestran las regiones amplificadas de los aislamientos y los resultados de la identificación molecular.

Tabla 1. Regiones que fueron amplificadas de los aislamientos de *Chaetomium* spp., *Bipolaris* spp. y *Curvularia* spp y resultado de la identificación molecular.

Aislamiento	Región	Resultado
A1	ITS	<i>Bipolaris oryzae</i>
A1	TEF	<i>Bipolaris oryzae</i>
A1	GPDH	<i>Bipolaris oryzae</i>
A2	ITS	<i>Curvularia lunata</i>
A2	TEF	<i>Curvularia lunata</i>
A2	GPDH	<i>Curvularia lunata</i>
A3	ITS	<i>Chaetomium globosum</i>
A3	TEF	<i>Chaetomium globosum</i>

Para el aislamiento identificado en este estudio como Fus se muestra el producto de la amplificación obtenida. La línea 1 contiene el control negativo (H₂O), la línea 2 contiene el control positivo (DNA de *Fusarium graminearum*) que permitirá la identificación de Fus como *Fusarium graminearum*, la línea 3 contiene otro control negativo (DNA de otra especie fúngica) y las líneas 4, 5 y 6 contiene DNA del aislamiento en estudio Fus (Figura 6).

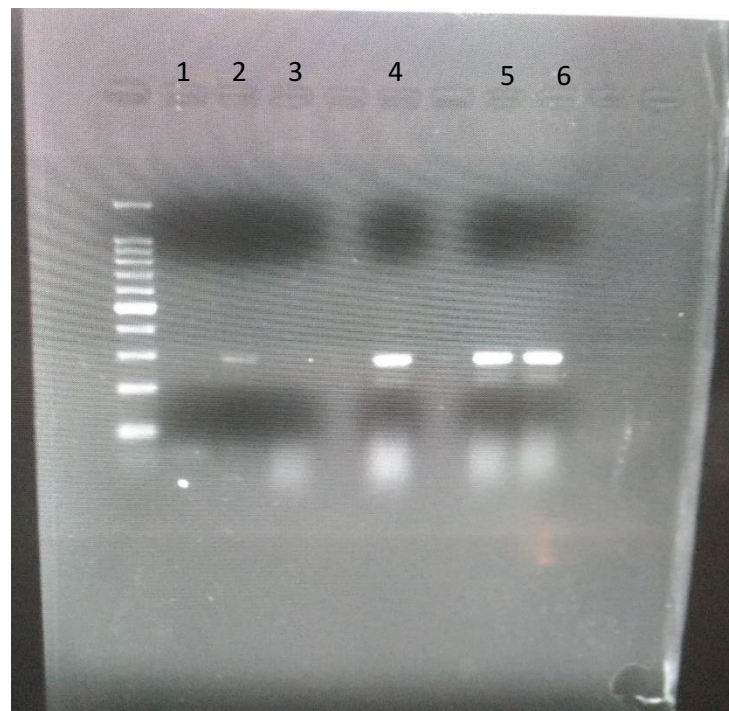


Figura 6. Resultado de la PCR para identificación de *Fusarium graminearum*

3.3.3 Cultivos duales

3.3.3.1 *Trichoderma harzianum*

En la Tabla 2 se puede observar el porcentaje de inhibición miceliar de las 7 cepas de *T. harzianum* frente a los patógenos. *B. oryzae* presentó un porcentaje de inhibición miceliar máximo de 27,50% para la cepa T2, la cual se diferenció estadísticamente de las demás cepas de *T. harzianum* y un valor mínimo para la cepa T9 con un valor de 6.17%. Para *C. lunata* los valores de inhibición miceliar oscilaron entre 25,69% y 7,15% observándose un máximo para la cepa T3 y un mínimo para la cepa T10. Los valores de las cepas T2 y T9 que correspondientes a 19.60% y 14.48% no presentaron diferencias significativas entre ellas. Para *Fusarium graminearum* las cepas T2, T3, T4, T7 y T8 con valores de 23,36%, 24,50%, 22,43%, 23,78% y 22,95% respectivamente, no presentaron diferencias estadísticamente significativas. Se registró además un valor mínimo de 14,90% para la cepa T9.

En cuanto al porcentaje de inhibición miceliar MGI para cada una de las cepas de *Trichoderma harzianum* frente a los patógenos se observó que la cepa T2 presentó un comportamiento favorable frente a *B. oryzae* con un valor de 27,5%; T3 frente a *C. lunata* con un valor de 25,7%; T4, T7, T8, T9 y T10 frente a *F. graminearum* con valores de 22,4%, 23,8%, 23%, 14,9% y 19,8%, respectivamente. Los valores promedios de las cepas T2 y T3 no presentaron diferencias significativas entre ellas con valores de 23,5% y 20,8%, respectivamente.

Tabla 2: Valores medios del porcentaje de inhibición miceliar (MGI) de las 7 cepas del género antagonista *T. harzianum* frente a los patógenos *B. oryzae*, *C. lunata* y *F. graminearum* en cultivos duales.

<i>Trichoderma harzianum</i>				
Cepa	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Curvularia lunata</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	PROMEDIO
T2	27,5a	19,6b	23,4a	23,5a
T3	12,3bc	25,7a	24,5a	20,8a
T4	14,4b	11,7cd	22,4a	16,2b
T7	6,7cd	10,1cd	23,8a	13,5bc
T8	8,5cd	8,4cd	23a	13,3bc
T9	6,2d	14,5bc	14,9c	11,9c
T10	10,8bcd	7,2d	19,8b	12,6c

Las medias con la misma letra no tienen diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test de Duncan ($p < 0,05$).

Los figuras 7 y 8 corresponden a las medias de los porcentajes de inhibición micelial (MGI) de las 3 cepas de hongos patógenos en presencia de las 7 cepas de *T. harzianum* y los controles.

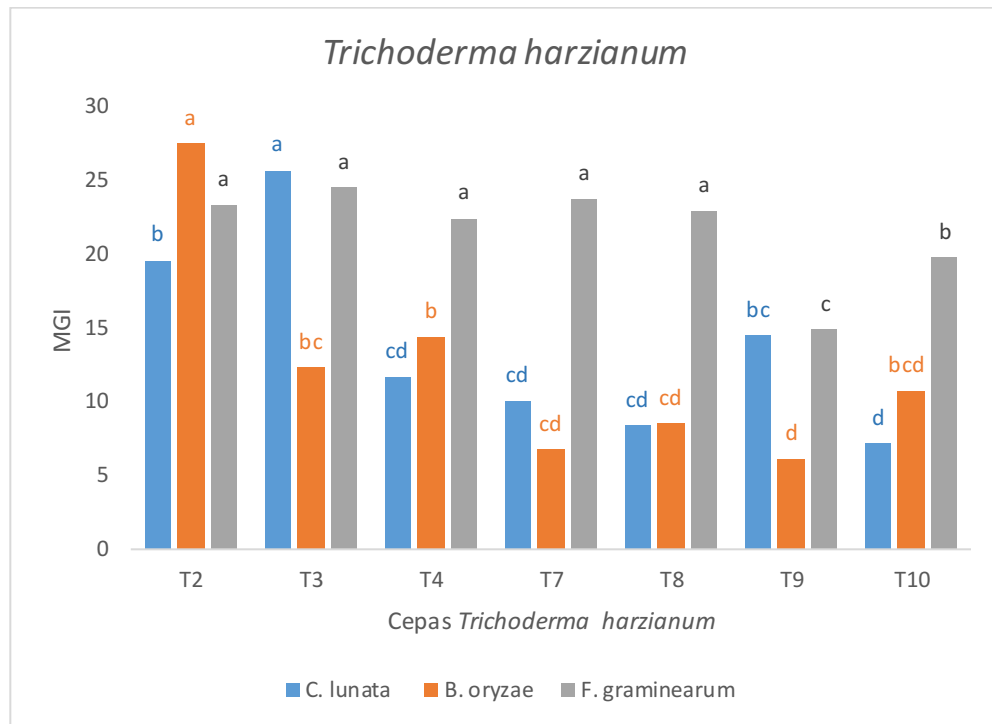


Figura 7: Valores medios del porcentaje de inhibición micelial (MGI) de las 7 cepas de *T. harzianum* frente a los patógenos *B. oryzae*, *C. lunata* y *F. graminearum*. Letras distintas expresan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test de Duncan ($p < 0,05$).

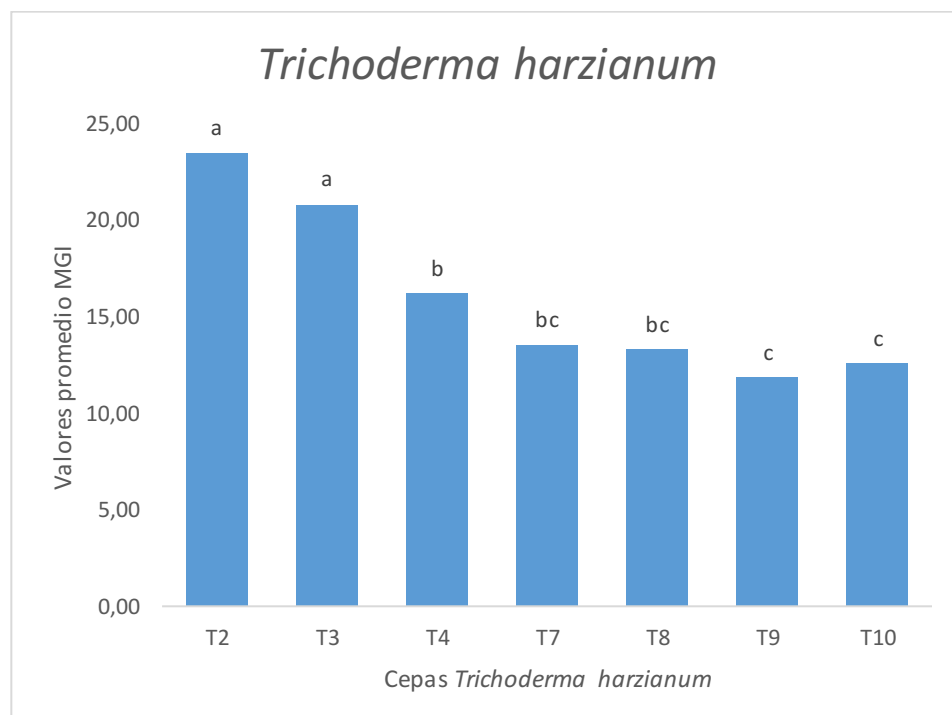


Figura 8: Valores promedio del porcentaje de inhibición micelial (MGI) de las 7 cepas de *T. harzianum*. Letras distintas expresan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test de Duncan ($p < 0,05$).

Macroscópicamente se observó en los ensayos de cultivos duales, diferentes velocidades de crecimiento y estrategias de antagonismo de *T. harzianum*. En la Figura 9 se muestran la interacción de las cepas T3, T7 y T8 de *T. harzianum* frente a los diferentes patógenos y sus testigos.

Se observó que las cepas T2, T3 y T4 presentaron una pigmentación amarilla en el medio de cultivo frente a *B. oryzae*, *C. lunata* y *F. graminearum* (ver Figura. 10). A los 6 días rodearon totalmente la colonia del patógeno, esporulando alrededor o sobre ella.

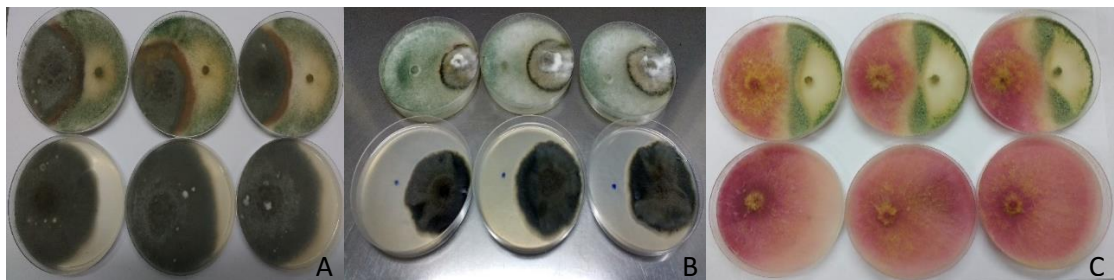


Figura 9: T7 frente a *B. oryzae* y testigos (A); T3 frente a *C. lunata* y testigos (B); T8 frente a *F. graminearum* y testigos (C).

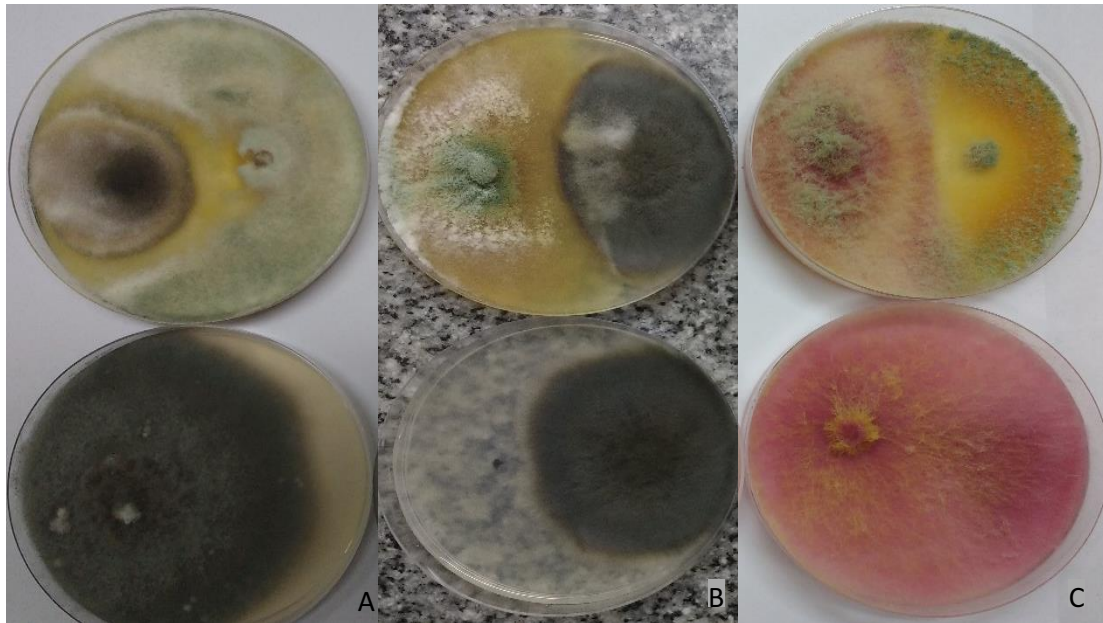


Figura 10: T2 frente a *B. oryzae* y testigo (A); T4 frente a *C. lunata* y testigo (B); T3 frente a *F. graminearum* y testigo (C)

Las cepas T7, T8, T9 y T10, no presentaron pigmentación amarilla frente a los patógenos. En el cultivo dual de la cepa T7 frente a *B. oryzae*, se pudo observar un halo marrón rodeando la colonia del patógeno (Figura 11A).

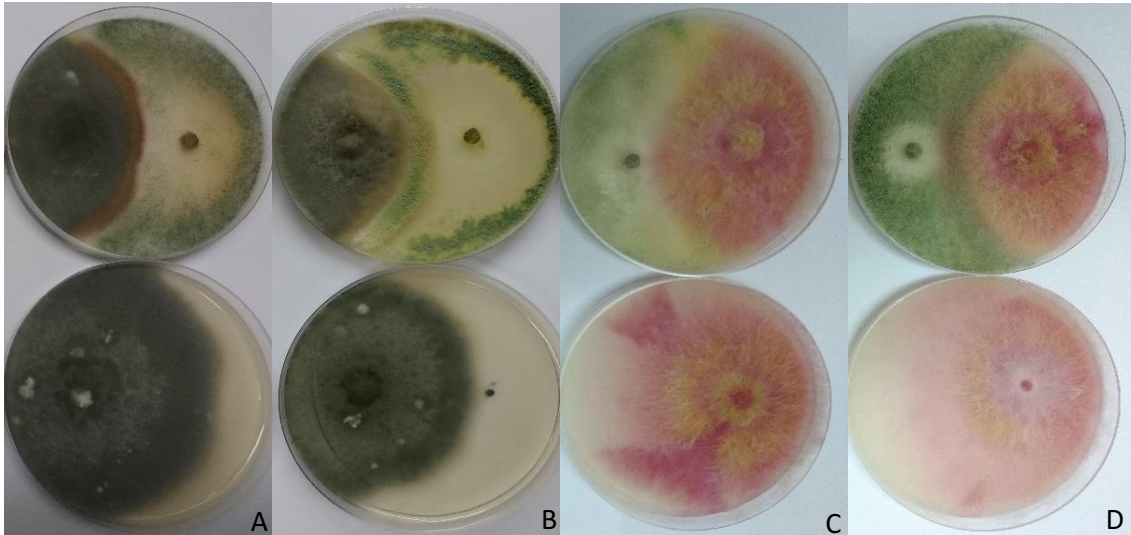


Figura 11: T7 frente a *B. oryzae* y testigo (A), T8 frente a *B. oryzae* y testigo (B), T9 frente a *F. graminearum* y testigo (C), T10 frente a *F. graminearum* y testigo (D).

A nivel microscópico, se evidenció en la zona de interacción patógeno-antagonista, micoparasitismo con enrulamiento, micelio vacuolizado, micelio deformado y conidios albinizados o sin presencia de septos (Figura 12).

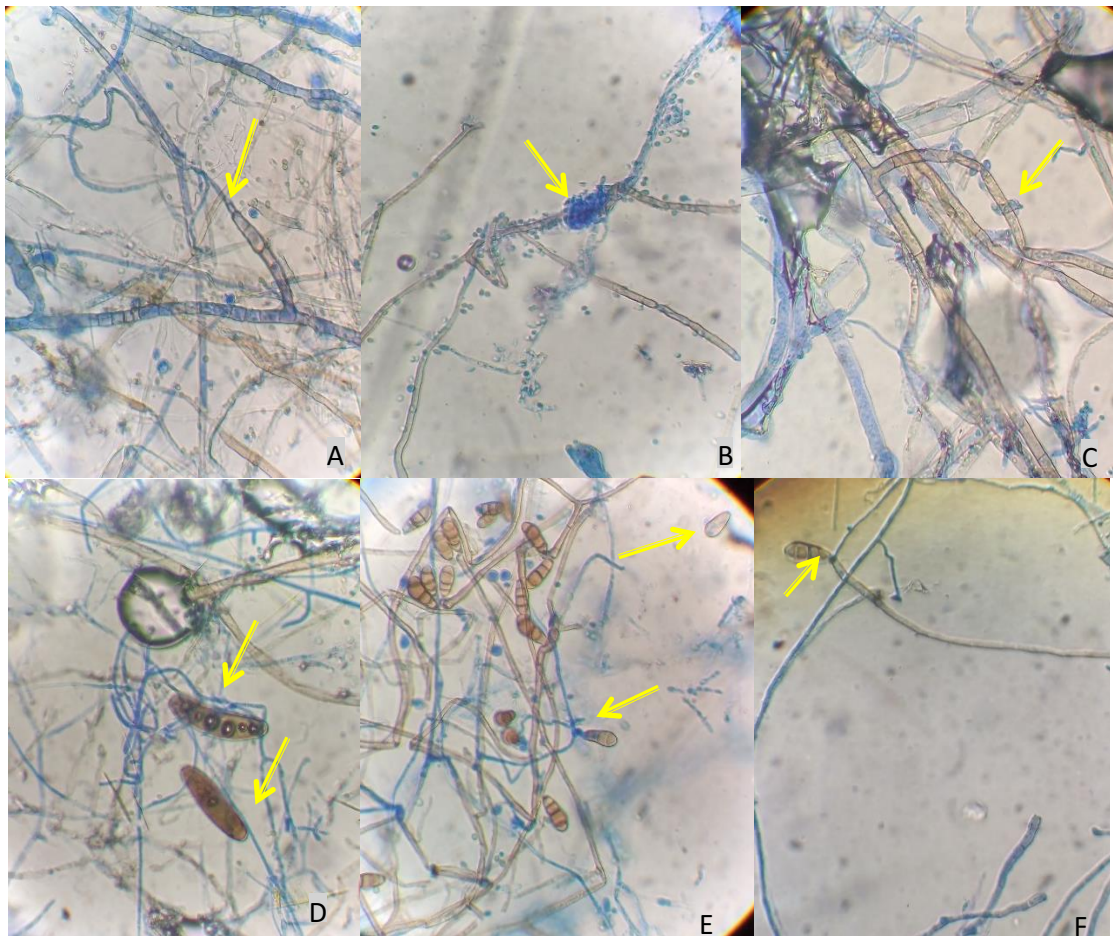


Figura 12: Micelio de *B. oryzae* deformado por adelgazamiento (A); hifas de *T. harzianum* enrolladas al micelio de *C. lunata* (B); hifas de *T. harzianum* enrolladas al micelio de *B. oryzae* (C); conidios de *B. oryzae* sin presencia de septos (D); conidios de *C. lunata* enrollados por hifas de *T. harzianum* (E)(F). Las flechas amarillas señalan las zonas de interacción patógeno-antagonista.

En la Tabla 3 se muestra la presencia (+) y ausencia (-) de los mecanismos de interacción observados entre *Trichoderma harzianum* y los patógenos estudiados *Bipolaris oryzae*, *Curvularia lunata* y *Fusarium graminearum*.

Tabla 3. Mecanismos de interacción patógeno – *Trichoderma harzianum* a nivel microscópico.

Patógeno	Mecanismo					
	M	E	V	MD	CA	CSS
<i>B. oryzae</i>	-	+	-	+	+	+
<i>C. lunata</i>	-	+	+	+	+	+
<i>F. graminearum</i>	-	+	+	+	-	-

Micoparasitismo (M), Enrollamiento (E), Vacuolización (V), Micelio deformado (MD), Conidios albinizados (CA) y Conidios sin septos (CSS).

3.3.3.2 *Chaetomium* spp.

El porcentaje de inhibición miceliar en los 7 cepas/aislamientos de *Chaetomium* spp. se puede ver detalladamente en la Tabla 4. Para *B. oryzae* los datos de MGI de C1 y C4, con valores de 39,26% y 42,01%, respectivamente no mostraron diferencias significativas entre sí; los valores de *B. oryzae* variaron entre 42,01% y 21,32% con máximo para C4 y mínimo para C2. Los datos para *C. lunata* oscilaron entre 34,5% y 7,19% con un valor máximo para el aislamiento C1 y mínimo para la cepa C5. C1 se diferenció estadísticamente de las demás cepas/aislamientos de *Chaetomium* spp.

Para *F. graminearum* las cepas/aislamientos C1, C2, C4, C6 y C7 con valores de 25,49%, 26,08%, 27,35%, 24,8% y 22,94% respectivamente, no presentaron diferencias estadísticamente significativas. Los datos fluctuaron entre 27,35% y 8,53% siendo máximo para la cepa C4 y mínimo para el aislamiento C3, respectivamente. La cepa C4 presentó un porcentaje de inhibición miceliar más alto de 42,01% en comparación con las otras especies de patógenos como *C. lunata* con un valor 27,95% y *F. graminearum* con un valor 27,35%.

En cuanto al porcentaje de inhibición miceliar MGI para cada una de las cepas/aislamientos de *Chaetomium* spp. frente a los patógenos se observó que el aislamiento C1 presentó un comportamiento favorable frente a *B. oryzae* con un valor de 39,3%; C2 frente a *F. graminearum* con un valor de 26,1%; C3, C4 y C5 frente *B. oryzae* con valores de 32,3%, 42% y 23,4%; C6 frente a *F. graminearum* con un valor de 24,8%

y C7 frente a *B. oryzae* con 32,16%. Los valores promedios de los aislamientos/cepa C1 y C4 no presentaron diferencias significativas entre ellas con valores de 33,1% y 32,5% respectivamente, ambos aislamiento/cepa provenientes de plántulas de arroz.

Tabla 4: Valores medios del porcentaje de inhibición miceliar (MGI) de las 7 cepas/aislamientos del género antagonista *Chaetomium* spp. frente a los patógenos *B. oryzae*, *C. lunata* y *F. graminearum* en cultivos duales.

<i>Chaetomium</i> spp.				
Cepa/Aislamiento	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Curvularia lunata</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	PROMEDIO
C1	39,3ab	34,5a	25,5a	33,1a
C2	21,3c	11,5de	26,1a	19,7cd
C3	32,3b	16,1cd	8,5c	19cd
C4	42a	28b	27,4a	32,5a
C5	23,4c	7,2e	19,6b	16,8d
C6	21,6c	17,9c	24,8a	21,5c
C7	32,1b	26,5b	22,9ab	27,3b

Las medias con la misma letra no tienen diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test de Duncan ($p < 0,05$).

Las figuras 13 y 14 corresponden a las medias de los porcentajes de inhibición miceliar (MGI) de las 3 cepas de hongos patógenos en presencia de las 7 cepas/aislamientos de *Chaetomium* spp.

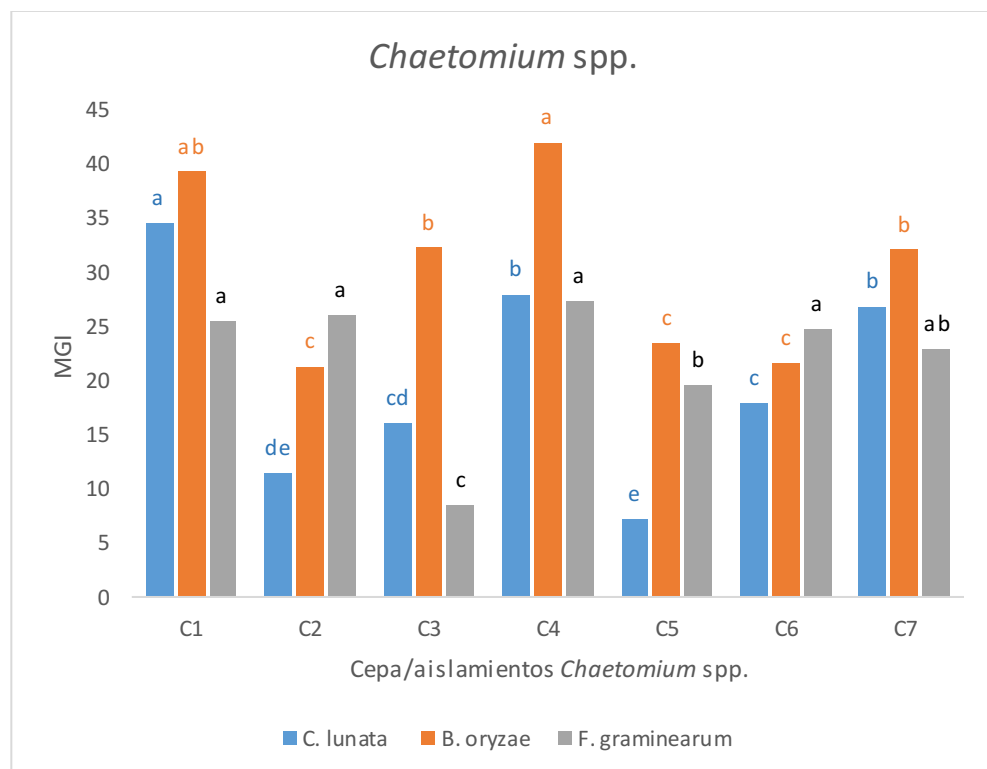


Figura 13: Valores medios del porcentaje de inhibición miceliar (MGI) de las 7 cepas/aislamientos de *Chaetomium* spp. frente a los patógenos *B. oryzae*, *C. lunata* y *F. graminearum*. Letras distintas expresan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test de Duncan ($p < 0,05$).

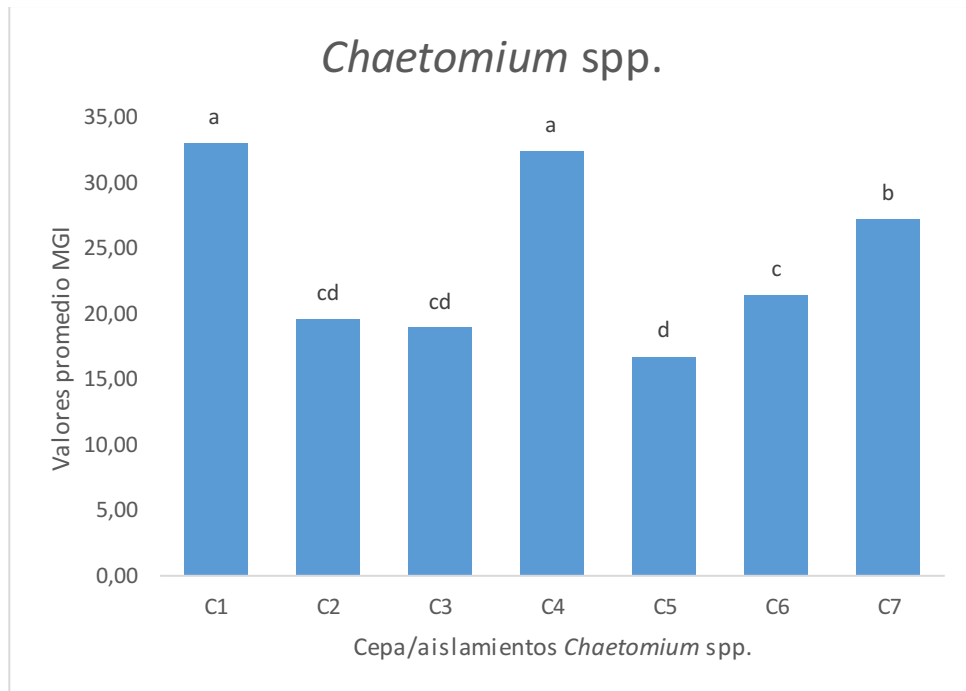


Figura 14: Valores promedio del porcentaje de inhibición miceliar (MGI) de las 7 cepas/aislamientos de *Chaetomium* spp. Letras distintas expresan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test de Duncan ($p < 0,05$).

Macroscópicamente se observó en los ensayos de cultivos duales, diferentes estrategias de biocontrol de *Chaetomium* spp. En la Figura 15 se muestran la interacción de las cepas/aislamientos C1, C3 y la cepa C4 de *Chaetomium* spp. frente a los diferentes patógenos y sus testigos.

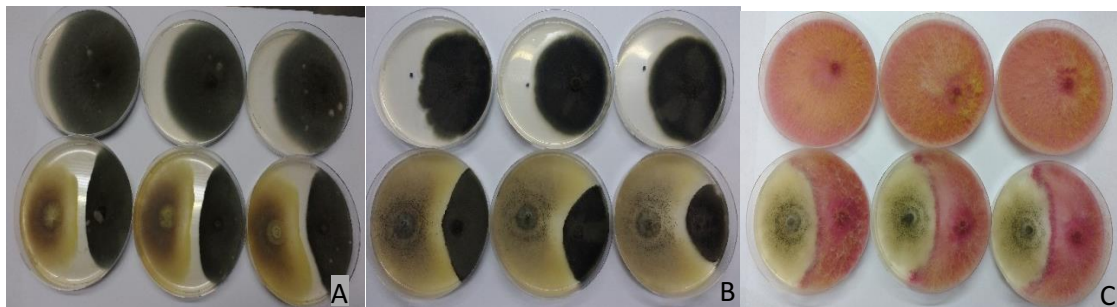


Figura 15: C3 frente a *B. oryzae* y testigos (A); C1 frente a *C. lunata* y testigos (B); C4 frente a *F. graminearum* y testigos (C).

Se observó cómo las cepas/aislamientos de *Chaetomium* spp. a los 6 días de crecimiento rodearon las colonias *B. oryzae* formando una zona de antibiosis (ver figuras 16 y 17), este fenómeno sucedió también para C2 y C3 frente *C. lunata* (Figura 18).

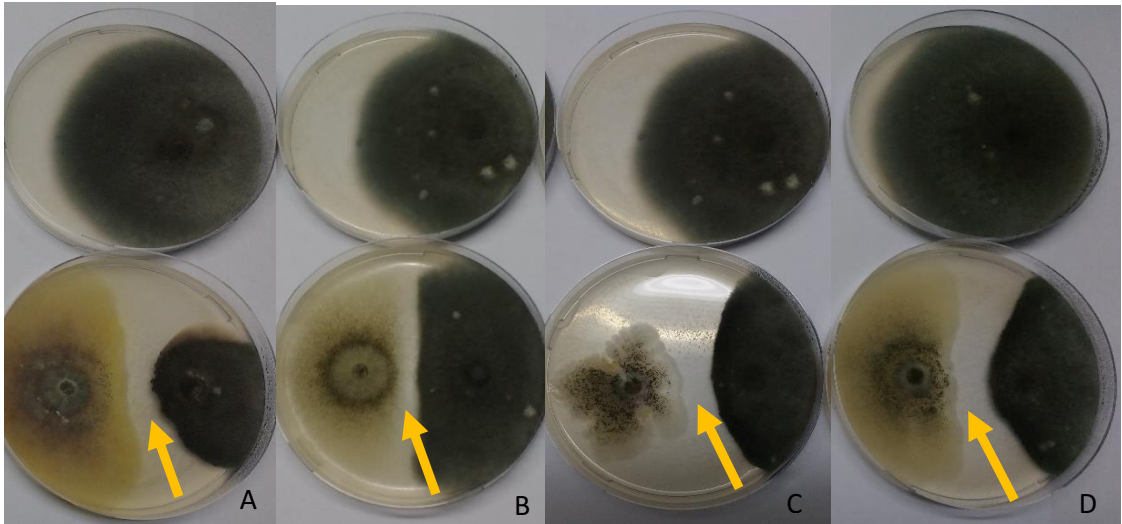


Figura 16: C1 (A), C2 (B), C3 (C) y C4 (D) frente a *B. oryzae*. Las flechas amarillas señalan la zona de antibiosis en las capas de Petri.

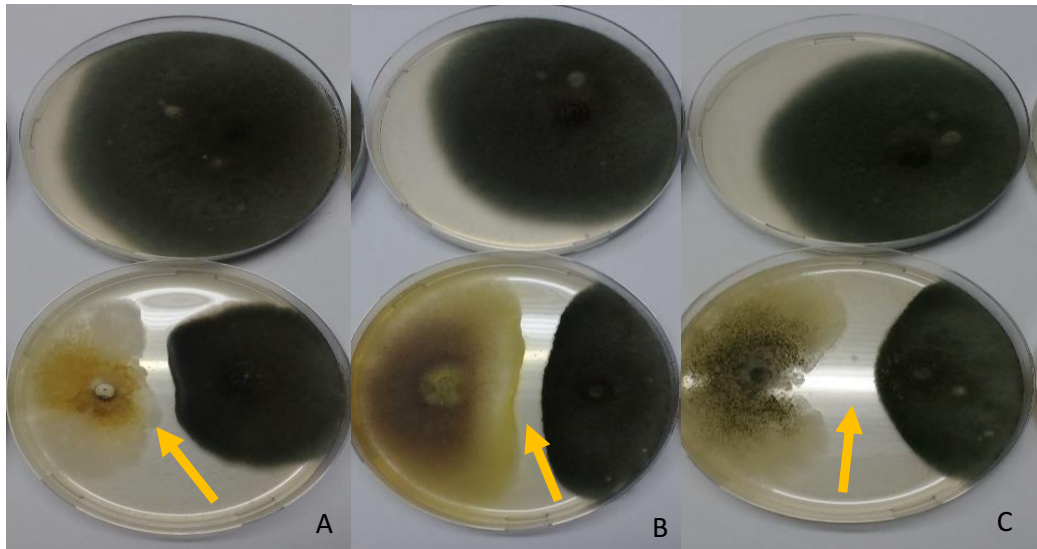


Figura 17: C5 (A), C6 (B) y C7 (C) frente a *B. oryzae*. Las flechas amarillas señalan la zona de antibiosis en las cajas de Petri.

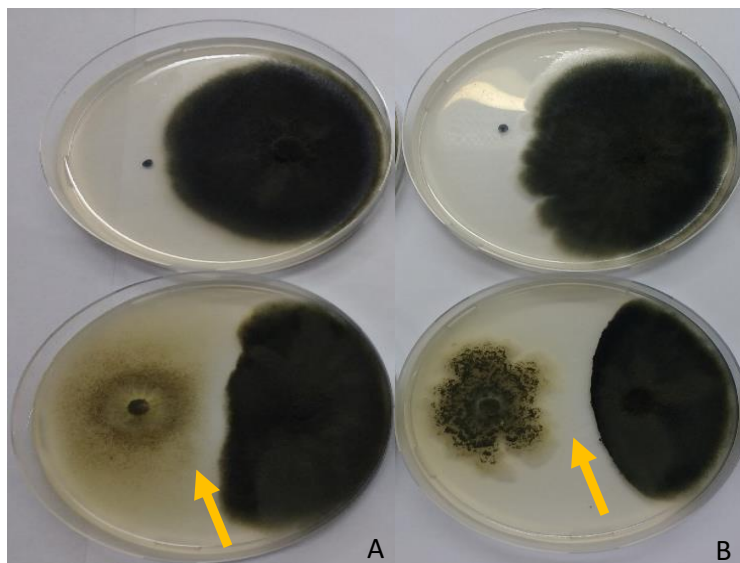


Figura 18: C2 (A) y C3 (B) frente a *C. lunata*. Las flechas amarillas señalan la zona de antibiosis en las cajas de Petri.

En la Figura 19, esta antibiosis estuvo ausente o se pudo observar muy levemente en el aislamiento C1 y las cepas C4, C5, C6 y C7 frente a *C. lunata*, donde *Chaetomium* spp. rodeó las colonias del patógeno, esporulando alrededor, pero no sobre ellas.

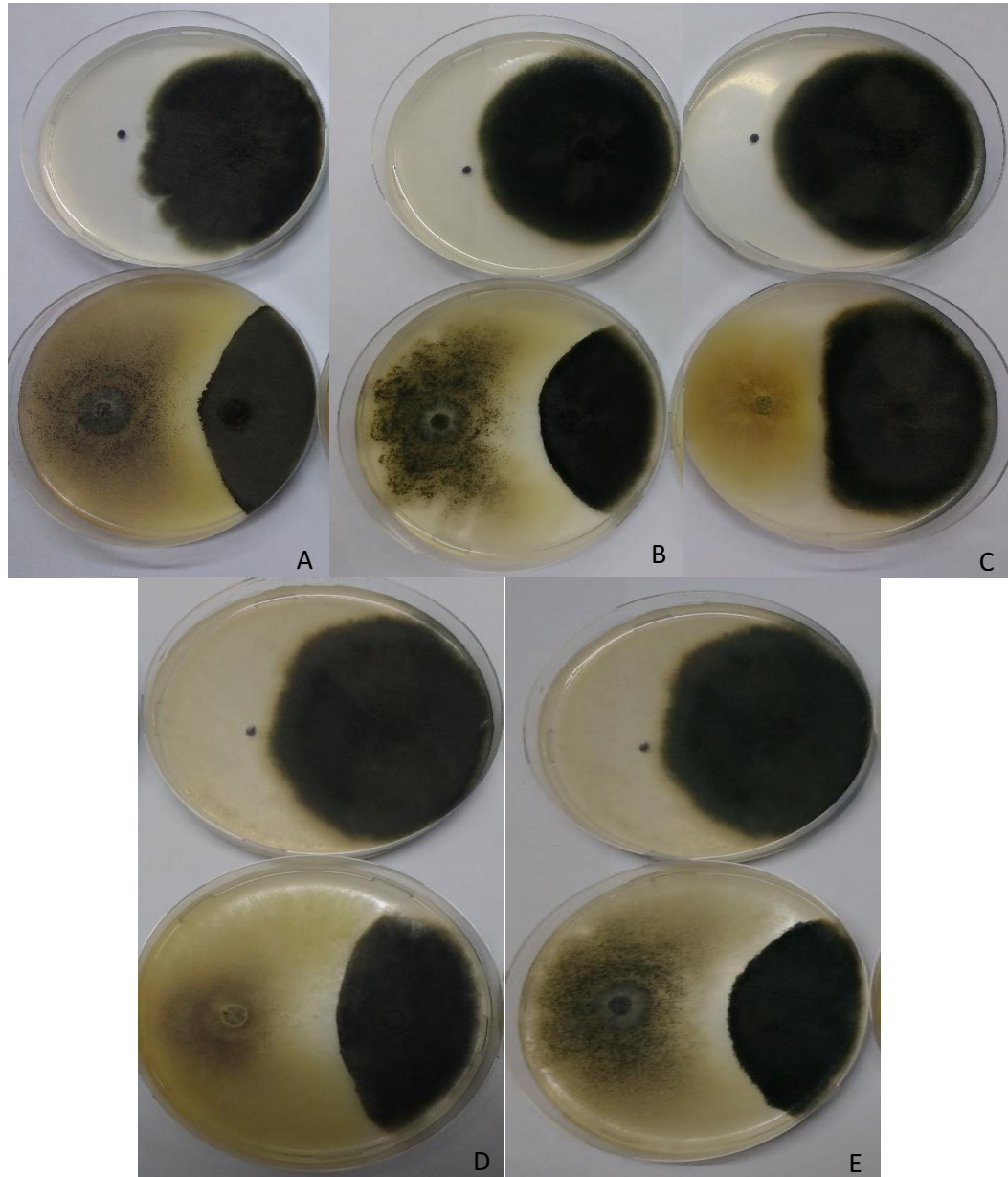


Figura 19: C1 (A), C4 (B), C5 (C), C6 (D) y C7 (E) frente a *C. lunata*.

En el aislamiento C1, y las cepas C2, C4 y C6 frente a *F. graminearum* no se observaron zonas de antibiosis, pero en algunas colonias como C2 y C4 se presentó una zona de interacción con coloración rosa oscuro alrededor de las colonias de *Chaetomium* spp (Figura 20).

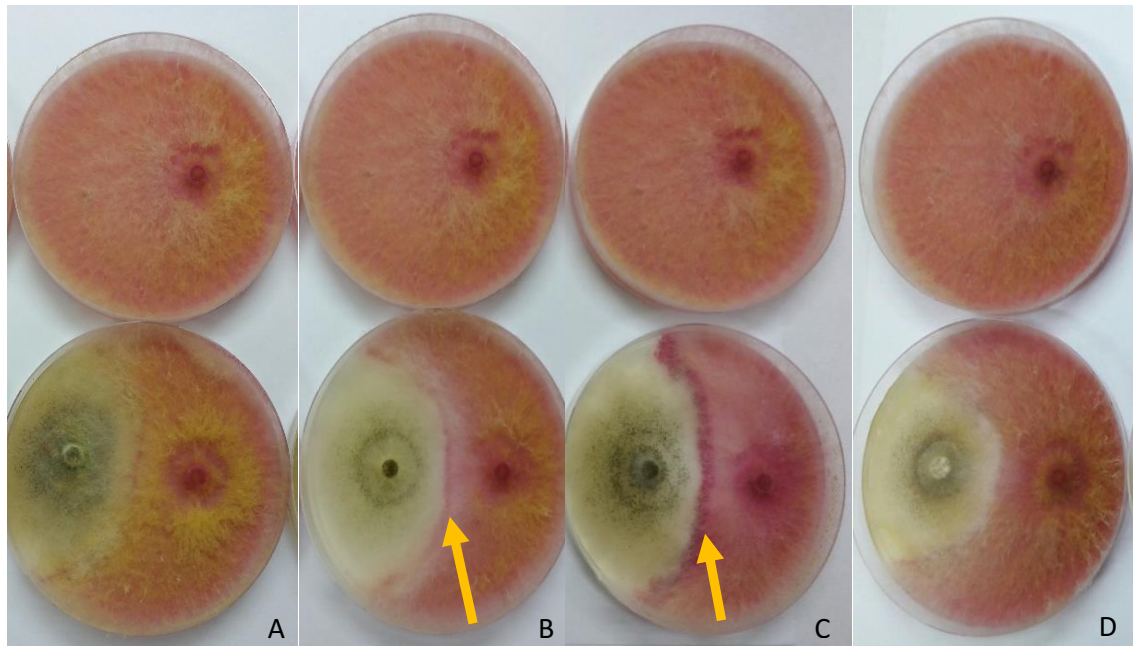


Figura 20: C1 (A), C2 (B), C4 (C) y C6 (D) frente a *F. graminearum*. Las flechas amarillas señalan la zona de interacción con coloración en las cajas de Petri.

A los 6 días *F. graminearum* rodeó casi por completo las colonias C3, C5 y C7 esporulando alrededor de *Chaetomium* spp., como se puede observar en la Figura 21.

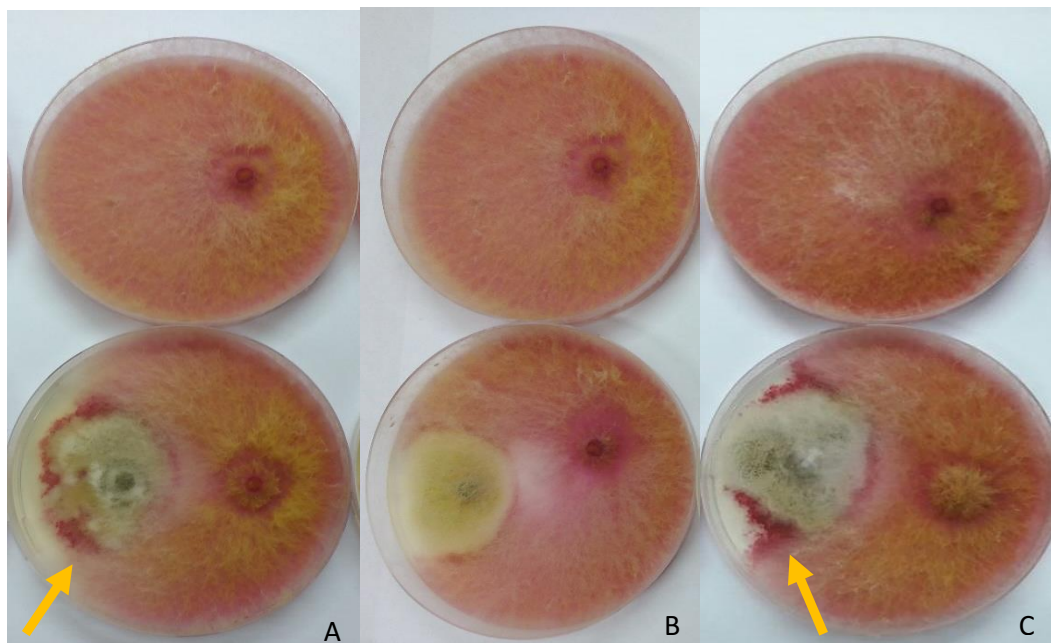


Figura 21: C3 (A), C5 (B) y C7 (C) frente a *F. graminearum*. Las flechas amarillas señalan la zona de interacción en las cajas de Petri.

A nivel microscópico, se evidenció en la zona de interacción patógeno-antagonista, micoparasitismo con enrulamiento, micelio vacuolizado, micelio deformado, conidios albinizados o sin presencia de septos y engrosado cerca al límite de la interacción (Figura 22).

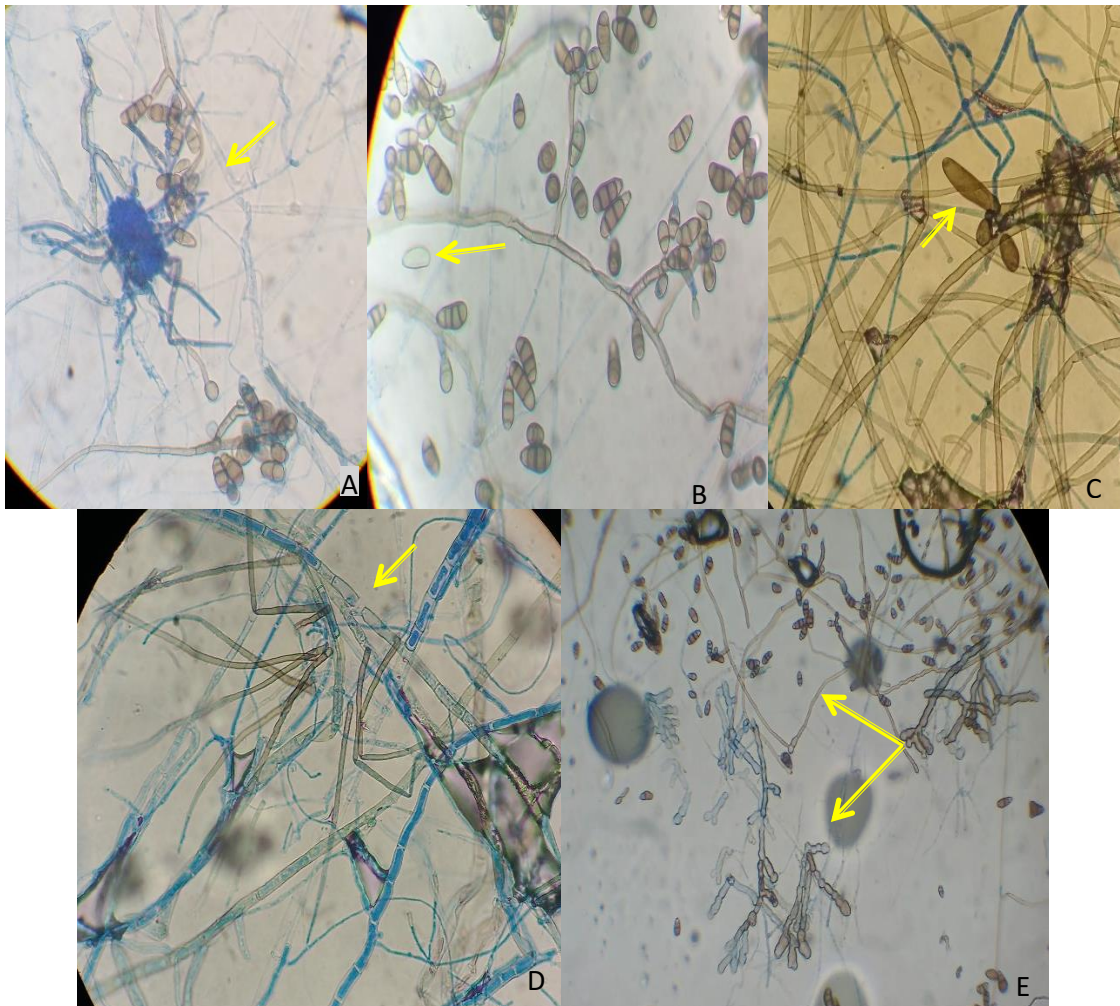


Figura 22: Conidios de *C. lunata* enrolladas en los pelos ascogonales de *Chaetomium* spp.(A); conidios de *C. lunata* albinizados (B); conidios de *B. oryzae* sin presencia de septos (C); micelio vacuolizado de *F. graminearum* (D); micelio engrosado al borde de la colonia de *C. lunata* (E). Las flechas amarillas señalan las zonas de interacción patógeno-antagonista.

Tabla 5. Mecanismos de interacción patógeno – *Chaetomium* spp. a nivel microscópico.

Patógeno	Mecanismo					
	M	E	V	MD	CA	CSS
<i>B. oryzae</i>	-	+	-	+	-	+
<i>C. lunata</i>	-	+	-	+	+	+
<i>F. graminearum</i>	-	-	+	+	-	-

Micoparasitismo (M), Enrollamiento (E), Vacuolización (V), Micelio deformado (MD), Conidios albinizados (CA) y Conidios sin septos (CSS).

Además, se pudo observar que el micelio de las cepas de los patógenos *B. oryzae* y *C. lunata* sufrieron un engrosamiento de sus hifas en los bordes de la colonia, principalmente en aquellas interacciones donde se presentó la zona de inhibición y los aislamientos de *Chaetomium* spp., no interactuaron directamente con dichas cepas (Figura 23).



Figura 23: Vista ampliada del micelio engrosado de *B. oryzae* frente a *Chaetomium* spp. (B)

De los resultados obtenidos en los cultivos duales con *Trichoderma harzianum* y *Chaetomium* spp. se seleccionó un representante de cada hongo antagonista, que servirán como tratamientos para ensayos posteriores. Para la elección de los mismos se tuvieron en cuenta:

1. El Porcentaje de inhibición micelial (MGI) promedio.
2. El porcentaje de inhibición micelial para *B. oryzae* el cual será utilizado para ensayos *in vivo*.

Para *T. harzianum*, cepa T2 evidenció el porcentaje de inhibición micelial promedio más alto con un 23,5%. Al igual que la cepa T3 (20,8%), no presentaron diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, el porcentaje de inhibición de T2 para *B. oryzae* fue de 27,5% superando el valor de T3 correspondiente a 12,3% (Tabla 2).

Para *Chaetomium* spp., C4 presentó un porcentaje de inhibición micelial promedio de 32,5% que, aunque no presentó diferencias significativas con el aislamiento C1 (33,1%), fue seleccionada, al observar el valor obtenido para *B. oryzae* de 42% para C4 frente a un 39,3% del aislamiento C1 (Tabla 4). C4 fue caracterizado morfológica y molecularmente, identificándose como *Chaetomium globosum*.

3.4 Discusión

Las características morfológicas de los hongos han sido elementos importantes para la clasificación de la taxonomía de estos microorganismos, muchas veces convirtiéndose en

un paso previo para su identificación, aunque los frecuentes cambios de nombres de las especies entre géneros, ha generado confusión entre micólogos y fitopatólogos (Manamgoda *et al.*, 2011). Por tal razón, la caracterización molecular se ha convertido en una herramienta eficaz y se ha transformado en una etapa crucial para la correcta identificación, debido a que el nombre es clave para acceder a la información existente sobre determinada especie (Hawksworth *et al.*, 2011; Udayanga *et al.*, 2011).

La certeza en la identificación de los organismos con los cuales se va a realizar cualquier investigación es de suma importancia. En este caso, el abordaje de los estudios de biocontrol deben tener una correcta determinación de los patógenos-antagonistas.

En este trabajo, varias cepas de *Trichoderma* spp. ensayadas mostraron distintos grados de antagonismo con cada uno de los patógenos cuando fueron enfrentados en cultivos duales. Se registran antecedentes similares de este hongo frente a patógenos de arroz (Abdel-Fataah *et al.* 2007; Hassan *et al.* 2017; Khalili *et al.* 2012; Priyadarshani *et al.* 2018). Las cepas de *Trichoderma harzianum* utilizadas en este estudio, fueron usadas previamente en Moya *et al.* (2020) frente a *Pyrenophora teres* en cebada donde mostraron una capacidad inhibitoria en un rango de 18% a 54% en comparación con el control, resultados superiores a los reportados en este estudio. En Priyadarshani *et al.* (2018) reportaron valores de inhibición micelial entre un 47% a un 64,4% para *Trichoderma* spp. y 29,5% para *Chaetomium* spp. en cultivos duales frente a *B. oryzae*, nuestros resultados fueron inferiores para las cepas de *T. harzianum* con valores entre el 6,2% - 27,5%, pero superiores para las cepas/aislamientos de *Chaetomium* spp. con valores en un rango entre 21,3% - 42% frente a dicho patógeno. Harman y Kubicek, (2014) mencionan que las cepas de *Trichoderma* spp. pueden ejercer el biocontrol de hongos fitopatógenos indirectamente, compitiendo por espacio y nutrientes, mediante la producción de compuestos antimicrobianos y también pueden realizar ese biocontrol directamente, mediante micoparasitismo, lo cual se evidenció en el presente estudio.

Las cepas/aislamientos utilizados mostraron a nivel microscópico zonas de interacción patógeno-antagonista con micoparasitismo, micelio vacuolizado, micelio deformado y conidios albinizados, entre otros, que son mencionados por Infante (2009) como mecanismos de acción que posee *Trichoderma*, además de la antibiosis, la desactivación de enzimas del patógeno, resistencia inducida, entre otros. Mientras mayor sea la

probabilidad de *Trichoderma* de manifestar varios de estos mecanismos, más eficiente y duradero será el control sobre estos hongos patógenos; además este antagonista ha sido incluido en la última clasificación de la FRAC donde se mencionan los mecanismos de acción (competición, micoparasitismo, antibiosis, ruptura de la membrana por lipopéptidos fungicidas, enzimas líticas, defensa vegetal inducida) y el desconocimiento de formas resistentes de patógenos (https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2021--final.pdf?sfvrsn=f7ec499a_2), convirtiendo al género *Trichoderma* spp. en una eficiente alternativa biocontroladora.

De igual manera, estos mecanismos pueden actuar de forma coordinada y su importancia en los procesos de biocontrol depende del hongo y del patógeno al que antagoniza, del tipo de cultivo y de condiciones ambientales como la disponibilidad de nutrientes, el pH, la temperatura o la concentración de hierro (Harman y Kubicek, 2014).

En las distintas interacciones patógeno –antagonistas, es muy frecuente encontrar en la zona de contacto varios tipos de alteraciones morfológicas como plasmólisis, vacuolización y aspecto “toruloso” o segmentado del micelio; conidios anormales o en menor cantidad enrulamiento (“coiling”) del micelio del antagonista sobre el patógeno. En los cultivos duales realizados se observaron estos fenómenos para *Trichoderma* spp., en coincidencia con los resultados de Mónaco *et al.* (2004) y Moya *et al.* (2018). Para *Chaetomium* spp., además se vio antibiosis y un frente pigmentado en la zona de contacto entre los organismos, concordando con lo registrado por Moya *et al.* (2016) cuando se enfrentó con *Drechslera teres*.

Así mismo los aislamientos de *Chaetomium* probados frente a los mismos patógenos tuvieron también efecto antagonista, con diferentes niveles de inhibición. Estos resultados tienen registros similares (Soytong, 1992a,b; Tongon y Soyton, 2015). Campos y Roselló (1998) también han reportado los efectos beneficiosos, del carácter antagonista de *Chaetomium* frente a otras especies de hongos, el cual ha sido utilizado en la agricultura para el control de hongos fitopatógenos.

Según Infante (2009) el conocimiento profundo de los mecanismos de acción que presentan los diferentes aislamientos de *Trichoderma* es vital, debido a que permite una adecuada y mejor selección de aislamientos con mayor potencial para el control de

diferentes fitopatógenos. Mientras más modos de acción estén presentes en un aislamiento, mayor será la eficacia del mismo en el control del fitopatógeno, y por ende, menor el daño que puede causar al cultivo.

Es bien sabido que tanto *Trichoderma* spp. como *Chaetomium* spp. son conocidos como agentes de control biológico y promotores de crecimiento en relación a diferentes enfermedades y hospedantes (Harman, 2006; Soyong *et al.* 2001; Thapa *et al.*, 2020).

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Fattah, G.M.; Shabana, Y.M.; Ismail, A.E.; Rashad, Y.M. (2007) *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*. *Mycopathol.* 164, 81-99.
- Aljanabi, S.M. And Martinez, I. (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research.* Vol 25, N°22:4692-2693.
- Berbee, ML., Pirseyedi, M and Hubbard, S. (1999) *Cochliobolus* phylogenetics and the origin of known, highly virulent pathogens, inferred from ITS and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene sequences. *Mycología* Vol. 91, N°6. pp 964-977.
- Campos, T. y Roselló, J. (1998) Estudio preliminar de los aislamientos de los hongos *Chaetomium elatum* y *Chaetomium globosum* como antagonistas frente a *Rhizoctonia solani*. *Actas del III congreso de la SEAE*, 185-190.
- Cappellini, R. and Peterson, J.L. (1965) Formación de macroconidio en cultivos sumergidos por una cepa no esporulante de *Gibberella zeae*. *Biología. Micología.*
- Caro J, NE. (2015) Caracterización de especies de *Fusarium* aisladas de trigo nacional respecto a su capacidad micotoxigénica. Universidad de Concepción. Dirección de postgrado Facultad de Farmacia. Programa de Magíster en Ciencias Farmacéuticas. Chile.
- Dal Bello, G.M., Mónaco, C.I., y Sisterna, M.N. (1994) Efecto de *Trichoderma* spp. sobre el control del tizón de la plántula en trigo ocasionada por *Bipolaris sorokiniana*. *Fitopatologia Brasileira*, 19(3),394-400. Brasil
- Di Pietro, A., Gut-Rella, M., Padhalattko, J.P., & Scheimm, F.K. (1992) Role of antibiotics produced by *Chaetomium globosum* in biocontrol of *Pythium ultimum*, a causal agent of damping off. *Phytopathology*, 82, 131-135.
- Ellis MB. *Dematiaceous Hyphomycetes*. (1971) England, Commonwealth Mycological Institute; 608 p.
- EPPO. (2002) *Cochliobolus lunatus*. En línea: <https://gd.eppo.int/taxon/COCHLU>
- Estrada, G. y Sandoval, I. (2004) Patogenicidad de especies de *Curvularia* en arroz. *Fitosanidad*, 8(4)23:26.
- Gupta, VG., Schmoll, M. Herrera-Estrella, A., Upadhyay, RS, Druzhinina, I. & Tuohy, M. editors. (2014) *Biotechnology and biology of Trichoderma*. Newnes. Amsterdam: Elsevier. DOI: 10.1016/C2012-0-00434-6

- Hall TA. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Harman, G. E. (2006) Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96:190-194.
- Harman, GE., Kubicek, CP., editores (2014) *Trichoderma* and *Gliocladium*. Basic biology, taxonomy and genetics. Vol 1. Boca Ratón (USA): CRC Press. DOI: 10.1201/9781482295320
- Hassan, AA; Zeinab A. Kalboush and Mona M. Saleh. (2017) Efficacy of *Trichoderma* spp as Biocontrol Agents against Rice Brown Spot Disease and Biochemical Approaches. *J. Plant Prot. and Path., Mansoura Univ., Vol.8 (12): 677–686.*
- Hawksworth, DL., Crous, PW., Redhead, SA., Reynolds, DR., Samson, RA., Seifert, KA., Taylor, JW. & Wingfield, MJ. (2011) The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. *IMA Fungus*, 2:105-112.
- Infante, D. Martínez, B., González, N. y Reyes, Y. (2009) Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. *Rev. Protección Veg.* Vol. 24 N° 1:14-21.
- Lorito, M. (2006) La biología molecular de las interacciones entre *Trichoderma*, hongos fitopatógenos y plantas: oportunidades para desarrollar nuevos métodos de control de nefermedades. *Fitosanidad* 10(2):139-140.
- Malbrán, I., Mourellos, C.A., Girotti, J.R., Aulicino, M.B., Balatti, P.A. y Lori, G.A. (2012). Aggressiveness variation of *Fusarium graminearum* isolates from Argentina following point inoculation of field grown wheat spikes. *Crop Protection*. 42:234-243.
- Manamgoda, DS., Cai, L., Bahkali, AH., Chukeatirote, E. & Hyde, KD. (2011) *Cochliobolus*: an overview and current status of species. *Fungal Diversity* 51:3-42.
- Manamgoda, DS., Cai, L., Crous, P. Madri, H., Chukeatirote, E. & Shivas, R. (2012) A Phylogenetic and taxonomic re-evaluation of the *Bipolaris-Cochliobolus-Curvularia* complex. *Fungal diversity*. 56:131-144. 10.1007/s13225-012-0189-2.
- Manamgoda, DS., Rossman, AY., Castlebury, LA., Crous, PW., Madrid, H., Chukeatirote, E. & Hyde, KD. (2014) The genus *Bipolaris* *Studies in Mycology*. pp: 1-68.
- Mandal, S., Srivastava, KD. Aggarwal, R and Singh, DV. (1999) Mycoparasitic action of some fungi on spot blotch pathogen (*Drechslera sorokiniana*) of wheat. *Indian Phytopath.* 52 (1): 39-43.

- Martínez, B., Infante, D. y Reyes, Y. (2013) *Trichoderma* spp. y su función en el control de plagas en los cultivos. Rev. Protección Veg. Vol. 28 N° 1:1-11.
- Mesa-Vanegas, AM., Marin, A., Calle-Osorno, J. (2019) Metabolitos secundarios en *Trichoderma* spp. y sus aplicaciones biotecnológicas agrícolas. Actual. Biol. 41(111)32-44. DOI: 10.17533/udea.acbi.v41n111a02
- Michereff, S.J, Silveira, N.S.S., Reis, A., & Mariano, R.L.R. (1994) Epiphytic bacteria antagonistic to *Curvularia* leaf spot of Yam. *Microbial Ecology*, 28, 101-110.
- Mónaco, C., Sisterna, M.N., Perelló, A., and Dal Bello, G. (2004) Preliminary studies on biological control of the blackpoint complex of wheat in Argentina. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(3):285-290.
- Moya P., Pedemonte D., Amengual S., Franco M., Sisterna M. (2016) Antagonism and modes of action of *Chaetomium globosum* species group, potential biocontrol agent of barley foliar diseases. Bol. Soc. Argent. Bot. 51: 569-578.
- Moya P., Girotti J.R., Toledo A. V., Sisterna M.N. (2018) Antifungal activity of *Trichoderma* VOCs against *Pyrenophora teres*, the causal agent of barley net blotch. Journal of Plant Protection Research 58: 45–53.
- Moya, P., Barrera, V., Cipollone, J. Bedoya, C. Kohan, L., Toledo, A. and Sisterna, M. (2020). New isolates of *Trichoderma* spp. as biocontrol and plant growth-promoting agents in the pathosystem *Pyrenophora teres*-barley in Argentina. Biological Control. 141.104152
- Nicholson, P., Simpson, D., Weston, G., Rezanoor, H., Lees, A.K., Parry, D.W. y Joyce, D. (1998). Detection and quantification of *Fusarium culmorum* and *Fusarium graminearum* in cereals using PCR assays. Physiological Molecular Plant Pathology. 53:17-37.
- Priyadarshani, CDN. Deshappriya, N and Sandamali, GI. (2018) Effect of fungal endophytes of rice variety Ld 368 on growth and Brown spot disease incidence of rice. Tropical Plant Research. 3(3): 292-302. DOI: 10.22271/tpr.2018.v5.i3.037 ISSN (online):2349-1138
- Sandoval, MC y Belesansky, C. (2020) Producción artesanal del hongo antagónico *Trichoderma* Persoon en sustrato sólido. Nota Técnica. Revista de Divulgación Técnica Agropecuaria; Agroindustrial y Ambiental. Facultad de Ciencias Agrarias. UNLZ. Vol 7 (3): 55-64.
- Sivanesan, A. (1987) Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *CAB International Mycological Institute (CMI)*. Mycological Papers 158. 1-261.
- Soyong, K. (1992a) Biological Control of rice blast disease by seed coating with antagonistic fungi. Songklanakarin Journal of Science and Technology, 14:59-65.

- Soyong, K. (1992b) Antagonism of *Chaetomium cupreum* to *Pyricularia oryzae*. *J. of Plant Protection in the Tropics*, 9(3),17-23.
- Soyong K., Kanokmedhakul S., Kukongviriyapa V., & Isobe M. (2001) Application of *Chaetomium* species (Ketomium®) as a new broad spectrum biological fungicide for plant disease control: A review article. *Fungal Diversity*, 7:1-15.
- Thapa S., Sotang, N., Kumari-Limbu, A. and Joshi, A. (2020) Impact of *Trichoderma* sp. in Agriculture: A Mini-Review *J Biol Today's World*. 9(7): 227.
- Tongon, R. and Soyong, K. *Journal of Agricultural Technology* (2015) Application of nano-particles from *Chaetomium globosum* to control leaf spot of rice. Vol. 11(8): 1919-1926.
- Udayanga, D., Lui X., McKenzie, EHC., Chukeatirote, E., Bahkali, AHA and Hyde, KD. (2011) The genus *Phomopsis*: biology, applications, species concepts and names of common phytopathogens. *Fungal Diversity*. 50:189-225. DOI: 10.1007/s1322-011-0126-9
- Von Arx, J. A., Guarro, J. & Figueras, M. J. (1986) The ascomycete genus *Chaetomium*. *Beihefte zur Nova Hedwigia* 84: 1–162.

CAPITULO IV

EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO ANTIFÚNGICO DE *Trichoderma harzianum*, *Chaetomium* *globosum* Y EL EXTRACTO DE AJO

4.1 Introducción

El ajo (*Allium sativum*) es una planta perteneciente a la familia *Liliaceae* y subfamilia *Allioideae* que se caracteriza por tener un sistema radicular constituido por una raíz bulbosa compuesta de 6 a 12 bulbillos, reunidos en su base por medio de una película delgada para formar la “cabeza de ajo”. Cada bulbillo se encuentra envuelto por una hoja protectora blanca o rojiza, membranosa muy delgada (Bender y Bárcenas, 2013). En la actualidad se conocen más de 100 compuestos biológicamente activos derivados de *Allium sativum* contenidos sobre todo en el bulbo. La aliína es el compuesto organosulfurado que se encuentra en mayor proporción y constituye el substrato principal para la enzima alinasa que, una vez liberada de su compartimiento intracelular por daño o lisis celular, lo transforma en tiosulfonato alicina, una sustancia inestable e incolora que le confiere el olor característico al ajo y a la cual se le han descrito múltiples actividades biológicas (Ledezma y Apitz-Castro, 2006).

El ajo contiene por lo menos 33 compuestos azufrados, varias enzimas, 17 aminoácidos y algunos minerales que contribuyen a su actividad antimicrobiana. De todas las especies de *Allium*, el ajo es el que contiene la mayor concentración de compuestos azufrados, lo que le da una actividad antimicrobiana muy potente. Los principales compuestos azufrados son la aliína, alicina, ajoeno, trisulfuro de dialilo, salilcisteína, vinilditiínas, disulfuro de alilpropilo, S-alilmercapto cisteína, entre otros. Entre las enzimas importantes en la actividad antimicrobiana se encuentra la alinasa, peroxidasa y mirosinasa. Los aminoácidos y sus glucósidos, en especial la ariginina, también influyen de manera importante en la actividad antimicrobiana, al igual que el selenio, germanio, telurio y trazas de otros minerales (Bender y Bárcenas, 2013).

Se considera que la alicina tiene actividad antimicrobiana porque modifica la biosíntesis de los lípidos y síntesis del RNA de los microorganismos y disminuye el perfil de lípidos de los mismos. Se ha demostrado además que este compuesto activo causa irritación cuando se consumido excesivamente; de igual manera, otros compuestos azufrados liposolubles presente en el ajo también has resultado ser tóxicos en grandes concentraciones (Rahman, 2007).

En cuanto a los hongos, se ha probado que los extractos de ajo disminuyen su absorción de oxígeno, reducen su crecimiento, inhiben la síntesis de lípidos, proteínas y ácidos

nucleicos y dañan las membranas (Bender y Bárcenas, 2013). El componente principal del ajo que inhibe el crecimiento de hongos es la alicina, aunque también se ha demostrado que otros compuestos activos (trisulfuro de dialilo y ajoeno) tienen propiedades antifúngicas al inhibir la biosíntesis de fosfatidilcolina, provocando de esta manera la muerte celular (Harris *et al.*, 2001).

4.1.1 Objetivos

Los objetivos planteados en el presente capítulo fueron:

- Obtener el extracto de ajo en diferentes concentraciones y evaluar su efecto en el crecimiento miceliar de los patógenos seleccionados.
- Evaluar el efecto antifúngico de los tratamientos biológicos y el extracto de ajo sobre la micoflora asociada al manchado del grano/semilla en ensayos *in vitro*

4.2 Materiales y Métodos

4.2.1 Extracto de ajo

4.2.1.1 Crecimiento miceliar

En cajas de Petri conteniendo medio de cultivo agar papa glucosado al 2% (APG) fundido y enfriado a una temperatura de 25-30°C, se incorporó el extracto de ajo (comercial y el elaborado de forma artesanal). Inicialmente las pruebas se realizaron con un extracto de ajo comercial; sin embargo, se decidió que para las pruebas siguientes se trabajaría con el extracto acuoso de ajo elaborado de forma artesanal. Esta decisión fue motivada debido a la facilidad y el bajo costo en la fabricación de este extracto vegetal y la amplia posibilidad de ser utilizado por pequeños agricultores y/o huertas orgánicas.

4.2.1.1.1 Extracto de ajo comercial

Para los ensayos con el extracto de ajo comercial, la Empresa FIDELITY SECURITY S.A (*) facilitó el extracto acuoso al 100% siendo su composición: Disulfuro de alilo 4,9%, Trimetiltiourea 11,04%, Tiopental 3%, Trisulfuro de alilo 8,7%, otros csp 100%.

En cajas de Petri se incorporó el extracto de ajo comercial en diferentes volúmenes: 0,5ml, 1ml, 3ml y 5ml y se agregaron 10ml de APG, dando las siguientes concentraciones 4,8%, 9%, 23% y 33%, respectivamente. Las cajas con medio de cultivo APG sin producto se utilizaron como controles positivos (Testigos). En el centro de la caja de Petri con el

medio de cultivo APG solidificado y para cada concentración se colocó un disco de 5 mm de diámetro del cultivo de los patógenos seleccionados, extraído con un sacabocado. Las cajas se incubaron en estufa a 25°C, las mediciones del crecimiento diametral de las colonias se realizaron diariamente hasta completar 5 días. La evaluación se efectuó con los valores obtenidos al quinto (5) día midiendo el crecimiento diametral de las colonias. Las medias se compararon por el test de Duncan, con una probabilidad de 5 % ($p \leq 0,05$). En todos los casos se utilizó la versión libre de InfoStat estudiantil, año 2017 (InfoStat-Statistical Software).

(*) Acuerdo realizado entre la empresa Fidelity Security S.A – Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales- UNLP. Tema: “EMPLEO DE EXTRACTOS NATURALES PARA EL CONTROL DE PATÓGENOS EN SEMILLAS DE CEREALES Y HORTÍCOLAS” N° Expediente 200-3290/17. Firma del Acuerdo 2 de Noviembre de 2017

4.2.1.1.2 Extracto de ajo natural

La elaboración del extracto acuoso de ajo natural consistió en la maceración de los dientes de ajo (200gr), previo desinfectado con hipoclorito de sodio al 5% y lavado con agua destilada. El producto macerado fue diluido y homogenizado en 250ml de agua destilada estéril. El extracto obtenido fue filtrado y envasado a 5°C, asumiendo que esta solución es el 100% de concentración. Para los ensayos, se probaron diferentes concentraciones: 5%, 10%, 12%, 14%, 15% y 20%. Las cajas con medio de cultivo APG sin producto se utilizaron como controles positivos (Testigos). Se incluyeron para los ensayos 3 repeticiones por concentración.

Se calculó el porcentaje de inhibición miceliar (MGI (%)) para los tratamientos con extracto de ajo natural, mediante la fórmula de Michereff *et al.* (1994).

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

Donde,

MGC = Long. media del crecimiento miceliar testigo

MGT = Long. media del crecimiento miceliar tratado.

En el centro de la caja de Petri con el medio de cultivo APG solidificado y para cada tratamiento/concentración se colocó un disco de 5 mm de diámetro del cultivo de los patógenos seleccionados, extraído con un sacabocado. Las cajas se incubaron en estufa a 25°C, las mediciones del crecimiento diametral de las colonias se realizaron diariamente

hasta completar 5 días. La evaluación se efectuó con los valores finales obtenidos al quinto (5) día de crecimiento. Las medias se compararon por el test de Duncan, con una probabilidad de 5 % ($p \leq 0,05$). En todos los casos se utilizó la versión libre de InfoStat estudiantil, año 2017 (InfoStat-Statistical Software).

4.2.1.2 Análisis de sensibilidad para los patógenos (*B. oryzae*, *C. lunata* y *F. graminearum*) frente al tratamiento con extracto de ajo natural

Con los datos obtenidos se realizaron análisis de regresión no lineal (modelos Gompertz y Logístico) entre el porcentaje de inhibición micelial (MGI) y la concentración del extracto de ajo natural (%) utilizada para evaluar el comportamiento sobre *B. oryzae*, *C. lunata* y *F. graminearum*. Se trabajó con la versión libre de InfoStat estudiantil, año 2017 (InfoStat-Statistical Software). Como criterio de ajuste se utilizó el cuadrado medio del error. Para obtener los valores de CI_{50} , correspondientes a la concentración del extracto de ajo natural que inhibe el crecimiento de los patógenos en un 50% se reemplazó el valor “50” en las ecuaciones resultantes; para todos los patógenos se obtuvo un valor de CI_{50} despejando de las ecuaciones de los modelos no lineales utilizando Excel de Microsoft Office 2007 (Molina-Vargas y Melo-Martínez, 2010).

4.2.2 Tratamientos biológicos

4.2.2.1 Adherente en grano/semilla

Se hicieron ensayos previos para seleccionar un adherente (tales como sacarosa y/o Tween al 1%), con el fin de facilitar la fijación de los tratamientos biológicos (*Trichoderma harzianum* (cepa T2) y *Chaetomium globosum* (cepa 4)) al grano/semilla de arroz. Se eligió realizar los ensayos con *C. globosum* (cepa 4) debido a que este antagonista tiene una tasa de crecimiento menor que *T. harzianum*, facilitando la observación y la evaluación.

Para los ensayos previos se usaron 60 granos/semillas de arroz por adherente (Tween 1%, sacarosa y un control con agua destilada); estas se dejaron durante 20 minutos en las preparaciones de 10 ml cada una. Para el adherente con Tween se agregaron 3 gotas de Tween al 1% al preparado con el antagonista y al preparado con sacarosa, 0,3 gramos.

4.2.2 Actividad antifúngica de las cepas seleccionadas de *T. harzianum*, *C. globosum*, extracto de ajo natural y fungicida en los granos/semillas de arroz.

Los granos/semillas de la variedad Yeruá de la localidad de Los Hornos (provincia de Buenos Aires) previamente desinfectados con hipoclorito de sodio al 5% durante 5 minutos, se sumergieron en las preparaciones de los diferentes tratamientos:

- Tratamientos biológicos (*T. harzianum*, *C. globosum*): Para el tratamiento con *Trichoderma harzianum* (cepa T2) se usó una concentración de 10^{-8} y para el tratamiento con *Chaetomium globosum* (cepa C4) una concentración de 10^{-6} , los granos/semillas se dejaron durante 20 minutos en las preparaciones.
- Tratamientos con extracto de ajo: ajo al 13% durante 8 h, 12 h y 24 h de exposición.
- Tratamiento con fungicida. Rovral es un fungicida de contacto directo sobre las esporas presentes en la superficie del tejido vegetal; combinado con una acción translaminar que le permite penetrar en el tejido de las plantas; pertenece al grupo químico de las dicarboxamidas, su ingrediente activo es la Iprodiona; funciona inhibiendo la síntesis de ADN y ARN afectando la germinación de esporas, actúa sobre el tubo germinativo de las esporas, evitando la infección, bloquea el desarrollo de micelio, interviene en el desarrollo de los cuerpo fructíferos. (Información extraída de la ficha técnica del producto).

La clasificación de los principios activos usados según la FRAC se muestra en la Tabla 1 (https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2021--final.pdf?sfvrsn=f7ec499a_2)

Tabla 1. Clasificación para Rovral de los principios activos usados según la FRAC Code List 2021

Modo de acción	Sitio de acción y código	Nombre del grupo	Grupo Químico	Principios activos	Código	Riesgo de resistencia (FRAC)
E: Señales de Traducción	E3: (MAP/ Histidina-Quinasa en ósmosis, señales de traducción)	Dicarboximidias	Dicarboximidias	Iprodiona	2	Medio a alto

- Control con agua destilada estéril.

Se sembraron 200 granos/semillas por tratamiento (4 repeticiones de 50 granos/semillas) en cajas de Petri que contenía medio de cultivo agar papa glucosado (APG) y fueron

incubadas en cámara de cría climatizada ($21^{\circ}\pm 1^{\circ}\text{C}$; 75% HR; 12 h de luz + UV/12 h de oscuridad). A los 10 días se evaluó la micoflora presente en cada uno de los tratamientos con el fin de confirmar el efecto antifúngico de los mismos. Esta evaluación se efectuó con la ayuda de lupa estereoscópica y microscopio.

- Para los tratamientos biológicos se contabilizaron el número de granos/semillas con presencia tanto del hongo antagonista (*T. harzianum* (cepa T2) y/o *C. globosum* (cepa C4)), como de las colonias pertenecientes a la micoflora propia de los granos/semillas y los posibles patógenos.
- Para los tratamientos con extracto de ajo y fungicida se contabilizaron el número de granos/semillas sin presencia de las colonias pertenecientes a la micoflora propia de los granos/semillas y posibles patógenos de arroz.

Las medias se compararon por el test de Duncan, con una probabilidad de 5 % ($p\leq 0,05$). En todos los casos se utilizó la versión libre de InfoStat estudiantil, año 2017 (InfoStat-Statistical Software).

4.3 Resultados

4.3.1 Extracto de ajo

4.3.1.1 Crecimiento miceliar

4.3.1.1.1 Extracto de ajo comercial

En la Tabla 2 se detallan los diámetros para cada patógeno estudiado y el promedio de estos para cada tratamiento.

Tabla 2: Tratamientos con extracto de ajo comercial para los patógenos *B. oryzae*, *C. lunata* y *F. graminearum*

Concentración (%)	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Curvularia lunata</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	Promedio
	Diámetro (mm)			
0 (Testigo)	8,1	8,35	8	8,15a
4,8	6,2	7,9	7,1	7,07ab
9	5,2	7,7	5,2	6,03b
23	0,2	1	0	0,4c
33	0	0,5	0	0,17c

Letras distintas expresan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test de Duncan ($p<0,05$).

En la Figura 1, se observan los valores promedio de los diámetros (mm) de las colonias de los patógenos (*B. oryzae*, *C. lunata* y *F. graminearum*) tratadas con el extracto de ajo comercial y sus testigos. El crecimiento miceliar de las especies patógenas disminuye a medida que aumenta la concentración de extracto de ajo comercial; El tratamiento al 4,8% no se diferenció del testigo, a diferencia de los tratamientos de 9,0%, 23,0% y 33% con los valores promedio de 6.03mm, 0,4mm y 0,17mm respectivamente, que presentaron diferencias significativas con el valor promedio del testigo de 8,15mm.

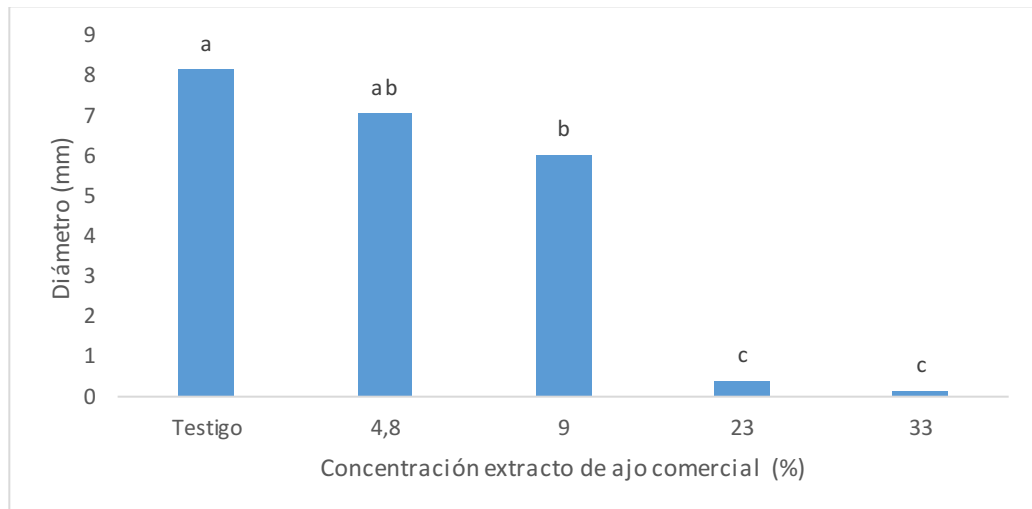


Figura 1: Valores promedio del crecimiento radial de las colonias de los patógenos (*B. oryzae*, *C. lunata* y *F. graminearum*) tratadas con el extracto de ajo comercial y sus testigos. Letras distintas expresan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test de Duncan ($p < 0,05$).

Igualmente, se puede apreciar como *F. graminearum* fue más sensible a los tratamientos (23% y 33%), en los cuales ya no se percibe crecimiento radial de dicho patógeno (Figura 2).

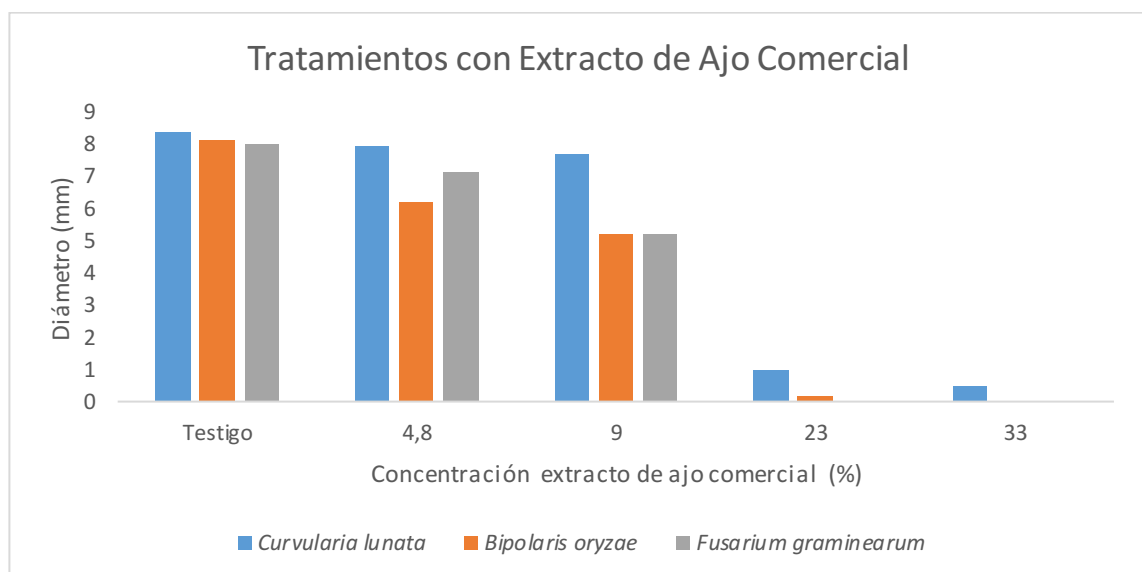


Figura 2: Comparación del crecimiento radial de las colonias de *B. oryzae*, *C. lunata* y *F. graminearum* con extracto de ajo comercial frente a los tratamientos ensayados y sus testigos

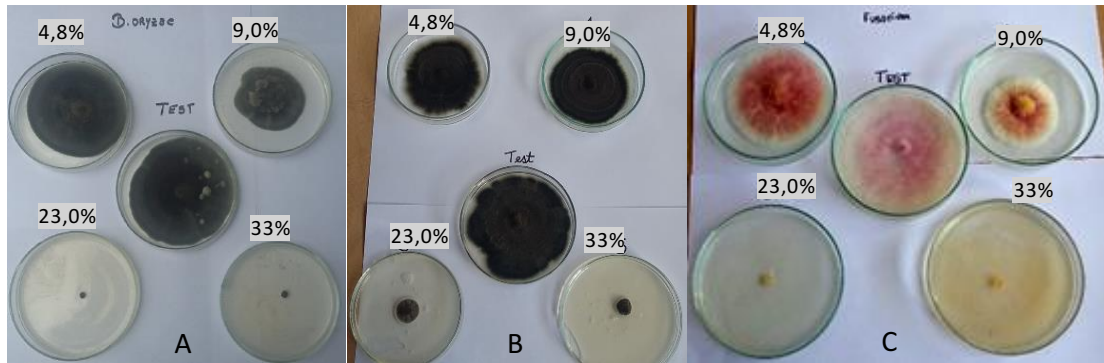


Figura 3: Crecimiento micelial de *B. oryzae* (A), *C. lunata* (B) y *F. graminearum* (C) en las cajas de Petri con medio de cultivo APG y extracto de ajo comercial a diferentes concentraciones y sus testigos

4.3.1.1.2 Extracto de ajo natural

Los datos obtenidos en los tratamientos con el extracto de ajo comercial, sirvieron de base para realizar las siembras y hallar las concentraciones que fueron usadas con el extracto de ajo natural.

Para el patógeno *Bipolaris oryzae* frente al extracto de ajo natural se observaron valores de inhibición micelial del 89,9% tanto para las concentraciones del 15% y el 20%, las cuales no se diferenciaron estadísticamente de la concentración del 14% que inhibió un 90,6% el crecimiento del hongo. Las concentraciones del 10%, 11%, 12% y 13% mostraron valores de inhibición del 61,4%, 77,1%, 78,4% y 78,6% respectivamente y no presentaron diferencias significativas entre sí (Figura 4).

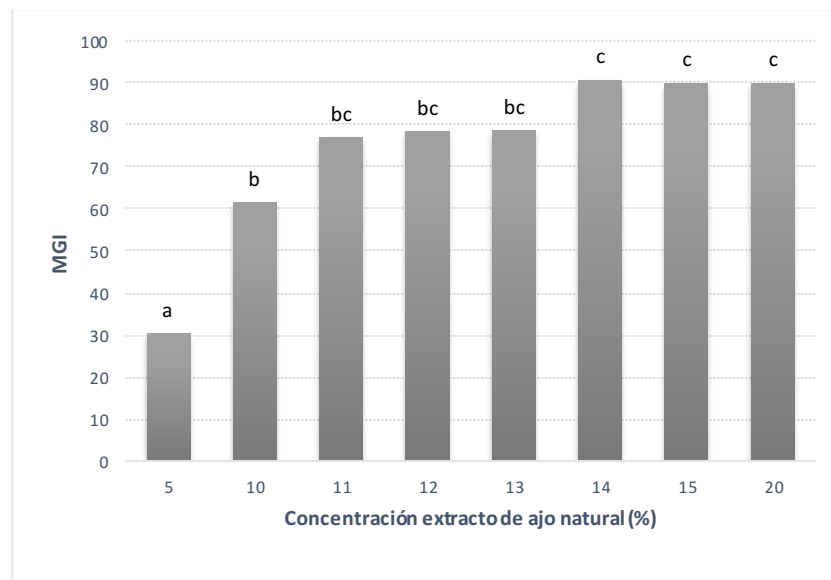


Figura 4. Porcentaje de inhibición micelial (MGI) de *B. oryzae* a varias concentraciones de extracto de ajo natural. Letras distintas expresan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test de Duncan ($p < 0,05$).

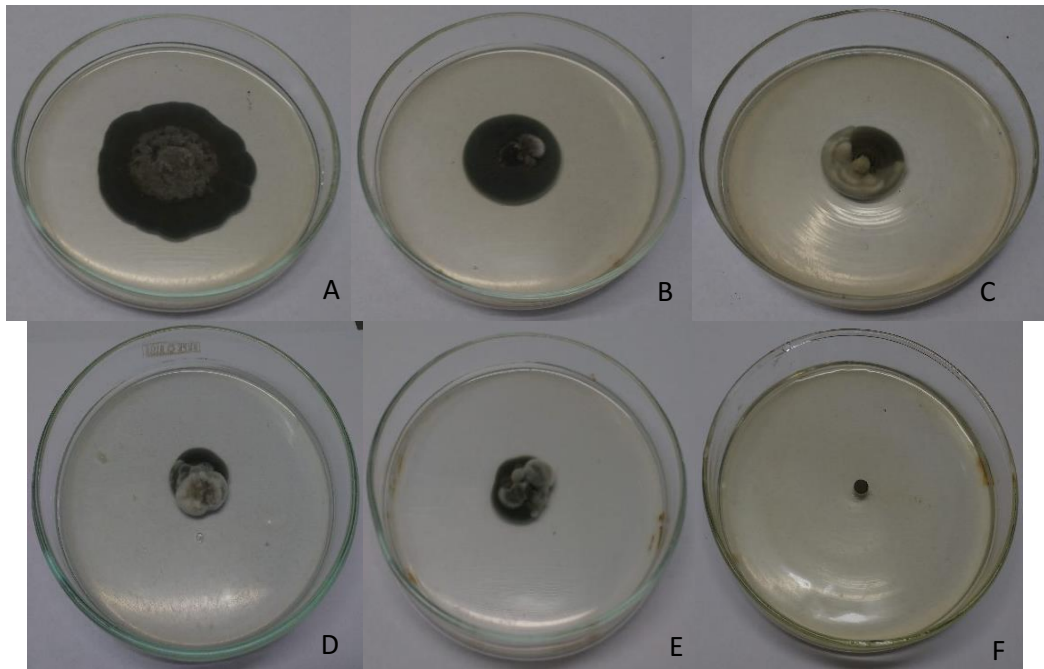


Figura 5. Crecimiento miceliar de *B. oryzae* a varias concentraciones de extracto de ajo natural; testigo (A); al 5% (B); al 10% (C); al 12% (D); al 14% (E); al 15% (F).

En cuanto a *Curvularia lunata* el extracto de ajo natural mostró valores de inhibición miceliar del 94,1% para las concentraciones del 12%, 14%, 15%, 16% y 18% y valores del 93,6% para las concentraciones del 20%, 30% y 50%, las cuales no presentaron diferencias significativas entre sí (Figura 6).

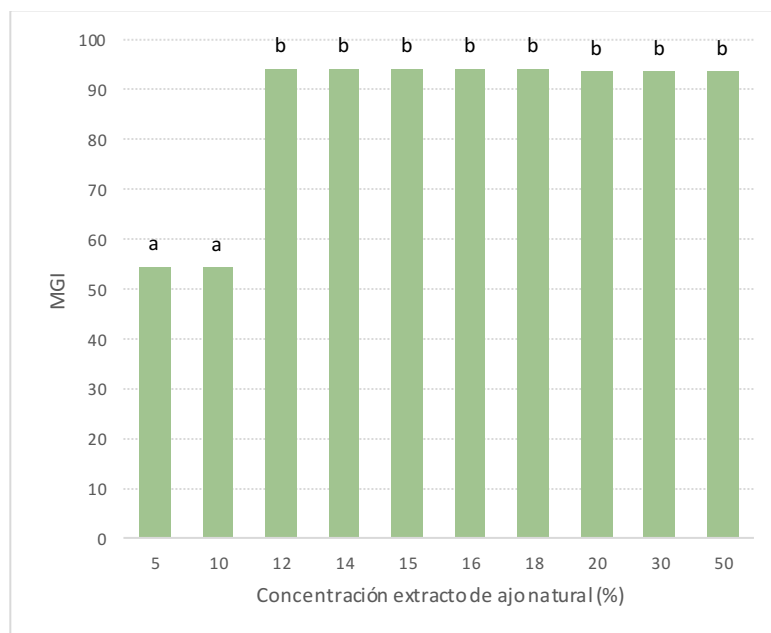


Figura 6. Porcentaje de inhibición miceliar (MGI) de *C. lunata* a varias concentraciones de extracto de ajo natural. Letras distintas expresan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test de Duncan ($p < 0,05$).

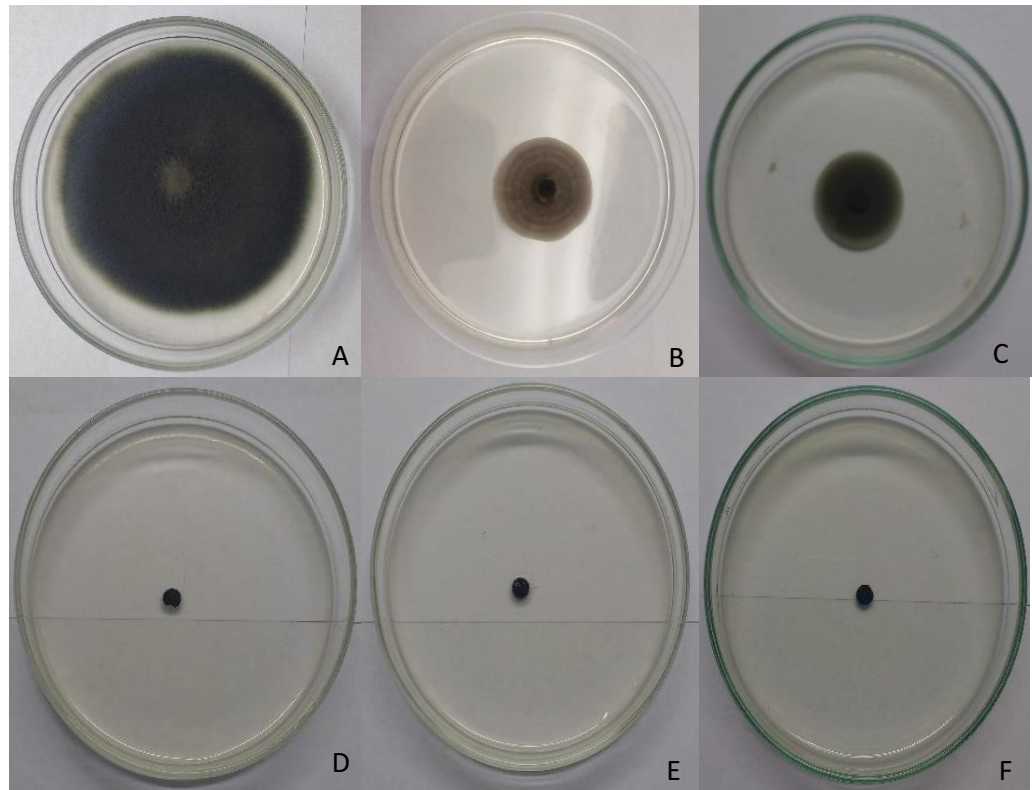


Figura 7. Crecimiento micelial de *C. lunata* a varias concentraciones del extracto de ajo natural; testigo (A); al 5% (B); al 10% (C); al 12% (D); al 14% (E); al 15% (F)

Para *Fusarium graminearum* se puede observar cómo el extracto de ajo natural inhibe el crecimiento micelial con valores por encima del 94% a partir de la concentración del 10%. Las concentraciones del 5%, 6% y 7% mostraron valores de 28,3%, 28,5% y 28,7% respectivamente, no presentaron diferencias significativas entre sí (Figura 8).

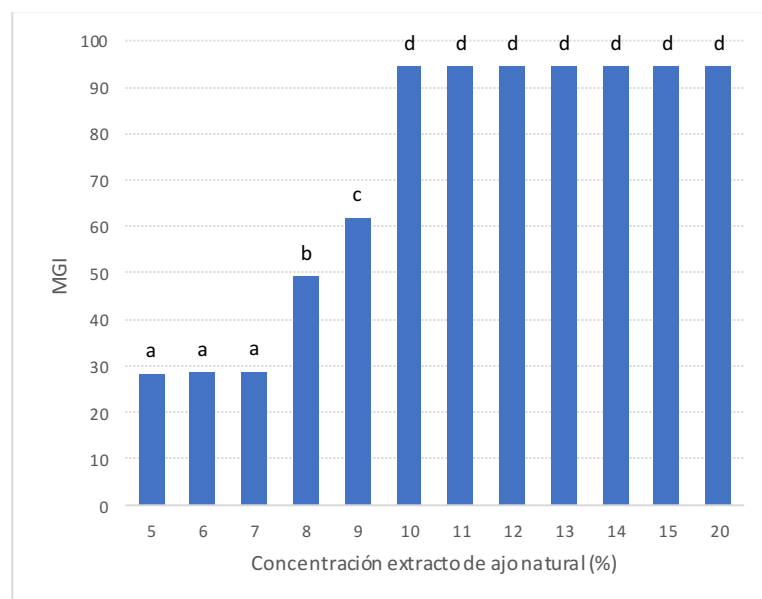


Figura 8. Porcentaje de inhibición micelial (MGI) de *F. graminearum* a varias concentraciones del extracto de ajo natural. Letras distintas expresan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test de Duncan ($p < 0,05$).

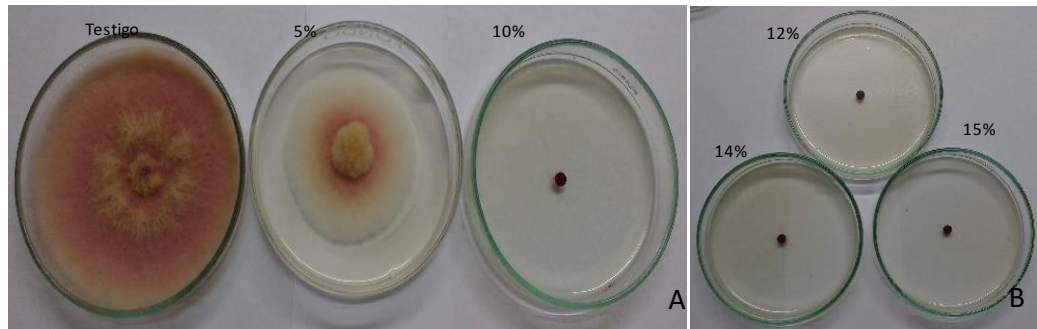


Figura 9. Crecimiento micelial de *F. graminearum* a varias concentraciones del extracto de ajo natural; testigo, al 5% y al 10% (A); al 12%, al 14% y al 15% (B)

Fusarium graminearum resultó ser mucho más sensible a las concentraciones del extracto de ajo natural, presentando una inhibición en el crecimiento micelial de 94,44% a partir de la concentración del 10%, por tal motivo se realizaron siembras adicionales para concentraciones del 6%, 7%, 8% y 9% donde se pudo observar crecimiento del hongo patógeno (ver figuras 9, 10).

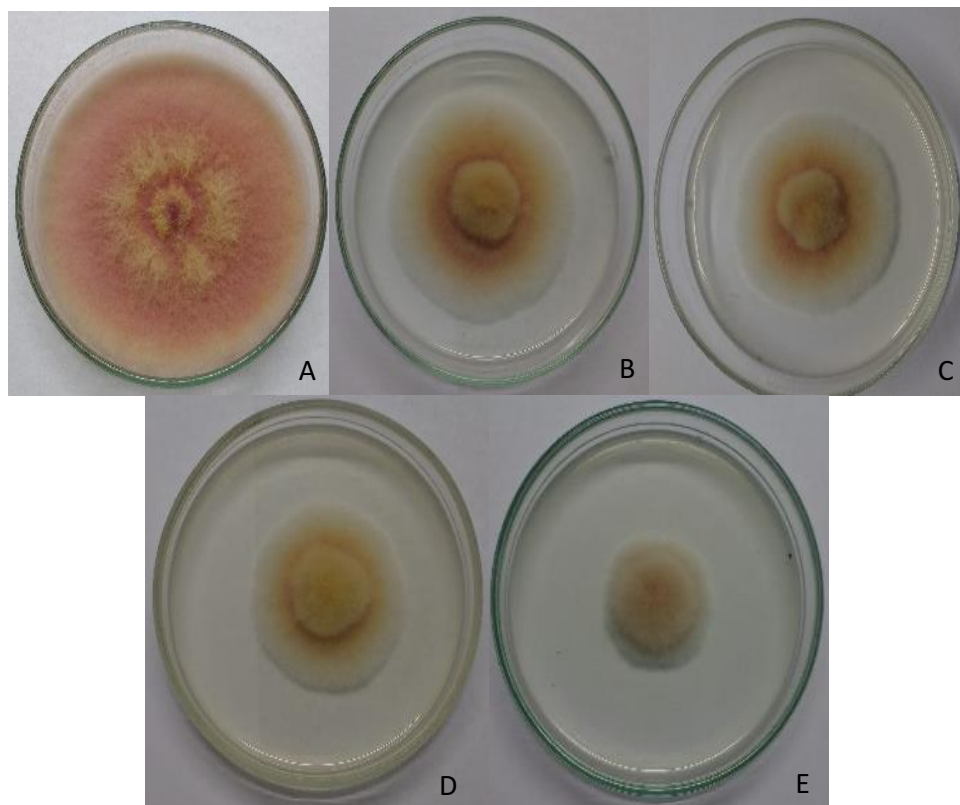


Figura 10: Crecimiento micelial de *F. graminearum* a varias concentraciones del extracto de ajo natural; testigo (A); al 6% (B); al 7% (C); al 8% (D); al 9% (E)

En la Tabla 3 se muestran los valores medios y promedios del porcentaje de inhibición micelial (MGI) de los patógenos estudiados a las concentraciones de extracto de ajo natural del 5%, 10%, 12%, 14%, 15% y 20%. Se puede observar que a una concentración

del 14% todos los hongos patógenos tratados con el extracto de ajo natural presentaron una inhibición por encima del 90%.

Tabla 3: Valores medios y promedios del porcentaje de inhibición micelar (MGI) para *B. oryzae*, *C. lunata* y *F. graminearum* a diferentes concentraciones del extracto de ajo natural

Concentración (%)	<i>Bipolaris oryzae</i>	<i>Curvularia lunata</i>	<i>Fusarium graminearum</i>	Promedio
5	30,25a	54,35a	28,33a	37,64a
10	61,44b	54,31a	94,44b	70,06b
12	78,4bc	94,07b	94,44b	88,97c
14	90,63c	94,07b	94,44b	93,05c
15	89,94c	94,07b	94,44b	92,82c
20	89,94c	93,56b	94,44b	92,65c

Las medias con la misma letra no tienen diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test de Duncan ($p < 0,05$).

Las figuras 11 y 12 corresponden a las medias y promedios de los porcentajes de inhibición micelar (MGI) de los 3 hongos patógenos a las concentraciones de extracto de ajo natural del 5%, 10%, 12%, 14%, 15% y 20%.

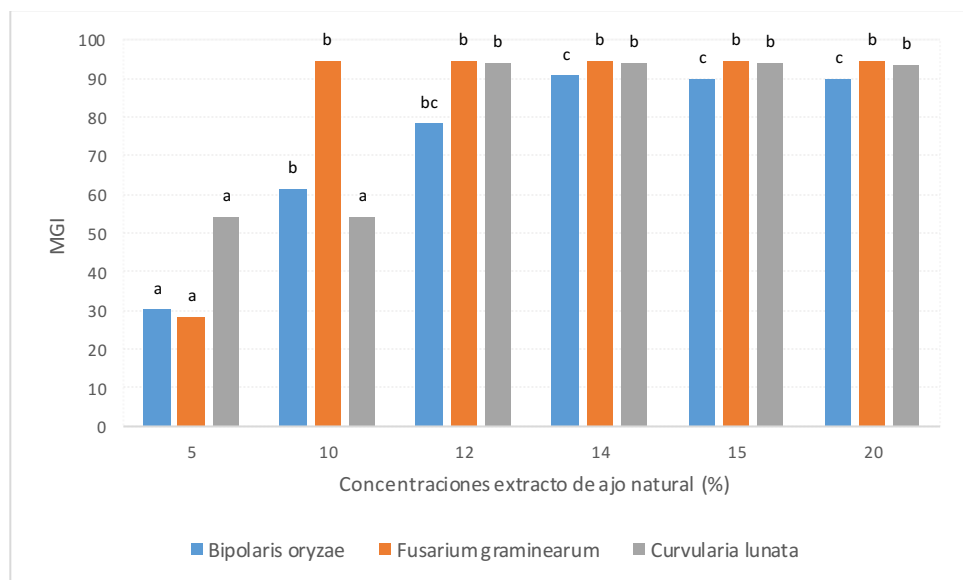


Figura 11. Valores medios del porcentaje de inhibición micelar (MGI) de *B. oryzae*, *C. lunata* y *F. graminearum* a varias concentraciones de extracto de ajo natural. Letras distintas expresan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test de Duncan ($p < 0,05$).

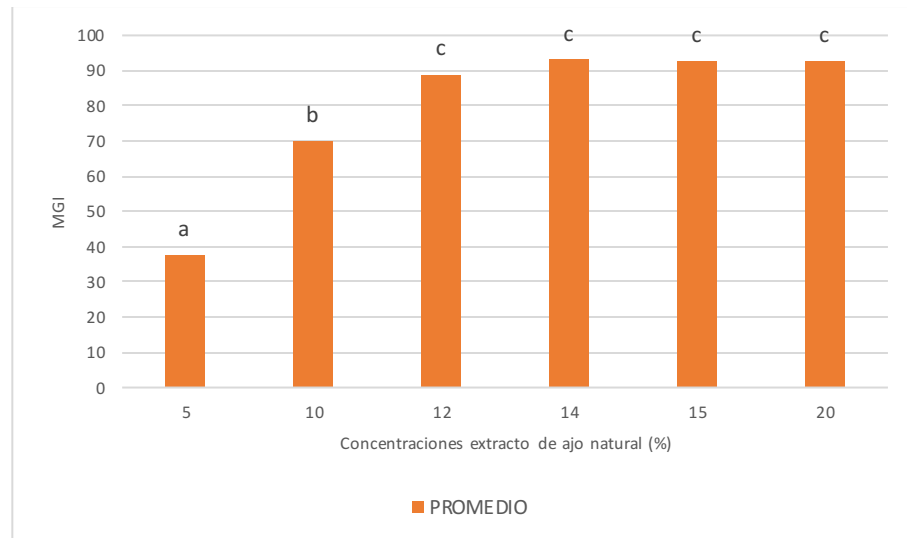


Figura 12. Valores promedio del porcentaje de inhibición micelial (MGI) de *B. oryzae*, *C. lunata* y *F. graminearum* a varias concentraciones de extracto de ajo natural. Letras distintas expresan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test de Duncan ($p < 0,05$).

4.3.1.2 Análisis de sensibilidad para los patógenos (*B. oryzae*, *C. lunata* y *F. graminearum*) frente al tratamiento con extracto de ajo natural

En la Tabla 4 se muestran las ecuaciones utilizadas para el cálculo de la concentración inhibitoria media (CI_{50}) de los patógenos *B. oryzae*, *C. lunata* y *F. graminearum*, los valores de CI_{50} y el cuadrado medio del error utilizado como criterio de ajuste. Los valores de CI_{50} fueron de 7,53%, 5,7% y 7,71% para *B. oryzae*, *C. lunata* y *F. graminearum* respectivamente con lo que se puede decir en forma preliminar que *C. lunata* fue más sensible que *B. oryzae* y *F. graminearum* al tratamiento con el extracto de ajo natural.

Tabla 4. Ecuaciones de regresión no lineales utilizadas para el cálculo de la concentración inhibitoria media (CI_{50}). CMe: Cuadrado medio del error

Patógeno	Modelo	Ecuación	CI_{50}	CMe
<i>B. oryzae</i>	Gompertz	$MGI = 96,11e^{[-4,29e^{(-0,25*Conc)}]}$	7,53	97,99
<i>C. lunata</i>	Gompertz	$MGI = 95,87e^{[-2,71e^{(-0,25*Conc)}]}$	5,70	82,48
<i>F. graminearum</i>	Logístico	$MGI = \frac{98,33}{[1 + 145,52e^{(-0,65*Conc)}]}$	7,71	57,05

En la Figura 13 se pueden observar las curvas de los modelos de regresión no lineales para inhibición micelial (MGI) en función de la concentración de extracto de ajo natural (%) para *B. oryzae*, *C. lunata* y *F. graminearum*.

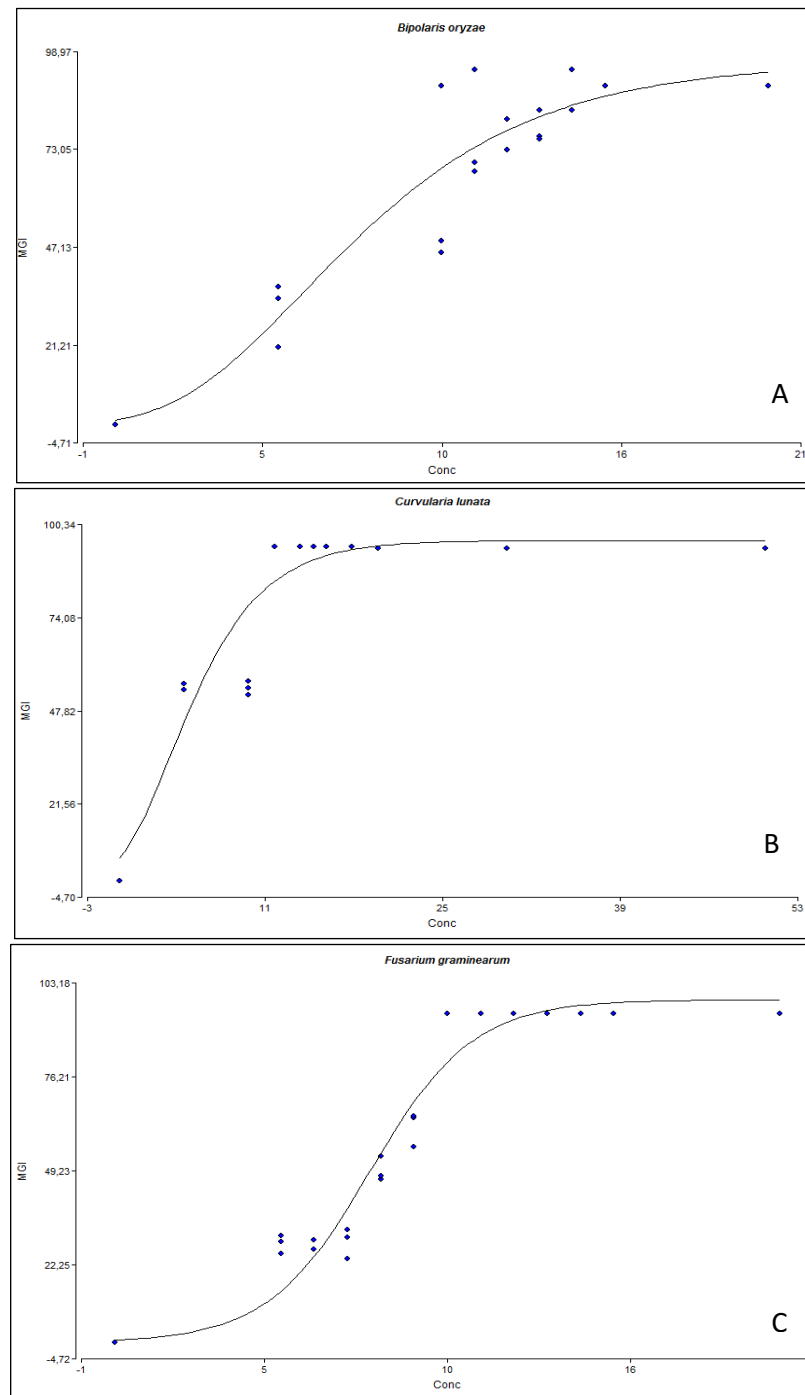


Figura 13. Gráficas de los modelos de regresión no lineales para el cálculo de la concentración inhibitoria media (CI_{50}) de los patógenos *B. Oryzae* (modelo Gompertz) (A); *C. lunata* (modelo Gompertz) (B); *F. graminearum* (modelo Logístico) (C)

4.3.2 Tratamientos biológicos

4.3.2.1 Adherente en grano/semilla

Aunque se obtuvieron buenos resultados con ambos adherentes (Tween al 1% y sacarosa), se seleccionó la fijación de los tratamientos biológicos con sacarosa, debido al bajo costo y su fácil obtención. En la Figura 14, se puede observar el tratamiento control con agua destilada, y los tratamientos con *C. globosum* (cepa C4) tanto con sacarosa, como con Tween al 1%.

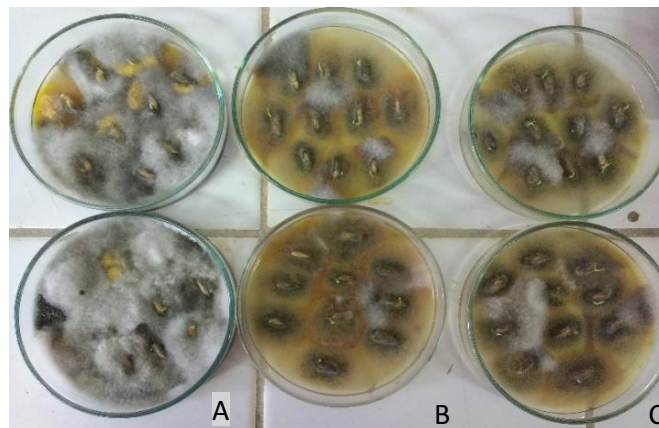


Figura 14: Tratamiento control (A); tratamiento *C. globosum* (C4) adherido con sacarosa (B), tratamiento *C. globosum* (C4) adherido con Tween al 1% (C)

4.3.3 Actividad antifúngica de las cepas seleccionadas de *T. harzianum*, *C. globosum*, extracto de ajo natural y fungicida en los granos/semillas de arroz

4.3.3.1 *Trichoderma harzianum*

Macroscópicamente, el tratamiento con *T. harzianum* (Cepa T2) presentó un mayor crecimiento sobre la superficie de la caja de Petri que contenía los granos/semillas sembrados. Se observó el crecimiento del hongo antagonista alrededor de las colonias de la micoflora propia de los granos/semillas que se lograron desarrollar y sobre los granos/semillas sembrados (ver figuras 15, 16).

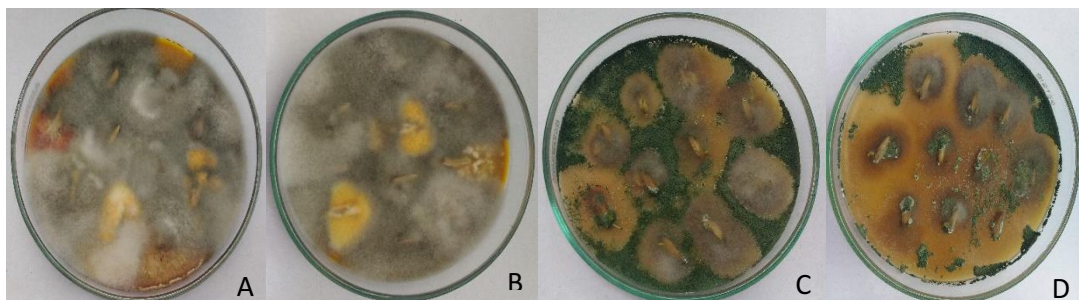


Figura 15: Tratamiento control (A)(B); tratamiento antifúngico con *T. harzianum* (C)(D)



Figura 16: Crecimiento de *T. harzianum* alrededor y sobre los granos/semillas de arroz

Para el tratamiento antifúngico con *T. harzianum* en cada una de las repeticiones se obtuvieron valores del 62%, 74%, 86% y 74% de granos/semillas que presentaron crecimiento del antagonista, con respecto al 38%, 26%, 14% y 26% que aún bajo el tratamiento desarrollaron el crecimiento de la micoflora propia del manchado (Figura 17).

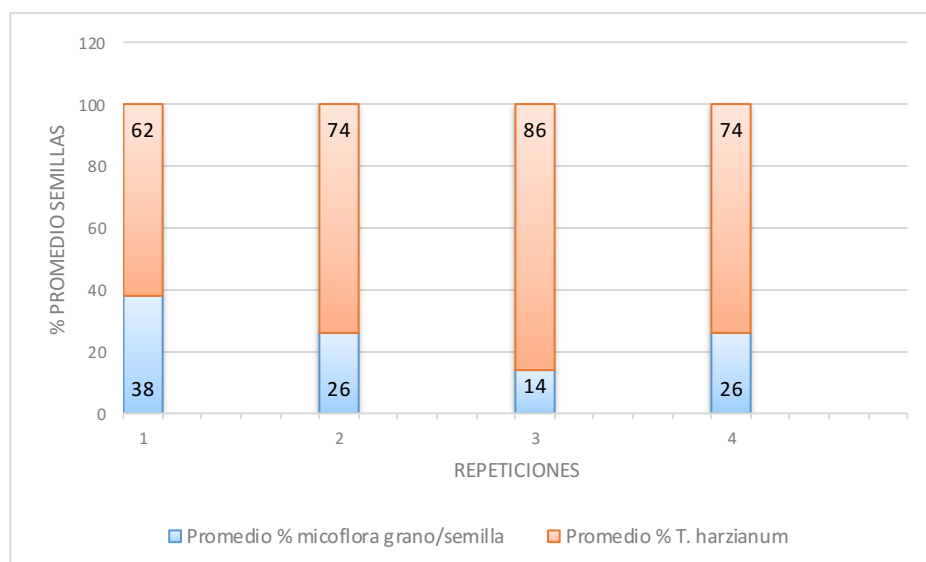


Figura 17. Promedio de granos/semillas con micoflora propia del manchado y promedio de granos/semillas con crecimiento de *T. harzianum*

4.3.3.2 *Chaetomium globosum*

A nivel macroscópico, los granos/semillas tratados con *C. globosum* (Cepa C4) presentaron el crecimiento de la micoflora propia de los granos/semillas de arroz, sin embargo, se logra visualizar una disminución en dicho crecimiento frente al tratamiento control. Se pudo observar cómo el hongo antagonista rodeó los granos/semillas e incluso se desarrolló sobre ellos. Y en algunos casos evitó el crecimiento de las colonias propias de la micoflora de los granos/semillas de arroz (ver figuras 18, 19).

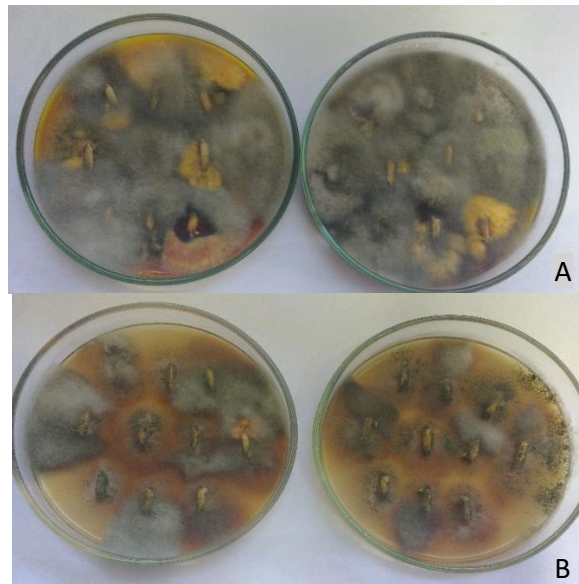


Figura 18: Tratamiento control (A); tratamiento antifúngico con *C. globosum* (B).



Figura 19: Crecimiento de *C. globosum* alrededor y sobre los granos/semillas de arroz.

En la Figura 20 se observan los valores promedio de cada una de las 4 repeticiones. Las repeticiones 1, 2, 3 presentaron un mayor crecimiento del hongo *C. globosum* con valores del 64%, 52% y 60% con respecto al desarrollo de la micoflora de los granos/semillas y patógenos propios del manchado.

En cuanto a la repetición 4, se identificaron valores del 42% de granos/semillas que desarrollaron el crecimiento de *C. globosum* y un 58% de granos/semillas que aún sometidas al tratamiento antifúngico desarrollaron el crecimiento de la micoflora de los granos/semillas y patógenos propios del manchado.

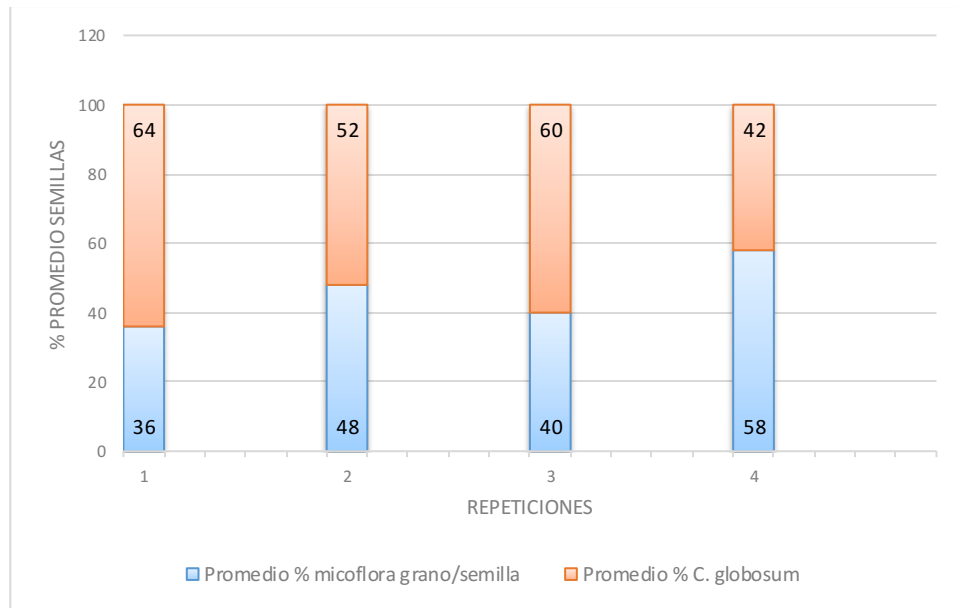


Figura 20. Promedio de granos/semillas con micoflora propia del manchado y promedio de granos/semillas con crecimiento de *C. globosum*

De 200 granos/semillas tratadas con *T. harzianum*, el 74% presentó crecimiento de este hongo antagonista sobre y/o alrededor de los granos/semillas de arroz tratados. Del mismo número de granos/semillas tratadas con *C. globosum*, el 54,5% presentaron características similares a las descritas anteriormente; además las colonias de la micoflora y algunos patógenos propios del manchado del grano/semillas también lograron desarrollarse. Estos valores corresponden a 148 semillas/granos tratadas con *T. harzianum* y 109 granos/semillas para el tratamiento antifúngico con *C. globosum*.

Las medias de los granos/semillas tratadas con *Trichoderma harzianum* presentaron diferencias significativas frente al tratamiento con *Chaetomium globosum* (Figura 21).

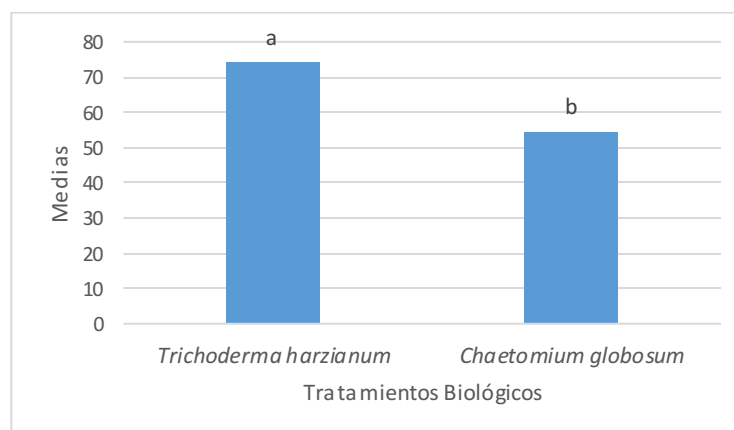


Figura 21. Valores medios del porcentaje de granos/semillas con crecimiento de *T. harzianum* y *C. globosum*. Letras distintas expresan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test de Duncan ($p < 0,05$).

4.3.3.3 Extracto de ajo natural a la concentración del 13% a 8 horas, 12 horas y 24 horas.

En la Figura 22 se observan los valores promedio de cada una de las 4 repeticiones para el extracto de ajo al 13% 8 h. Para la repetición 1 se encontró la misma cantidad de semillas con crecimiento de hongos que las que no presentaron dicho crecimiento. Las repeticiones 2, 3 presentaron valores promedio por debajo del 50% para el control del crecimiento de la micoflora de los granos/semillas, con valores 43,6% y 47,9%, respectivamente. La repetición 4 controló el desarrollo de la micoflora de los granos/semillas con un 56,1%.

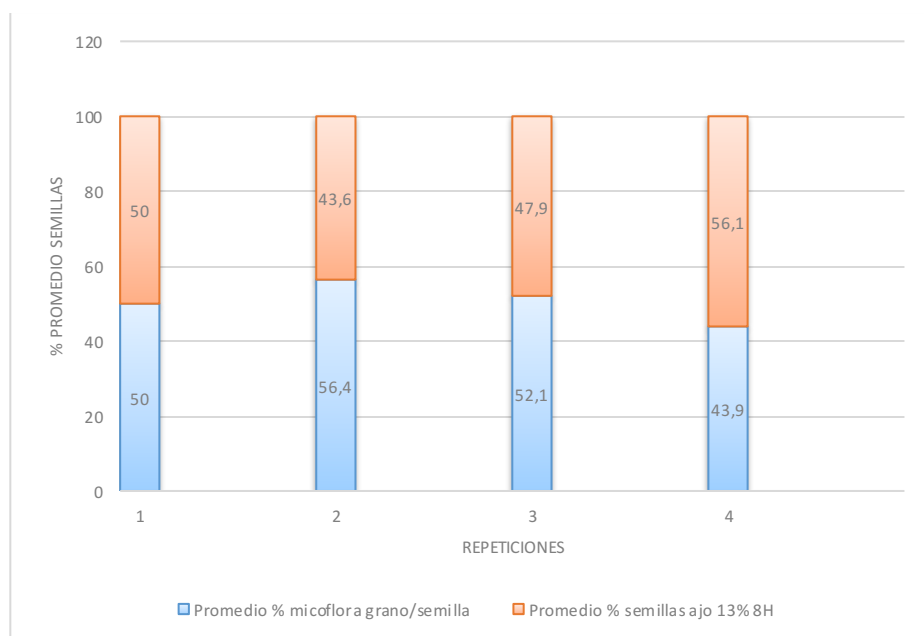


Figura 22. Promedio de granos/semillas tratadas con extracto de ajo natural al 13% (8 horas)

En la Figura 23 se observan los valores promedio de cada una de las 4 repeticiones para el extracto de ajo al 13% 12 h. Las repeticiones 1, 2 y 4 presentaron valores promedio del 57,7%, 56% y 53,7% de granos/semillas sin crecimiento de micoflora propia del manchado. La repetición 3 presentó un promedio mayor de semillas con crecimiento de la micoflora de los granos/semillas con un 52,2%.

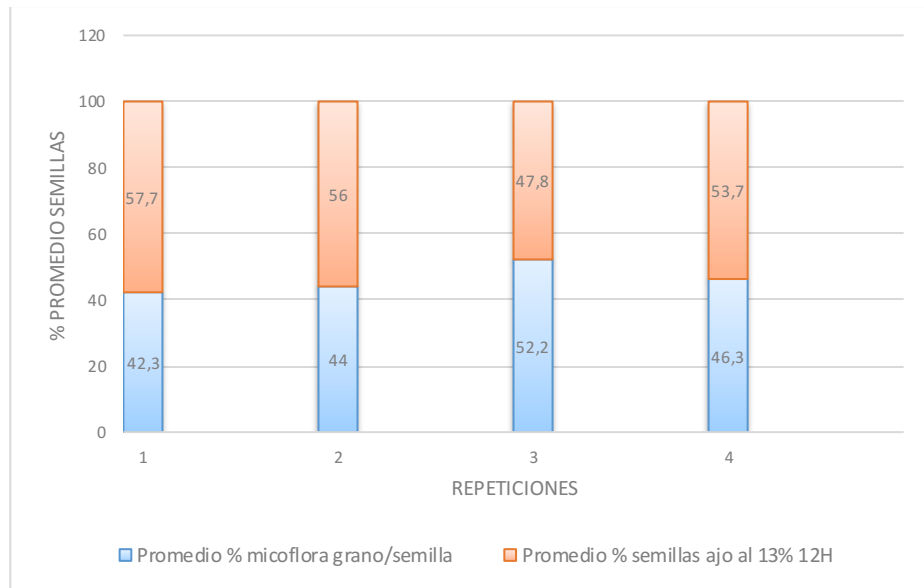


Figura 23. Promedio de granos/semillas tratadas con extracto de ajo natural al 13% (12 horas)

En la Figura 24 se observan los valores promedio de cada una de las 4 repeticiones para el extracto de ajo al 13% 24 h. Las repeticiones 2, 3 y 4 presentaron valores promedio de 53,8%, 64% y 72% de granos/semillas sin crecimiento de micoflora propia del manchado. La repetición 1 presentó un promedio mayor de semillas con crecimiento de la micoflora de los granos/semillas con un 51,7%.

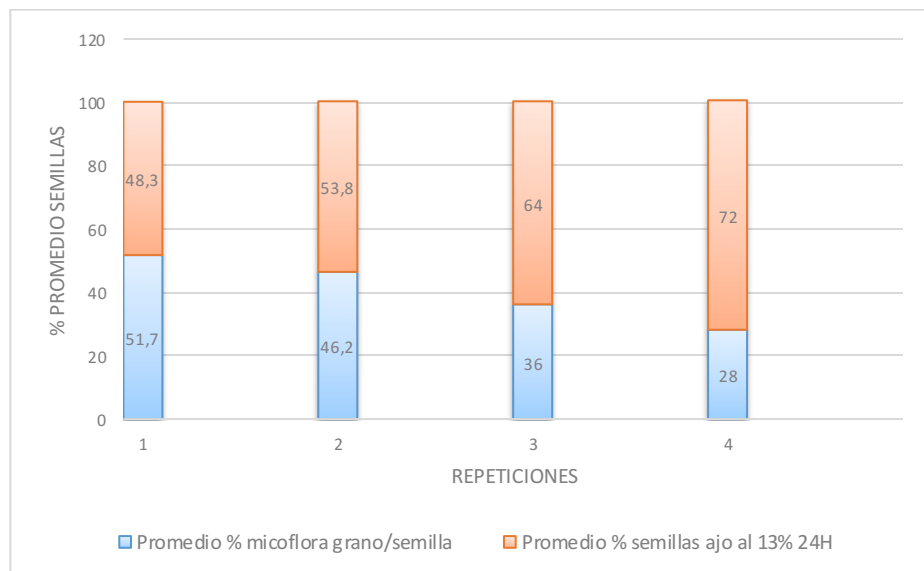


Figura 24. Promedio de granos/semillas tratadas con extracto de ajo natural al 13% (24 horas)

De un total de 200 granos/semillas tratadas con extracto de ajo al 13%, expuestas durante 8, 12 y 24 horas, el 49,4%, 53,77% y el 59,7%, respectivamente no presentó crecimiento de la micoflora propia del manchado del grano.

4.3.3.4 Fungicida Rovral

En la Figura 25 se observan los valores promedio de cada una de las 4 repeticiones para el tratamiento con fungicida. Las repeticiones 1, 2, 3 y 4 presentaron valores promedio de 74,2%, 66,5%, 71,8% y 61,4% de granos/semillas sin crecimiento de micoflora propia del manchado.

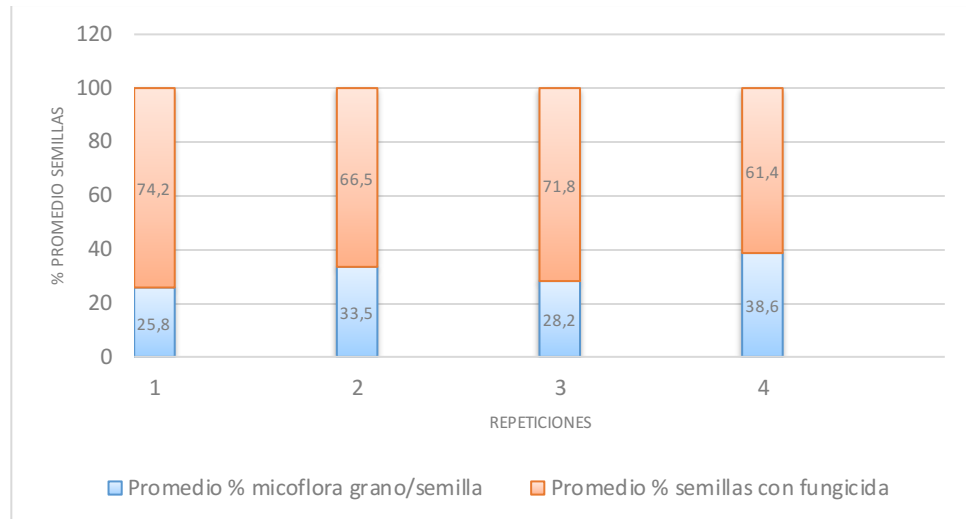


Figura 25. Promedio de granos/semillas tratadas con fungicida Rovral

En la Figura 26 se observan los valores medios del porcentaje de granos/semillas tratadas con extracto de ajo natural al 13% (8 h, 12 h y 24 h de exposición) y el fungicida. Los granos/semillas tratadas con extracto de ajo al 13% (24 horas de exposición) no presentaron diferencias significativas con el tratamiento del fungicida con valores de 59,7% y 68,5% respectivamente. Los tratamientos con extracto de ajo al 13% con 8 y 12 horas de exposición no presentaron diferencias significativas entre sí, con valores de 48,4% y 53,77%.

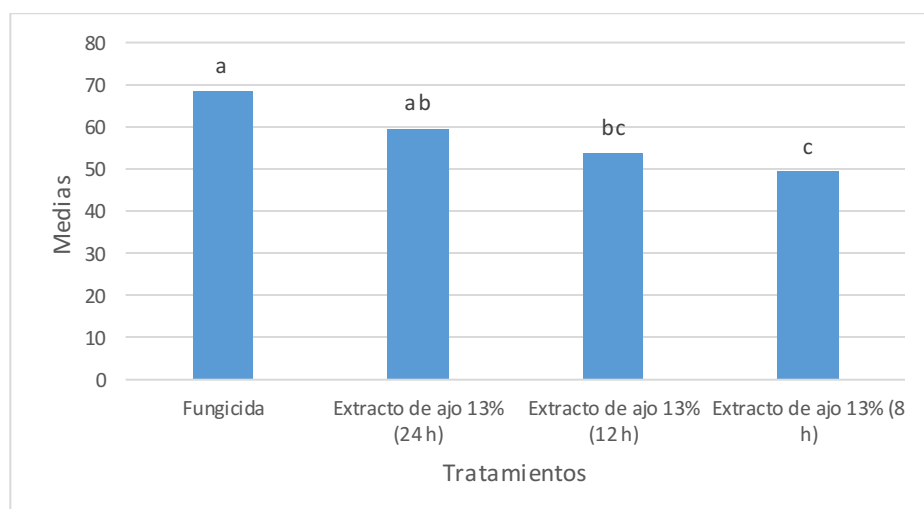


Figura 26. Valores medios del porcentaje de granos/semillas tratadas con fungicida y extracto de ajo natural al 13% (8, 12 y 24 horas). Letras distintas expresan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test de Duncan ($p < 0,05$).

En la Figura 27 se muestran los granos/semillas en las cajas de Petri con los diferentes tratamientos, se logró identificar mediante observaciones microscópicas la presencia de algunos de los géneros fúngicos como: *Alternaria* spp., *Curvularia* spp., *Nigrospora* spp., *Stemphylium* spp. *Phoma* spp. y algunas especies que no fueron identificadas.

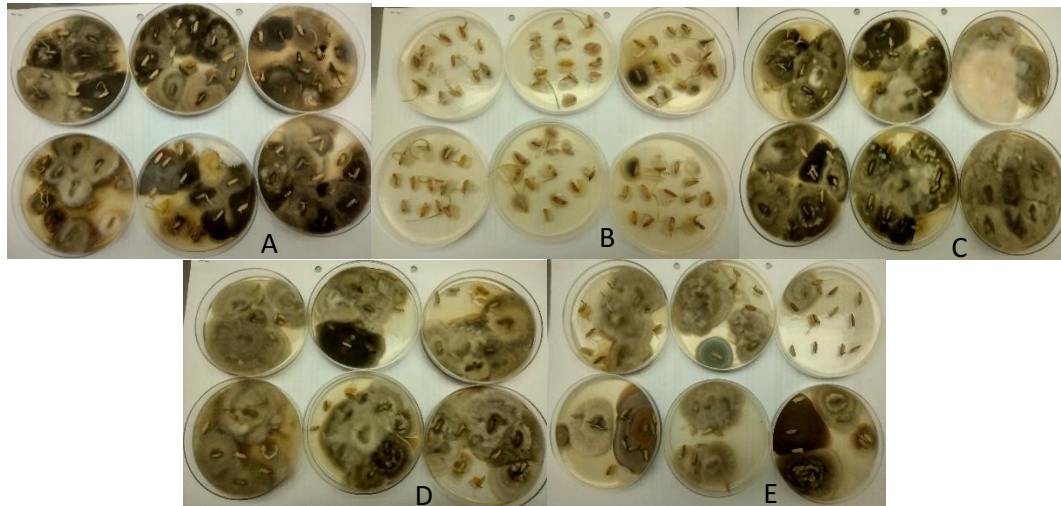


Figura 27: Tratamiento testigo (A); tratamiento con fungicida (B); tratamiento con extracto de ajo al 13% 8 h (C); tratamiento con extracto de ajo al 13% 12 h (D); tratamiento con extracto de ajo al 13% 24 h (E).

4.4 Discusión

Tradicionalmente, para prevenir y controlar la invasión de los hongos fitopatógenos en la agricultura se han utilizado fungicidas sintéticos, sin embargo, estos fungicidas causan efectos adversos al ambiente y a la salud humana. Por lo que es necesario la búsqueda de alternativas amigables con el ambiente para el control de hongos fitopatógenos (Muy-Rangel *et al.*, 2017). Las sustancias no químicas, como los extractos de plantas, pueden usarse con éxito como fungicidas de contacto para el tratamiento de semillas. Como una rica fuente de productos bioactivos, las plantas pueden proporcionar alternativas potenciales para ser utilizadas como agentes de control de patógenos (Dal Bello & Sisterna, 2010).

Para los tratamientos con extracto de ajo, el formulado de tipo comercial inhibió totalmente el crecimiento micelial de *B. oryzae* y *F. graminearum* a las concentraciones de 33,3% y 23,07%, respectivamente; este mismo producto fue probado en ensayos *in vitro* para 3 patógenos aislados de trigo, entre ellos *F. graminearum*, el cual fue inhibido totalmente a una concentración 33,3% (Baeck, 2020). Otros estudios realizados en especies de *Fusarium* sp., como *F. moniliforme* encontraron que el extracto de ajo redujo

en un 100% el crecimiento miceliar con un 20% de concentración (Marcondes *et al.*, 2014), resultados similares a los obtenidos para el extracto de ajo comercial frente a nuestra cepa de *F. graminearum* aislada de granos/semillas de arroz.

Alkhail (2005) probó extractos acuosos, por arrastre de vapor y etanólicos de ajo (*Allium sativum*) contra *Fusarium oxysporum*, donde el extracto acuoso de ajo fue el mejor con casi 95% de actividad fungicida, en nuestro caso el extracto de ajo natural inhibió el crecimiento miceliar de *Fusarium graminearum* con valores por encima del 94% a una concentración del 10%. En Vieira *et al.* (2011) encontraron que todas las concentraciones del extracto acuoso de ajo utilizadas (10%, 15%, 20% y 25%) fueron eficaces en la inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium sp.* y *Curvularia sp.* además observaron que cuanto mayor es la concentración del extracto de ajo, mayor es su potencial para reducir el crecimiento micelial en ambos hongos; resultados análogos a los encontrados en nuestro estudio, tanto para el extracto de ajo comercial como para el extracto de ajo natural, los cuales disminuyeron el crecimiento micelial de los patógenos tratados, mostrando la potencialidad de este derivado botánico.

El crecimiento micelial de nuestra cepa de *Curvularia lunata* fue inhibida un 94% a una concentración de extracto de ajo natural del 12%, sin embargo, en Suresh Rao *et al.* (2021) probaron 6 extractos de plantas, entre ellos evaluaron el extracto de ajo a 4 concentraciones muy bajas (2%, 3%, 4% y 5%), las cuales mostraron una inhibición completa del crecimiento micelial de dicho hongo patógeno, resultados prometedores para continuar con el estudio de este extracto.

Latif *et al.* (2006) encontró que entre los extractos de plantas utilizados (ajo, cebolla, neem y jengibre), las diferentes preparaciones (1:0, 1:1 y 1:2) del extracto de ajo fueron más efectivas en la eliminación de hongos transmitidos por semillas, demostrando que la incidencia de infección fúngica se redujo entre un 57 a 72%, que fue comparable con el fungicida químico Rovral. Estos resultados fueron similares a los obtenidos en este estudio donde el extracto de ajo al 13% (con 24 horas de exposición) redujo un 59,7% el crecimiento de la micoflora y patógenos propios del manchado del grano/semilla de arroz, valor que no presentó diferencias significativas con el fungicida Rovral (68,5%).

El extracto de ajo ha sido utilizado para la inhibición de otros hongos, Hassan *et al.* (2005) encontraron que los extractos de ajo (alcohólico y acuoso) inhibieron por completo la presencia de *B. sorokiniana*, *Fusarium* sp. *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. y *Rhizopus* sp. en el tratamiento de semillas de trigo. Estos estudios indican el potencial de los derivados botánicos sobre el control de hongos fitopatógenos, especialmente el uso del extracto de ajo que con resultados prometedores podría ser utilizado especialmente por pequeños agricultores que no cuenten con grandes recursos económicos y estén en la continua búsqueda de alternativas para una agricultura sostenible.

En cuanto al efecto de los tratamientos biológicos (*Trichoderma harzianum* y *Chaetomium globosum*) sobre la micoflora del grano/semilla de arroz se observó entre un 50-70% de colonización por parte de los antagonistas. En Costa-Carvalho *et al.* (2011) se probaron varias cepas de *Trichoderma harzianum* que redujeron la incidencia de especies de *Aspergillus* spp.(entre un 56% y 61%), *Cladosporium* spp (entre un 40% y 41%) y *Sclerotinia sclerotiorum* (entre un 90% y 92%) en semillas de frijol. Cepas de *Chaetomium globosum* fueron utilizadas para tratar semillas de cebada infectadas naturalmente con *Bipolaris sorokiniana*, disminuyendo el porcentaje de infección entre un 45% y 52,5% (Cipollone y Sisterna, 2019), estos datos permiten darle continuidad al desarrollo de estudios y posterior uso de *Trichoderma harzianum* y *Chaetomium globosum* en el tratamiento de semillas.

Cabe resaltar que los estudios referentes al uso y efectos de agentes biológicos como biofungicidas sobre la micoflora presente en las semillas son escasos.

BIBLIOGRAFÍA

- Alkhail, A.A. (2005). Antifungal activity of some extracts against some plant pathogenic fungi. Pak. J. Biol. Sci. 8(3):413-417.
- Baeck C. (2020). Efecto antagónico del hongo *Epicoccum nigrum* y del extracto de ajo frente a la micoflora del grano de trigo candeal asociada al manchado. Su potencial empleo como biofungicidas. Tesina de grado. Universidad Nacional de La Plata.
- Bender, D. y Bárcenas, ME (2013) El ajo y sus aplicaciones en la conservación de alimentos. Temas selectos de Ingeniería de Alimentos. 7: 25-36.
- Cipollone, M.J. y Sisterna, M. (2019). Efecto *in vitro* del tratamiento con cepas de *Chaetomium globosum* en semillas de cebada naturalmente infectadas con *Bipolaris sorokiniana*. Primer Congreso Argentino de Semillas.
- Costa-Carvalho, D.D., Marques-de Mello, S.C., Murillo-Lobo, J. and Alaerson, M.G. (2011). Biocontrol of seed pathogens and growth promotion of common vean seedlings by *Trichoderma harzianum*. Pesq. Agropec. Bras. 46(8):822-828.
- Dal Bello, G., & Sisterna, M. (2010) Use of plant extracts as natural fungicides in the management of seed borne diseases. p. 51-66. En: "Management of fungal plant pathogens" CABI International. Ed. Arun Arya, A. Perelló. 388 pp. ISBN-13: 978 1 84593 603 7
- Harris, JC., Cottrell, SL. Plummer, S. y Lloyd, D (2001). Antimicrobial properties of *Allium sativum* (garlic). Applied Microbiology and Biotechnology. 57:282-286.
- Hassan, M.M, Chowdhury, S.P., Alam, S., Hossain, B. and Alam, M.S. (2005). Antifungal effects of plant extracts on seed-borne fungi of wheat and vigor index. Pakistan Journal of Biological Science. 8(9):1284-1289.
- Latif, M.A., Saleh, A.K.M., Khan, M.A.I. Rahman, H. and Hossan, M.A. (2006). Efficacy of some plant extract in controlling seed-borne fungal infections of mustard. Bangladesh journal of Microbiology. 23:168-170.
- Ledezma, E. y Apitz-Castro, R. (2006). Ajoene, el principal compuesto activo derivado del ajo (*Allium sativum*), un nuevo agente antifúngico. Rev. Iberoam. Micol. 23:75-80.
- Marcondes, M.M, Martins-Marcondes, M. Baldin, I. Maia, A.J., Leite, C.D y Faria, C.M.D.R. (2014). Influencia de diferentes extratos acuosos de plantas medicinais no desenvolvimento de *Colletotrichum gloeosporioides* e de *Fusarium moniliforme*. Rev. Bras. PI. Med., v.16, n.4, p. 896-904.

- Michereff, S.J, Silveira, N.S.S., Reis, A., & Mariano, R.L.R. (1994) Epiphytic bacteria antagonistic to *Curvularia* leaf spot of Yam. *Microbial Ecology*, 28, 101-110.
- Molina-Vargas, L. F. y Melo-Martínez, S.E. (2010). Importancia del método estadístico para el cálculo de la CE₅₀ y CE₉₅ de algunos isotiocianatos evaluados contra *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Agronomía Colombiana*. 28(2):235-244.
- Muy-Rangel, MD, Osuna-Valle, JR, García-Estrada, RS, Martín-Hernández, CS y Quintana-Obregón, EA. (2017) Actividad antifúngica in vitro del aceite esencial de ajo (*Allium sativum* L.) contra *Alternaria tenuissima*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 36(1):162-171. DOI: 10.18781/R.MEX.FIT.1708-3
- Rahman, M.S. (2007). Allium and other functional active components in garlic: health benefits and bioavailability. *International Journal of Food Properties*. 10(2):245-268.
- Suresh Rao, S., Reddi kumar, M. Madhusudhan, P. and Bavindra Reddy, B. (2021). Comparative efficacy of different plant extracts on mycelial growth of *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn causing rice grain discoloration *in vitro*. *The pharma innovation Journal*. 10(5):1151-1155.
- Vieira, C.G., Moreira, R.M., Viéga, P.V.D.S., Santos, G.A.L. y Muza, D.N. (2011) Efeito inibitório in vitro de extrato vegetal de *allium sativum* sobre *Fusarium* sp. e *Curvularia* sp. XX congresso de iniciacao científica. III mostra científica UFPEL. Brazil.

CAPITULO V

EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL
EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS
CON *T. harzianum*, *C. globosum* y EL
EXTRACTO DE AJO NATURAL
SOBRE LA GERMINACIÓN Y EL
VIGOR DEL GRANO/SEMILLA DE
ARROZ

5.1 Introducción

La semilla es el principal órgano reproductivo de la gran mayoría de plantas, desempeñan una función fundamental en la renovación, persistencia y dispersión de las poblaciones de plantas. Para que la semilla cumpla con su objetivo, es necesario que el embrión se transforme en plántula, que sea capaz de valerse por sí misma y finalmente convertirse en planta adulta. La viabilidad de las semillas es el periodo de tiempo durante el cual las semillas conservan su capacidad de germinar, es un periodo variable y depende del tipo de semilla y las condiciones de almacenamiento (Doria, 2010).

La calidad fisiológica es generalmente evaluada por la prueba de germinación que le confiere a las semillas condiciones favorables de humedad y temperatura, permitiendo expresar el potencial máximo de un lote en producir plántulas normales. Sin embargo, esta prueba puede ser poco eficiente para indicar el desempeño de las semillas en campo, donde las condiciones no siempre son las ideales. El vigor de las semillas puede ser entendido como la suma de atributos que confiere a la semilla el potencial para germinar, emerger y establecer rápidamente una población adecuada de plántulas normales bajo una amplia diversidad de condiciones ambientales (Intriago-Paredes, 2011).

Las enfermedades más importantes y devastadoras de los cultivos a menudo se transmiten por semillas y son causadas por hongos. Además se ha demostrado que los hongos transmitidos por semillas son responsables de la mala calidad de las mismas en muchos cultivos. Los patógenos que se transportan a través de semillas o dentro de ellas, pueden reducir su germinación y la emergencia de las plántulas. Generalmente estos hongos se manejan con productos químicos sintéticos que se consideran eficientes pero su uso continuo ha generado una toxicidad residual que causa contaminación (Perelló *et al.*, 2013).

Con frecuencia se ha documentado la actividad antifúngica de muchos productos derivados de plantas contra una amplia gama de fitopatógenos. Entre las sustancias vegetales que se utilizan generalmente contra la micoflora transmitida por semillas, el ajo es muy prometedor teniendo en cuenta su importante actividad antifúngica y propiedades antimicrobianas (Perelló *et al.*, 2013).

5.1.1 Objetivo

El objetivo planteado en el presente capítulo fue:

- Evaluar el efecto de los distintos tratamientos sobre la germinación y vigor de la semilla.

5.2 Materiales y métodos

5.2.1 Germinación y vigor de la semilla

Se empleó la prueba en toallas de papel enrolladas (ISTA, 2011). Se evaluaron un total de 100 granos/semillas por tratamiento (4 repeticiones). Los granos/semillas de arroz se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% durante 5 minutos y se sumergieron en las preparaciones de los diferentes tratamientos:

- Tratamientos biológicos (*Trichoderma harzianum*, *Chaetomium globosum*) más un control con agua destilada estéril. Para el tratamiento con *T. harzianum* (T2) se usó una concentración de 10^{-8} y para el tratamiento con *C. globosum* (C4) una concentración de 10^{-6} .
- Tratamientos con extracto de ajo: ajo al 13% durante 8 h, 12 h y 24 h y al 20%, 30% y 40% durante 12 h y 24 h de exposición, más un control con agua destilada estéril.

Una vez oreados los granos/semillas de arroz pertenecientes a la variedad Yeruá de la localidad de Los Hornos (Provincia de Buenos Aires), se sembraron sobre hojas de toalla papel (Valot Premium blancas) que previamente se sumergieron en una bandeja de agua destilada y se escurrieron sobre una rejilla metálica donde posteriormente se realizó la siembra. Se comenzó a sembrar desde la mitad superior de la toalla de papel de forma que la radícula quedara hacia abajo cubriéndose los granos con la otra mitad de la toalla, formando luego un rollo. Estos rollos se colocaron dentro de bolsas de nylon que se cerraron en la parte superior y se sujetaron con clips. Se ubicaron en forma vertical en envases de plástico, incubándose en cámara a 30°C con alternancia de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad (Figura 1).



Figura 1. Granos/semillas de arroz enrollados en toalla de papel.

La evaluación se realizó de la siguiente forma:

- El porcentaje de germinación final (PGF) según Abdoli y Esfandiari (2017):

$$PGF = \left(\frac{Ng}{Nt} \right) * 100$$

Ng: Número total de granos/semillas germinadas

Nt: Total número de granos/semillas evaluadas

- El índice de Vigor de la Plántula (IV) se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula Abdoli y Esfandiari (2017):

$$IV = \frac{\text{Longitud de la plántula} * PGF}{100}$$

- El vigor de las plántulas se determinó a partir de la fórmula de Geetha y Sivaprakasam (1993):

IVP= % de germinación x longitud de plúmula (promedio de 10 plántulas en cm)

IVR= % de germinación x longitud de radícula (promedio de 10 plántulas en cm)

Se contabilizaron el número de semillas sin germinar (SSG) y se calculó la longitud de la plántula (LP) (plúmula+radícula) por tratamiento; El número de SSG no se tuvieron en cuenta para los cálculos estadísticos. Con los datos obtenidos se realizó un ANOVA una vía, las medias se compararon por el Test de Duncan ($p \leq 0,05$) En todos los casos se utilizó la versión libre de InfoStat estudiantil, año 2017 (InfoStat-Statistical Software).

5.3 Resultados

5.3.1 Tratamientos biológicos

5.3.1.1 Porcentaje de germinación final (PGF)

El porcentaje de germinación final para los tratamientos biológicos y el testigo se muestra en la Figura 2. *Chaetomium globosum* (cepa C4) obtuvo un valor de 97% y *Trichoderma harzianum* (cepa T2) un 95%, valores que estadísticamente no presentaron diferencias significativas entre sí, pero se diferenciaron del testigo, que obtuvo un valor de 80%.

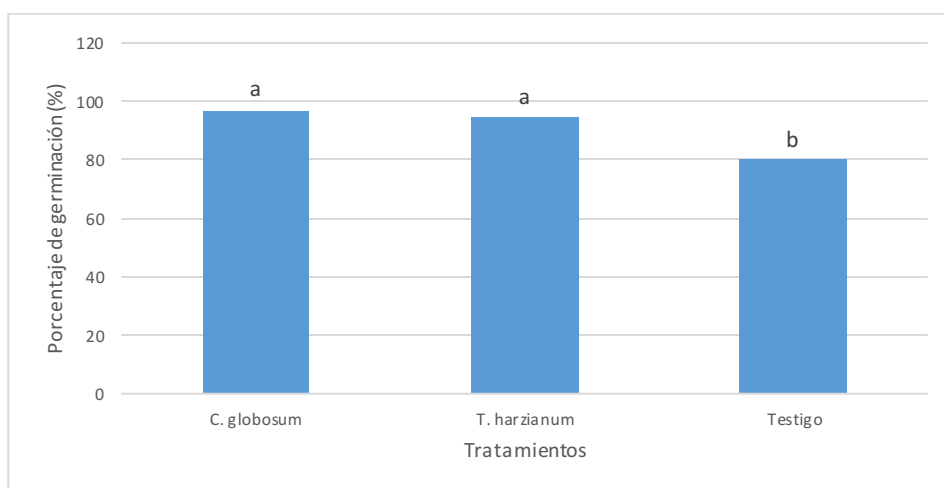


Figura 2. Porcentaje de germinación de los tratamientos biológicos (*T. harzianum*, *C. globosum*) y el testigo. Letras diferentes representan diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0,05$).

5.3.1.2 Índice de Vigor de la Plántula (IV)

Los valores del índice de vigor (IV) para los tratamientos biológicos y el testigo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Índice de vigor de la plántula para los tratamientos biológicos (*T. harzianum* y *C. globosum*) y el testigo

Tratamientos	Índice de Vigor de la plántula (IV)
<i>T. harzianum</i>	10,37a
Testigo	9,26b
<i>C. globosum</i>	9,17b

Letras distintas expresan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test de Duncan ($p < 0,05$).

El tratamiento con *T. harzianum* (cepa T2) se diferenció estadísticamente del tratamiento con *C. globosum* (cepa C4) y del testigo. Por su parte, *C. globosum* no presentó diferencias significativas con respecto al testigo con valores de 9,26 y 9,17 respectivamente (Tabla 1).

En la Figura 3 se muestran la relación entre índice de vigor y el porcentaje de germinación para los tratamientos biológicos. El tratamiento con *T. harzianum* presentó el mejor comportamiento para el índice de vigor (IV) y el porcentaje de germinación final (PGF) con respecto a *C. globosum* y el testigo.

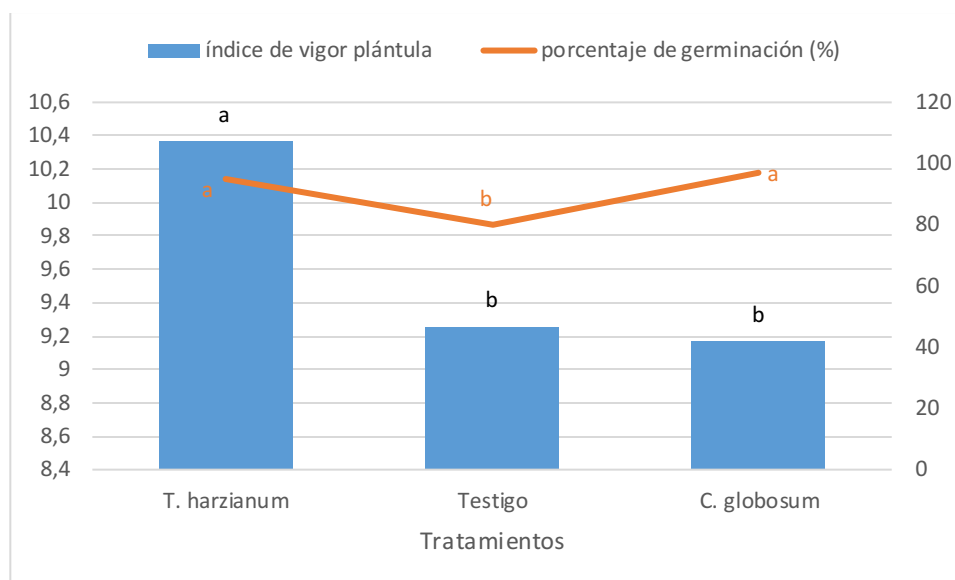


Figura 3. Índice de vigor y porcentaje de germinación para los tratamientos biológicos (*T. harzianum*, *C. globosum*) y el testigo. Letras distintas expresan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test de Duncan ($p < 0,05$).

En la Figura 4 se observan semillas germinadas con la prueba de toalla de papel enrolladas, se pudo evidenciar el crecimiento de la micoflora sobre el grano/semilla de arroz y en las semillas tratadas con *T. harzianum*, el crecimiento de este hongo antagonista sobre el grano/semilla germinado.



Figura 4: Crecimiento de micelio de la micoflora sobre el grano/semilla en toalla de papel (A); crecimiento de *T. harzianum* sobre el grano/semilla (B).

5.3.1.3 Índice de vigor basado en el porcentaje de germinación y la longitud de la plúmula (IVP) y basado en el porcentaje de germinación y la longitud de la radícula (IVR)

Para el tratamiento con *T. harzianum* (cepa T2) el índice de vigor basado en el porcentaje de germinación y la longitud de la plúmula (IVP) presento un valor de 555,8 que se diferenció del testigo y de *C. globosum* (cepa C4) por valores de 389.6 y 415,2 respectivamente. El índice de vigor basado en el porcentaje de germinación y la longitud de la radícula (IVR) mostró que el tratamiento con *T. harzianum* no presentó diferencias significativas frente al tratamiento con *C. globosum*, pero si se diferenció estadísticamente del testigo y a su vez, el tratamiento con *C. globosum* no se diferenció del testigo. Los valores en orden descendente fueron 632.7, 482.1 y 394.4, para el tratamiento con *T. harzianum*, *C. globosum* y el testigo, respectivamente (Figura 5).

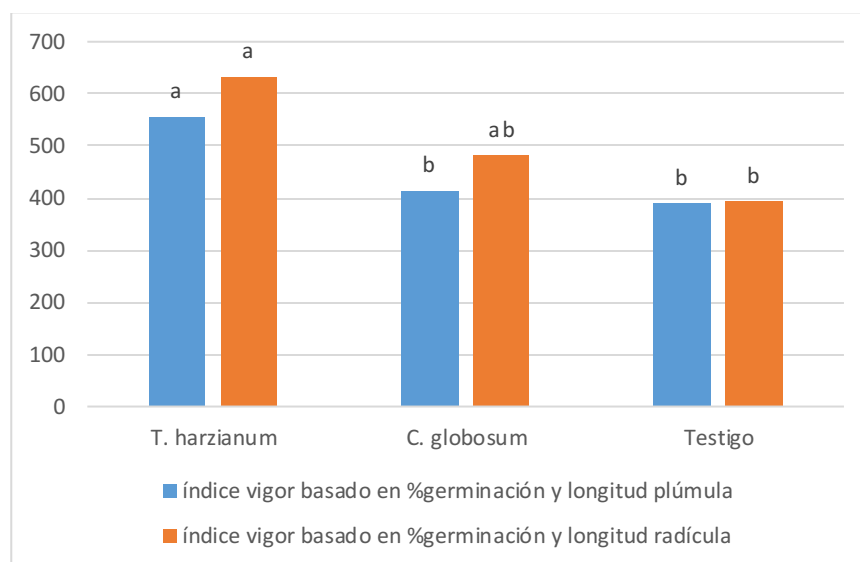


Figura 5. Índices de vigor basados en el porcentaje de germinación y la longitud de la plúmula (IVP) y la longitud de la radícula (IVR) para los tratamientos biológicos (*T. harzianum*, *C. globosum*) y el testigo. Letras distintas expresan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test de Duncan ($p < 0,05$).

El número de semillas sin germinar (SSG) no se tuvo en cuenta para los cálculos estadísticos, con el fin de enfatizar el efecto que los tratamientos biológicos y el extracto de ajo proporcionaron a los granos/semillas de arroz, y descartar los factores internos y externos que afectan la germinación.

En la Tabla 2 se muestran los datos para el número de semillas sin germinar (SSG), la longitud de la plántula (LP). En cuanto a los tratamientos biológicos se pudo observar un menor número de semillas que no germinaron con respecto al testigo.

Se calculó la longitud de la plántula (LP) (plúmula+radícula), el tratamiento con *T. harzianum* no se diferenció estadísticamente del testigo con valores de 10,9cm y 11,5cm respectivamente, sin embargo, éstos si se diferenciaron del tratamiento con *C. globosum* que obtuvo un valor de 9,45cm (Tabla 2).

Tabla 2. Datos adicionales para los tratamientos biológicos (*T. harzianum* y *C. globosum*) y el testigo.

Tratamientos	SSG	LP
<i>T. harzianum</i>	5	10,9a
<i>C. globosum</i>	3	9,5b
Testigo	20	11,5a

Letras diferentes representan diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0,05$). SSG: Semillas sin germinar; LP: Longitud de la plántula (cm).

En la Figura 6 se observan semillas germinadas con la prueba en toalla de papel enrolladas, las fotografías corresponden a los tratamientos biológicos y el tratamiento con el testigo.

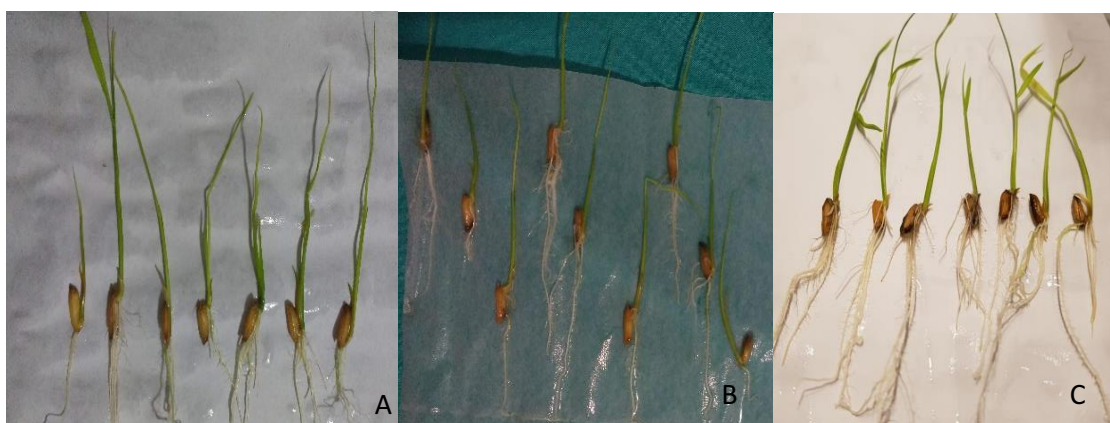


Figura 6: Semillas germinadas en toalla de papel. Tratamiento con *T. harzianum* (cepa T2) (A); tratamiento con *C. globosum* (cepa C4) (B); testigo (C).

5.3.2 Extracto de ajo natural

5.3.2.1 Porcentaje de germinación final (PGF)

El porcentaje de germinación final para los tratamientos con extractos de ajo al 13% durante 8 h, 12 h y 24 h y al 20%, 30% y 40% durante 12 h y 24 h y el testigo se muestra en el Figura 7.

En orden descendente los valores que se obtuvieron fueron: 88%, 87%, 87%, 85% 82%, 80% 80%, 78%, 77% y 75% para el extracto de ajo al 30% 24 h, extracto de ajo al 20% 12 h, extracto de ajo al 20% 24 h, extracto de ajo al 13% 24 h, extracto de ajo al 40% 24

h, el testigo, extracto de ajo al 40% 12 h, extracto de ajo al 30% 12 h, extracto de ajo 13% 8 h y extracto de ajo al 13% 12 h respectivamente.

El valor máximo para el extracto de ajo al 30% 24 h se diferenci6 estadísticamente del valor m3nimo de 75% para el extracto de ajo al 13% 12 h.

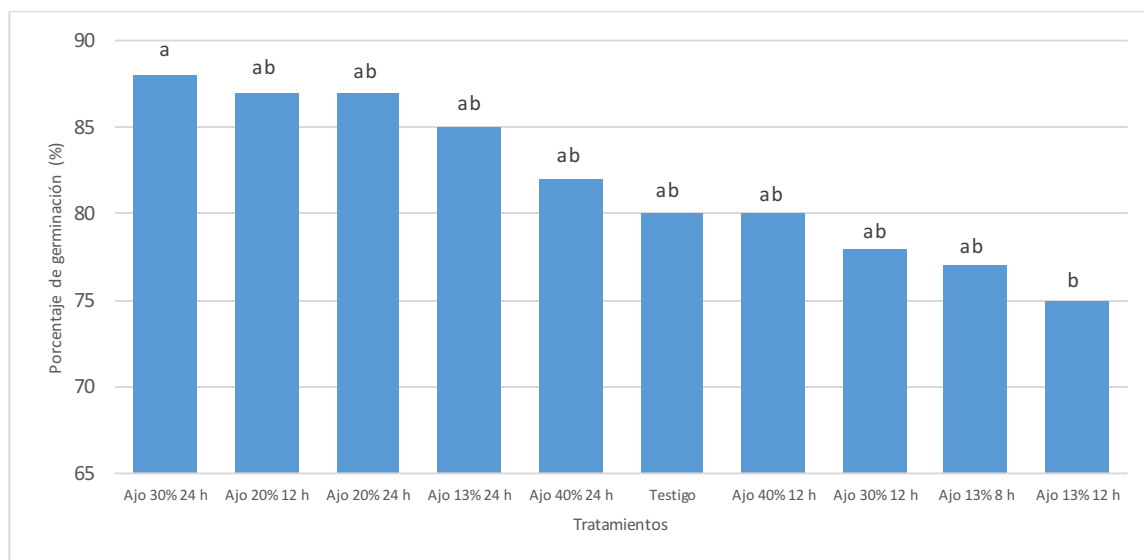


Figura 7. Porcentaje de germinaci6n de los tratamientos con extracto de ajo natural y el testigo. Letras distintas expresan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo al test de Duncan ($p < 0,05$).

5.3.2.2 Índice de Vigor de la Plántula (IV)

Los valores del índice de vigor (IV) para los tratamientos con extracto de ajo y el testigo se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Índice de vigor de la plántula para los tratamientos con extracto de ajo natural

Tratamiento	Índice de vigor de la plántula (IV)
Ajo 13% 24 h	12,1a
Ajo 13% 8 h	11,3a
Ajo 13% 12 h	11,2a
Ajo 20% 24 h	9,3b
Testigo	9,3b
Ajo 20% 12 h	9,1b
Ajo 30% 24 h	9b
Ajo 40% 12 h	7,9c
Ajo 40% 24 h	7,6c
Ajo 30% 12 h	7,1c

Letras diferentes representan diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0,05$).

Los valores de índice de vigor oscilaron entre 12,1 y 7,1 observándose máximos en extracto de ajo al 13% y mínimos en extracto de ajo al 30%-12 h y extracto de ajo al 40%. Los tratamientos con extracto de ajo al 13% y sus variantes en horas 24 h, 8 h y 12 h no se diferenciaron estadísticamente entre sí, pero si presentaron diferencias significativas con los otros tratamientos de extracto de ajo y el testigo.

En Figura 8 se muestran la relación entre índice de vigor (IV) y el porcentaje de germinación final (PGF) para los tratamientos con extracto de ajo. El tratamiento con extracto de ajo al 30% 24 h que obtuvo el valor más alto de porcentaje de germinación no presento un (IV) máximo como los encontrados con el extracto de ajo al 13% y sus variantes en horas 24 h, 8 h y 12 h. Y el valor mínimo para el porcentaje de germinación fue para el tratamiento con extracto de ajo al 13% 12 h, el cual cuando se evaluó el (IV) no presentó diferencias significativas con sus variantes en horas 24 h y 8 h a la misma concentración.

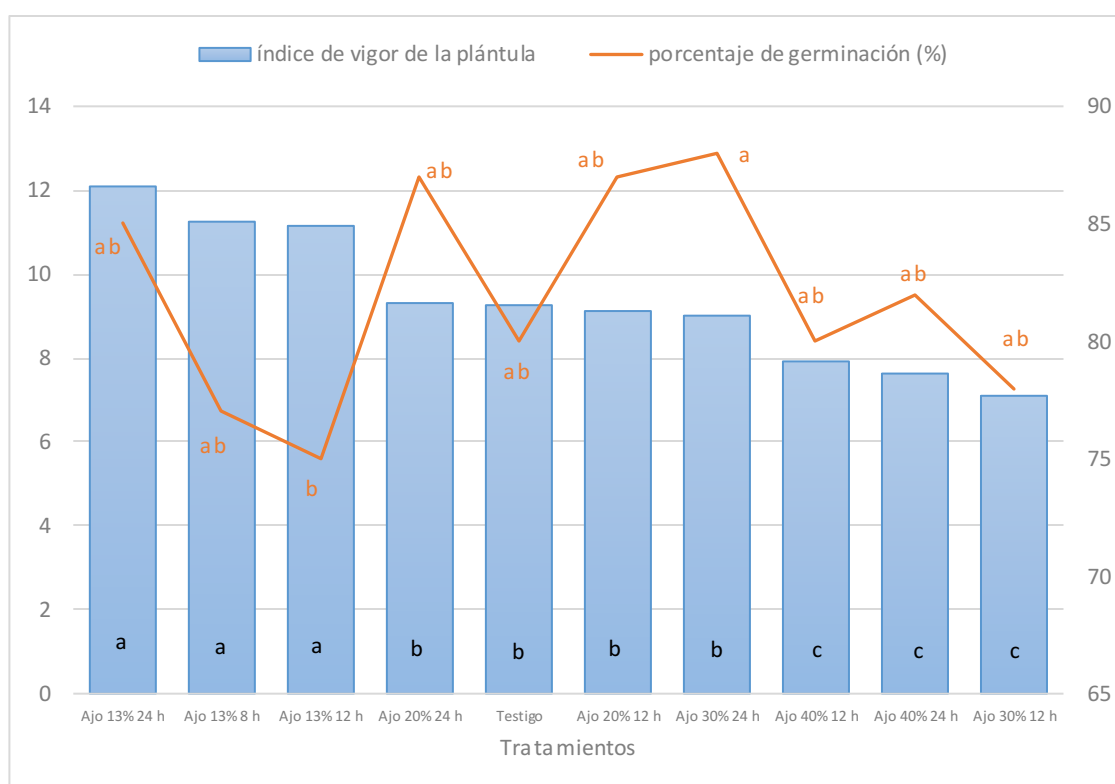


Figura 8. Índice de vigor y porcentaje de germinación para los tratamientos con extracto de ajo natural y el testigo. Letras diferentes representan diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0,05$).

5.3.2.3 Índice de vigor basado en el porcentaje de germinación y la longitud de la plúmula (IVP) y basado en el porcentaje de germinación y la longitud de la radícula (IVR)

Los valores máximos para el índice de vigor basado en el porcentaje de germinación y la longitud de la plúmula (IVP) se dieron para el tratamiento con extracto de ajo al 13%, el cual presentó valores de 579, 528,2 y 523,6 para 12 h, 8 h y 24 h respectivamente, que no se diferenciaron estadísticamente entre sí. El valor mínimo fue para el extracto de ajo al 30% 12 h con 273, el cual no se diferenció estadísticamente del extracto de ajo al 30% 24 h, el testigo, el extracto de ajo al 40% 24 h, el extracto de ajo al 40% 12 h y el extracto de ajo al 20% 12 h con valores de 393,4, 389,6, 381,3, 350,2 y 332,34, respectivamente (Figura 9).

Los valores para el índice de vigor basado en el porcentaje de germinación y la longitud de la radícula (IVR) para los tratamientos del extracto de ajo al 13% 12 h, 8 h, 24 h, el extracto de ajo al 20% 24 h, 12 h y extracto de ajo al 40% 12 h no presentaron diferencias significativas entre sí con valores de 687,8, 637,6, 624,8, 579,4, 541,1, 510,2. El valor mínimo fue para el extracto de ajo al 30% 12 h con 376, el cual no se diferenció estadísticamente de los tratamientos del extracto de ajo al 20% 12 h, extracto de ajo al 40% 12 h, extracto de ajo al 30% 24 h, el testigo y el extracto de ajo al 40% 24 h con valores de 541,1, 510,2, 494,6, 394,4 y 385,4 respectivamente (Figura 9).

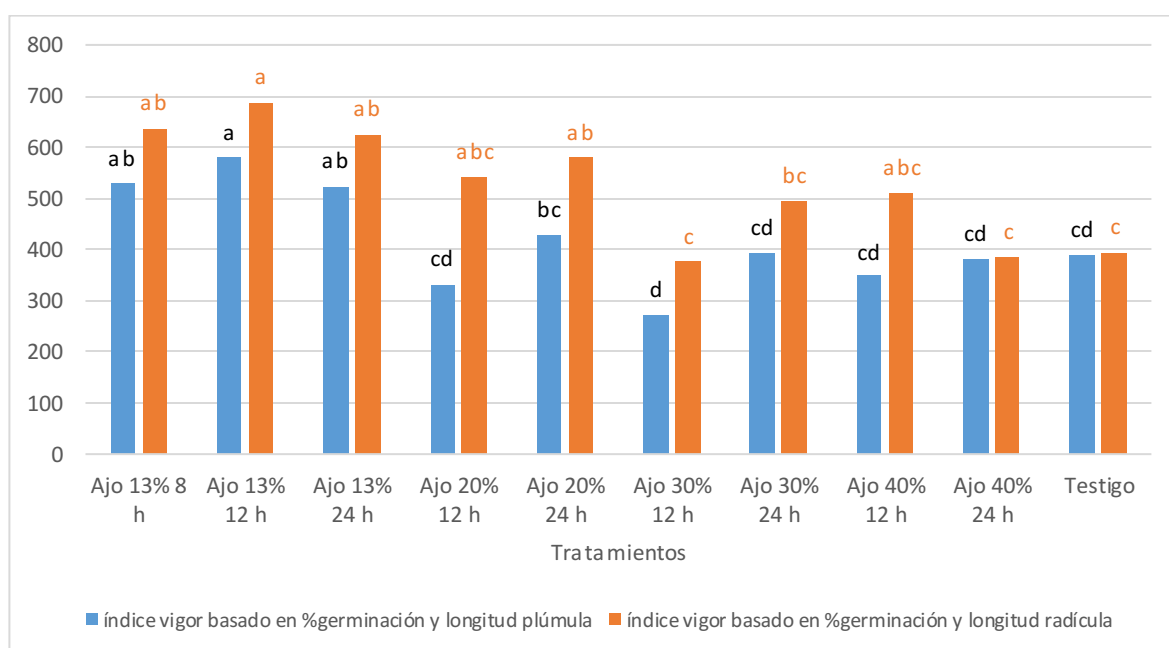


Figura 9. Índices de vigor basados en el porcentaje de germinación y la longitud de la plúmula (IVP) y la longitud de la radícula (IVR) para los tratamientos con extracto de ajo natural y el testigo. Letras diferentes representan diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0,05$).

En los tratamientos con extracto de ajo natural se contabilizó el número de semillas sin germinar (SSG) y se observó un valor máximo para el tratamiento con extracto de ajo al 13% 12 h con 25 (SSG) y un valor mínimo para el extracto de ajo al 30% 24 h con un valor de 12 (SSG) (Tabla 4).

En la Tabla 4 se calculó también la longitud de la plántula (LP) (plúmula+radícula), los tratamientos con extracto de ajo al 13% 12 h, 8 h y 24 h se diferenciaron del resto de tratamientos con valores de (LP) de 14,7cm, 14,7cm y 14,2cm respectivamente. El valor mínimo fue para el tratamiento con extracto de ajo al 30% 12 h con 9cm, el cual no se diferenció estadísticamente de los tratamientos con extracto de ajo al 30% 24 h, extracto de ajo al 40% 12 h y 24 h con valores de 10,1cm, 9,9cm y 9,2cm respectivamente.

Tabla 4. Datos adicionales para los tratamientos con extracto de ajo natural y el testigo.

Tratamientos	SSG	LP
Ajo 13% 8 h	23	14,7a
Ajo 13% 12 h	25	14,7a
Ajo 13% 24 h	15	14,2a
Ajo 20% 12 h	13	10,5bc
Ajo 20% 24 h	13	10,7bc
Ajo 30% 12 h	22	9d
Ajo 30% 24 h	12	10,1cd
Ajo 40% 12 h	20	9,9cd
Ajo 40% 24 h	18	9,2d
Testigo	20	11,5b

Letras diferentes representan diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0,05$). SSG: Semillas sin germinar; LP: Longitud de la plántula (cm).

En la Figura 10 se observan semillas germinadas con la prueba de toalla de papel enrolladas, las fotografías corresponden al tratamiento con extracto de ajo al 13% con sus variantes en horas (24 h y 12 h) y del tratamiento testigo.



Figura 10: Semillas germinadas en toalla de papel. Tratamiento con extracto de ajo al 13% 24 h (A); tratamiento con extracto de ajo al 13% 12 h (B); testigo (C).

5.3.3 Comparación de los tratamientos biológicos (*T. harzianum* y *C. globosum*) y los tratamientos con extracto de ajo natural

5.3.3.1 Porcentaje de germinación final (PGF)

El porcentaje de germinación final (PGF) varió entre 97% y 75% con máximos para los tratamientos biológicos (*C. globosum* y *T. harzianum*) y mínimo para el extracto de ajo al 13% 12 h. Los tratamientos con *C. globosum* (Cepa C4), *T. harzianum* (Cepa T2), extracto de ajo al 30% 24 h, extracto de ajo al 20% 24 h y 12 h con valores de 97%, 95%, 88%, 87%, 87% no presentaron diferencias significativas entre sí. Del mismo modo los tratamientos con extracto de ajo al 13% 24 h, extracto de ajo al 40% 24 h y 12 h, el testigo, el extracto de ajo al 30% 12 h, extracto de ajo al 13% 8 h y 12 h no presentaron diferencias significativas entre ellos con valores de 85%, 82%, 80%, 80%, 78%, 77% y 75% respectivamente (Figura 11).

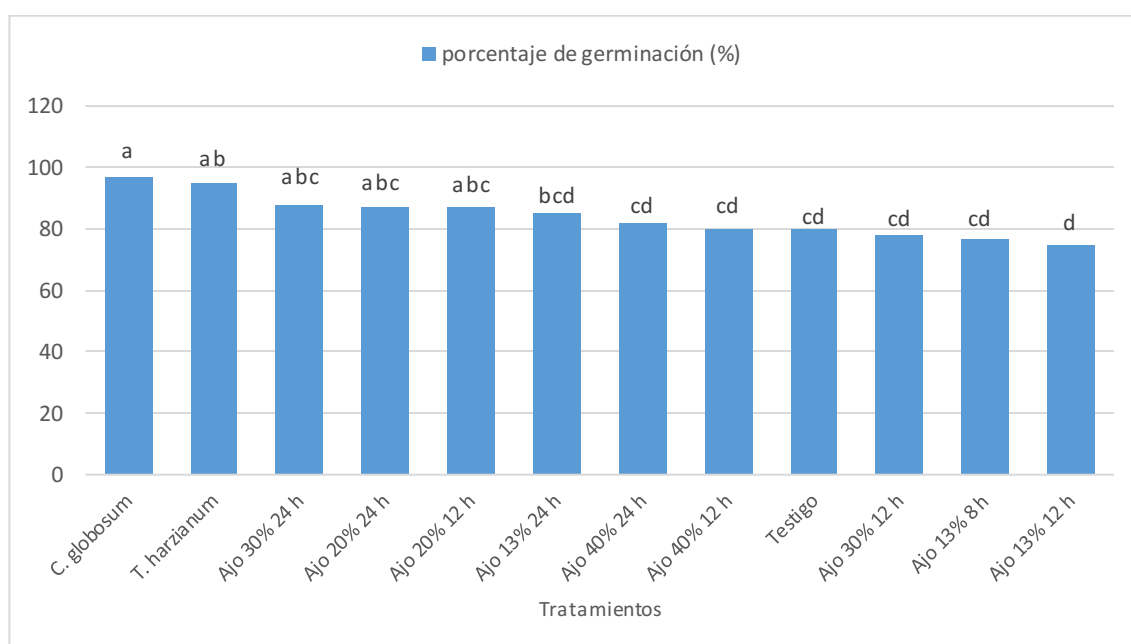


Figura 11. Porcentaje de germinación final (PGF) para los tratamientos biológicos (*T. harzianum* (cepa T2) y *C. globosum* (Cepa C4)), con extracto de ajo natural y el testigo. Letras distintas expresan diferencias estadísticamente significativas de acuerdo con el test de Duncan ($p < 0,05$).

En la Tabla 5 se muestran los valores correspondientes a la diferencia del porcentaje de germinación final (PGF) con respecto al testigo; los tratamientos biológicos que obtuvieron unos altos porcentajes de germinación presentaron una diferencia de 21,3 y 18,8 para *C. globosum* (Cepa C4) y *T. harzianum* (Cepa T2) respectivamente, con respecto al testigo.

Continuando en orden descendente se encontraron los tratamientos con extracto de ajo al 30% 24 h, extracto de ajo al 20% 24 h y 12 h, extracto de ajo al 13% 24 h, extracto de ajo al 40% 24 h con valores de diferencia de 10; 8,8; 8,8; 6,3 y 2,5, respectivamente.

El extracto de ajo al 40% 12 h no presentó diferencia en el porcentaje de germinación frente al testigo, y por debajo de esta diferencia se encontraron valores de -2,5; -3,8 y -6,3 para los tratamientos extracto de ajo al 30% 12 h, extracto de ajo al 13% 8 h y 12 h, respectivamente (Tabla 5).

Tabla 5. Diferencia en el porcentaje de germinación final (PGF) con respecto al testigo

Tratamiento	Porcentaje de germinación final (%)	Diferencia de porcentaje de germinación (%) con respecto al testigo
<i>C. globosum</i>	97	21,3
<i>T. harzianum</i>	95	18,8
Ajo 30% 24 h	88	10,0
Ajo 20% 24 h	87	8,8
Ajo 20% 12 h	87	8,8
Ajo 13% 24 h	85	6,3
Ajo 40% 24 h	82	2,5
Ajo 40% 12 h	80	0,0
Testigo	80	0,0
Ajo 30% 12 h	78	-2,5
Ajo 13% 8 h	77	-3,8
Ajo 13% 12 h	75	-6,3

5.3.3.1 Índice de Vigor de la Plántula (IV)

Los valores del índice de vigor (IV) para los tratamientos biológicos (*T. harzianum* y *C. globosum*), con extracto de ajo y el testigo se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Índice de vigor de la plántula para los tratamientos biológicos (*T. harzianum* y *C. globosum*), con extracto de ajo natural y el testigo

Tratamiento	Índice de vigor de la plántula (IV)
Ajo 13% 24 h	12,1a
Ajo 13% 8 h	11,3ab
Ajo 13% 12 h	11,2ab
<i>Trichoderma harzianum</i>	10,4b
Ajo 20% 24 h	9,3c
Testigo	9,3c
<i>Chaetomium globosum</i>	9,2c
Ajo 20% 12 h	9,1c
Ajo 30% 24 h	9c
Ajo 40% 12 h	7,9d
Ajo 40% 24 h	7,6d
Ajo 30% 12 h	7,1d

Letras diferentes representan diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0,05$).

Los valores de índice de vigor (IV) oscilaron entre 12,1 y 7,1 observándose máximos en extracto de ajo al 13% y mínimos en extracto de ajo al 30% 12 h y al 40% 24 h y 12 h. Los tratamientos con extracto de ajo al 13% y sus variantes en horas 24 h, 8 h y 12 h no se diferenciaron estadísticamente entre sí. Al igual que los valores mínimos 7,9, 7,6 y 7,1 para los tratamientos de extracto de ajo al 40% 12 h, al 40% 24 h y al 30% 12 h respectivamente, que no tuvieron diferencias significativas entre ellos.

Para los tratamientos biológicos, *T. harzianum* no se diferenció de los tratamientos con extracto de ajo al 13% 8 h y 12 h, con valores 10,4 para el hongo antagonista y 11,3 y 11,2 para los tratamientos con ajo al 13% 8 h y 12 h respectivamente. Sin embargo, el tratamiento con *T. harzianum* sí presentó diferencias significativas frente *C. globosum* y éste a su vez no presentó diferencias significativas frente al testigo, con valores de 9,2 y 9,3 respectivamente (Tabla 6).

En la Figura 12 se muestra la relación entre el índice de vigor (IV) y el porcentaje de germinación final (PGF), se puede observar cómo los tratamientos biológicos (*T. harzianum* y *C. globosum*) obtuvieron los máximos valores para el porcentaje de

germinación final, pero los valores para el índice de vigor (IV) de 10,4 para *T. harzianum* y 9,2 para *C. globosum* presentaron diferencias significativas entre sí. Los tratamientos con extracto de ajo al 13% y sus variantes en horas 24 h, 8 h y 12 h obtuvieron los máximos valores para el índice de vigor, pero el extracto de ajo al 13% 12 h presentó el mínimo porcentaje de germinación final (PGF) con un valor de 75% y este a su vez no se diferenció significativamente de los valores del porcentaje de germinación final del extracto de ajo al 13% 24 h y 8 h.

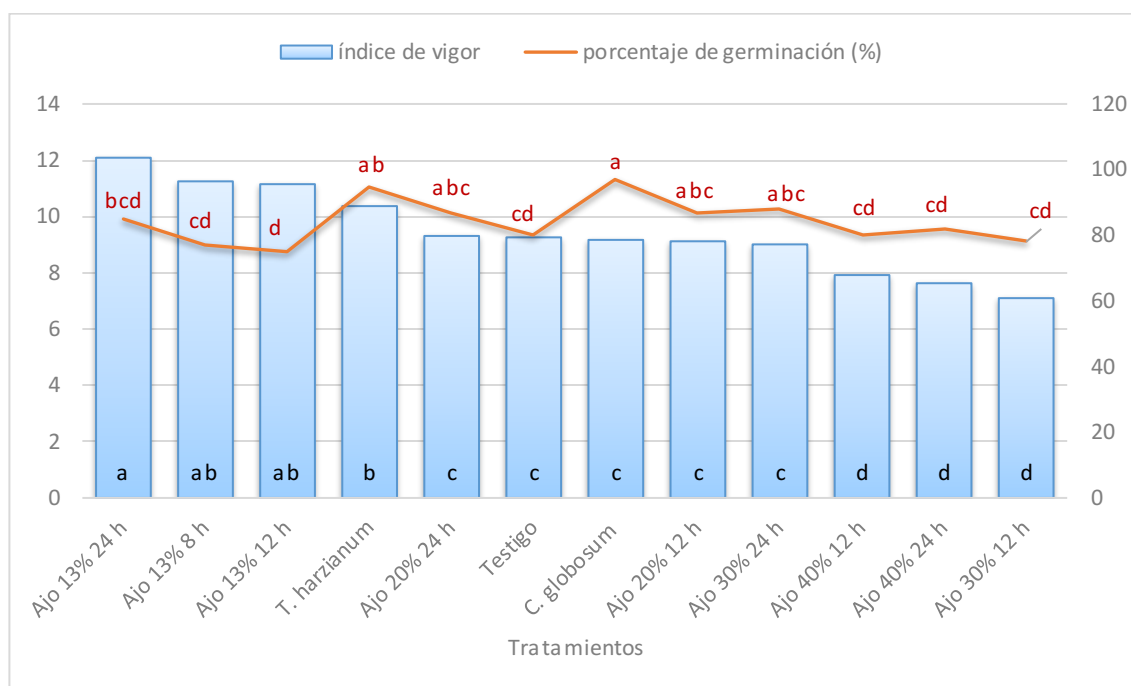


Figura 12. Índice de vigor (IV) y porcentaje de germinación final (PGF) para los tratamientos biológicos (*T. harzianum* (Cepa T2) y *C. globosum* (Cepa C4)), con extracto de ajo y el testigo. Letras diferentes representan diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0,05$).

5.3.3.3 Índice de vigor basado en el porcentaje de germinación y la longitud de la plúmula (IVP) y basado en el porcentaje de germinación y la longitud de la radícula (IVR)

Los valores máximos para el índice de vigor basado en el porcentaje de germinación y la longitud de la plúmula (IVP) se dieron para los tratamientos con extracto de ajo al 13% 12 h y para el tratamiento con *T. harzianum*, los cuales presentaron valores de 579 y 555,8 respectivamente, pero estos a su vez no se diferenciaron estadísticamente de los tratamientos con extracto de ajo al 13% 8 h y 24 h, con valores de 528,2 y 523,6, respectivamente.

El valor mínimo fue para el extracto de ajo al 30% 12 h con 273, el cual no se diferenció estadísticamente del extracto de ajo al 40% 24 h y 12 h y del extracto de ajo al 20% 12 h, con valores de 381,3, 350,2 y 332,3 respectivamente (Figura 13).

Para el índice de vigor basado en el porcentaje de germinación y la longitud de la radícula (IVR) el valor máximo fue de 687.8 y lo presentó el tratamiento con extracto de ajo al 13% 12 h, sin embargo, este valor no presentó diferencias significativas con la mayoría de los tratamientos, en orden descendente los tratamientos fueron: extracto de ajo al 13% 8 h, *T. harzianum*, extracto de ajo al 13% 24 h, extracto de ajo al 20% 24 h, 12 h, extracto de ajo al 40% 12 h y extracto de ajo al 30% 24 h con valores de 637,6, 632,7, 624,8, 579,4, 541,1, 510,2, 494,6 respectivamente.

El valor mínimo fue para el extracto de ajo al 30% 12 h con 376, el cual no se diferenció estadísticamente del extracto de ajo al 20% 12 h, extracto de ajo al 40% 12 h, extracto de ajo al 30% 24 h, *C. globosum*, el testigo y el extracto de ajo al 40% 24 h, con valores de 541,1, 510,2, 494,6, 482,1, 394,4, 385,4 respectivamente (Figura 13).

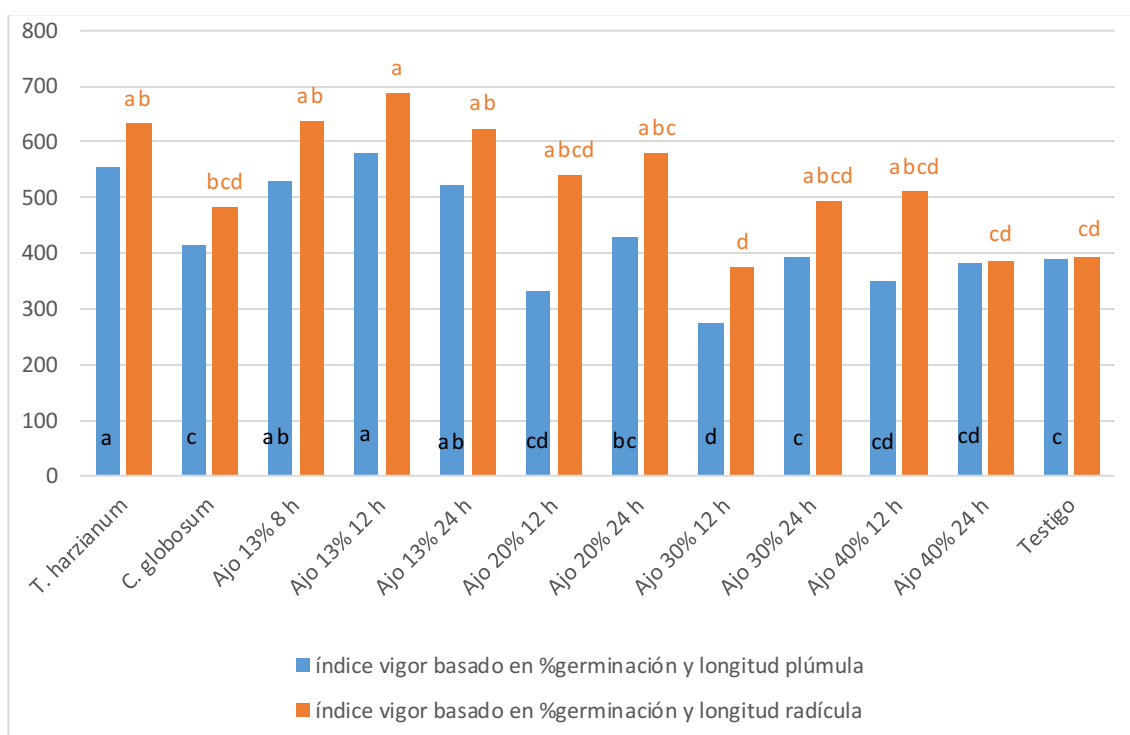


Figura 13. Índices de vigor basados en el porcentaje de germinación y la longitud de la plúmula (IVP) y la longitud de la radícula (IVR) para los tratamientos biológicos (*T. harzianum* (Cepa T2) y *C. globosum* (Cepa C4)), con extracto de ajo natural y el testigo. Letras diferentes representan diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0,05$).

En los tratamientos biológicos (*T. harzianum* y *C. globosum*) y con extracto de ajo se contabilizó el número de semillas sin germinar (SSG) y se observó un valor máximo para el tratamiento con extracto de ajo al 13% 12 h con 25 SSG y un valor mínimo para el tratamiento con *C. globosum* (Cepa C4) con un valor de 3 SSG. Se calculó también la longitud de la plántula (LP) (plúmula + radícula), los tratamientos con extracto de ajo al 13% 12 h, 8 h y 24 h se diferenciaron del resto de tratamientos con valores de LP de 14,7cm, 14,7cm y 14,2cm respectivamente. El valor mínimo fue para el tratamiento con extracto de ajo al 30% 12 h con 9cm, el cual no se diferenció estadísticamente de los tratamientos con extracto de ajo al 30% 24 h, extracto de ajo al 40% 12 h, *C. globosum*, extracto de ajo al 40% 24 h con valores de 10,1cm, 9,9cm, 9,5cm y 9,2cm respectivamente. (Tabla 7).

Los valores de la longitud de plántula (LP) para el tratamiento con *T. harzianum* (Cepa T2) no presentó diferencias significativas con respecto al testigo, pero si se diferenció estadísticamente de los tratamientos con extracto de ajo al 13% y sus variantes en horas (valores máximos) y con el tratamiento con *C. globosum* (Cepa C4) que presentó un valor cercano al mínimo.

Tabla 7. Datos adicionales para los tratamientos biológicos (*T. harzianum* y *C. globosum*), con extracto de ajo natural y el testigo.

Tratamiento	SSG	LP
<i>T. harzianum</i>	5	10,88bc
<i>C. globosum</i>	3	9,45de
Ajo 13% 8 h	23	14,66a
Ajo 13% 12 h	25	14,72a
Ajo 13% 24 h	15	14,2a
Ajo 20% 12 h	13	10,46bcd
Ajo 20% 24 h	13	10,67bc
Ajo 30% 12 h	22	9e
Ajo 30% 24 h	12	10,06cde
Ajo 40% 12 h	20	9,85cde
Ajo 40% 24 h	18	9,23e
Testigo	20	11,45b

Letras diferentes representan diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0,05$). SS: Semillas sin germinar; LP: Longitud de la plántula (cm).

En la Figura 14 se observan semillas germinadas con la prueba de toalla de papel enrolladas. La figura 14-A corresponde al tratamiento testigo, con crecimiento de la micoflora propia del manchado de grano/semilla de arroz; En la figura 14-B se compara una semilla del tratamiento testigo y una semilla tratada con extracto de ajo al 13% 12 h.

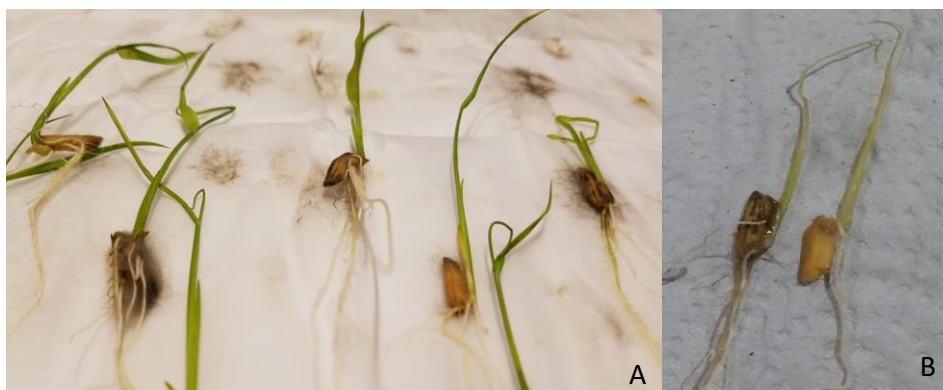


Figura 14: Semillas germinadas en toalla de papel. Testigo (A); semilla tratamiento testigo (izquierda) y semilla con tratamiento de extracto de ajo al 13% 12 h (derecha) (B).

5.4 Discusión

En el presente estudio los tratamientos biológicos evidenciaron un efecto positivo sobre la germinación de las semillas de arroz. Resultados similares se han encontrado por otros investigadores (Anhar *et al.* 2019, Gangwar, 2013). *Trichoderma harzianum* (cepa T2) mostró valores similares a los tratamientos con extracto de ajo natural al 13% y sus variantes en horas (8 h, 12 h y 24 h) para los parámetros de índice de vigor (IV) y los índices de vigor basados en el porcentaje de germinación y la longitud de la plúmula y la radícula (IVP y IVR). Gangwar (2013) y Hassan *et al.* (2017) mencionan que las formulaciones con agentes biológicos resultan eficaces para promover el crecimiento de la planta cuando se aplican como tratamiento a la semilla, siendo capaz de colonizar la superficie de la raíz y la rizosfera, protegiéndolas de enfermedades fúngicas. Además aumentaron significativamente la longitud de la raíz y la longitud de los brotes mejorando el crecimiento y el vigor de la planta. Las preparaciones con *T. harzianum* aumentaron la emergencia y el vigor de las plántulas de arroz.

Nuñez-Muñoz y Pavone-Maniscalco (2014) plantean que una de las etapas del crecimiento de arroz donde existe mayor predisposición a diferentes daños de origen biótico y abiótico es en el desarrollo inicial, por tal razón, resulta fundamental conocer si los agentes de control biológico como *Trichoderma* spp. tiene la capacidad de mejorar la condición de la planta en esta etapa del desarrollo. También mencionan que la utilización

de *Trichoderma* spp. en plantaciones de arroz podría promover un mejor desarrollo de la planta y un mayor rendimiento. Doni *et al.* (2014) mencionan que *Trichoderma* spp. mejora la germinación, el vigor y el crecimiento de las plántulas de arroz, la tasa fotosintética, la concentración interna de CO₂, el uso eficiente del agua y la absorción de nutrientes que mejorará los procesos fisiológicos, lo cual conduce a un buen rendimiento en el crecimiento.

En Cipollone y Sisterna, (2019) se evaluó el efecto de *C. globosum* en semillas de cebada naturalmente infectadas por el patógeno *B. sorokiniana* (56%). Las 3 cepas probadas del hongo endófito promovieron el crecimiento de las semillas de cebada presentando valores para el índice de vigor de 6,52; 7,31 y 12,05 frente al control que presentó un valor de 3,90. En nuestro estudio *C. globosum* (cepa C4) presentó un índice de vigor de 9,17, valor que no se diferenció estadísticamente del control y fue superado por los tratamientos con extracto de ajo al 13% y *T. harzianum* (cepa T2).

En cuanto al extracto de ajo natural los porcentajes de germinación variaron en un rango entre el 75% y el 88%, incluso valores por debajo del control, que obtuvo un 80%; estos valores fueron similares a los reportados por Latif *et al.* (2006), el cual reportó el efecto de varios extractos de plantas sobre la germinación de semillas de mostaza, entre ellos el extracto de ajo, el cual obtuvo una capacidad de germinación que varió en un rango entre 72%-76% con respecto al control con un 65%. De igual manera nuestros resultados se encuentran por debajo de los reportados en Hasan *et al.* (2005) para semillas de trigo tratadas con extracto de ajo alcohólico y acuoso con valores del 97% y 96,7% respectivamente. Además, este autor mostró valores para el índice de vigor, la longitud de la raíz y de los brotes de trigo que aumentaron significativamente con el uso de los extractos de ajo (alcohólico y acuoso) con respecto al control; en este estudio el extracto de ajo al 13% con sus variantes en horas (8 h, 12 h y 24 h) favorecieron el índice de vigor y la longitud de la plántula, sin embargo, en cuanto al porcentaje de germinación no se observaron diferencias significativas con respecto al control.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdoli, M. and Esfandiari, E. (2017). Assessment of Genetic and Zinc Deficient Tolerance in Spring Durum Wheat (*Triticum durum* Desf) Genotypes in Calcareous Soil with Zinc Deficiency. *Jornal of Genetic Resources*. 3(1):7-17.
- Anhar, A. Sari, NP. Advinda, L., Putri, DH. And Handayani, D. (2019) Effect of the indigenous *Trichoderma* application on germination of black glutinous rice seed. *Journal of Physics: Conf Series* 1317 (2019) 012065. DOI: 10.1088/1742-6596/1317/1/012065
- Cipollone, M.J. y Sisterna, M.(2019). Efecto *in vitro* del tratamiento con cepas de *Chaetomium globosum* en semillas de cebada naturalmente infectadas con *Bipolaris sorokiniana*. Primer Congreso Argentino de Semillas.
- Doni, F., Isahak, A., Che Mohd Zain, C.R. and Wan Yusoff, W.M. (2014). Physiological and growth response of rice plants (*oryza sativa* L.) to *Trichoderma* spp. Inoculants. *AMB express* 4(1):1-7.
- Doria, J. (2010) Generalidades sobre las semillas: su producción, conservación y almacenamiento. *Cultrop* V.31 N°1
- Gangwar, GP. (2013) Growth promotion of rice seedling by fungal and bacterial against bacterial leaf blight of rice. *Journal of Applied Natural Science* 5(2):430-434.
- Geetha, D., & Sivaprakasam K. (1993) Treating Rice seeds with fungicides and antagonist to control seed-borne diseases. *International Rice Research Notes*, 18(3), 30-31.
- Hassan, M.M, Chowdhury, S.P., Alam, S.; Hossain, B. and Alam, M.S. (2005). Antifungal effects of plant extracts on seed-borne fungi of wheat and vigor index. *Pakistan Journal of Biological Science*. 8(9):1284-1289.
- Hassan, AA; Zeinab A. Kalboush and Mona M. Saleh. (2017) Efficacy of *Trichoderma* spp as Biocontrol Agents against Rice Brown Spot Disease and Biochemical Approaches. *J. Plant Prot. and Path.*, Mansoura Univ., Vol.8 (12): 677–686.
- Intriago-Paredes, AA. (2011) Evaluación de la calidad física y fisiológica de semillas de arroz (*Oryzae sativa*) INIAP 16, en función de las épocas de cosecha. Tesis de grado. Universidad Estatal de Quevedo. Ecuador.
- ISTA (International Seed Testing Association), SW. (2011) International rules for seed testing. Zurich. Switzerland. P:159.

- Latif, M.A., Saleh, A.K.M., Khan, M.A.I. Rahman, H. and Hossan, M.A. (2006). Efficacy of some plant extract in controlling seed-borne fungal infections of mustard. *Bangladesh journal of Microbiology*. 23:168-170.
- Nuñez-Muñoz, L. y Pavone-Maniscalco, D. (2014) Tratamiento biológico del cultivo de arroz en condiciones de vivero empleando el hongo *Trichoderma* spp. *Interciencia*, vol 39. N° 3 pp. 185-190.
- Perelló, A., Gruhlke, Martin and Slusarencko, AJ. (2013) Effect of garlic extraction seed germination, seedling health, and vigour of pathogen-infested wheat. *Journal of Plant Protection Research*. Vol 53, N° 4.

CAPITULO VI

EVALUACIÓN *IN VIVO* DEL
EFECTO DE LOS TRATAMIENTOS
CON *T. harzianum*, *C. globosum* y EL
EXTRACTO DE AJO NATURAL
SOBRE *Bipolaris oryzae*

6.1 Introducción

La mancha marrón, parda o castaña, causada por *Bipolaris oryzae* es una de las enfermedades más importantes del arroz (*Oryza sativa* L.) y está presente en prácticamente todas las áreas productoras de arroz a nivel mundial (Lee, 1992; Ou, 1985). Esta enfermedad contribuye a pérdidas directas tanto en el rendimiento como en la calidad del grano e indirectas debido al inoculo transmitido por la semilla. En este último caso, el micelio de *B. oryzae* se vuelve inactivo y puede reactivarse durante la germinación y causar lesiones en las raíces, el coleoptilo y las hojas primarias. La tasa de transmisión de semilla a plántula puede alcanzar hasta el 80% (Meneses *et al.* 2014).

Lee (1992) reportó que *Bipolaris oryzae* fue responsable de una epifitía en 1942, conocida como la “hambruna de Bengala”, donde se reportaron pérdidas del 40 al 90% de la producción y dos millones de muertes. Los granos infectados no son aptos para consumo humano, debido a que el hongo produce una toxina llamada ofiobolina.

Bipolaris spp. comprende un gran género de hongos con más de 100 especies, la mayoría de las cuales son saprobios en el suelo y patógenos de plantas, y algunas potencialmente pueden infectar a humanos y animales (Sivanesan, 1987). Si bien *B. oryzae* es la especie que infecta con mayor frecuencia semillas de arroz, probablemente debido a su asociación con las epidermis foliares de la mancha marrón, se han reportado otras especies de *Bipolaris* durante análisis de rutina de lotes de semillas de arroz en todo el mundo, incluyendo *B. bicolor*, *B. curvispora*, *B. cynodontis*, *B. halodes*, *B. hawaiiensis*, *B. indica*, *B. spicifera* y *B. victoriae* (De Farias *et al.* 2011; Motlagh & Kaviani, 2008; Sivanesan, 1987).

B. oryzae causa una infección severa durante la fase reproductiva de la planta que provoca pérdidas tanto cuantitativas como cualitativas (Faruq. *et al.* 2015); es un patógeno importante que puede limitar los rendimientos en el cultivo, puede provocar altos porcentajes de vaneo, disminución en el poder germinativo, el vigor y el tamaño de las plántulas, granos quebradizos, coloraciones anormales, entre otros, puede transmitirse y diseminarse por semilla hacia otras zonas arroceras (Duarte *et al.* 2014).

De la Paz *et al.* (2006), mencionaron que el patógeno puede reducir el rendimiento del cultivo en un rango de 6 a 90% y de 10 al 58% de muerte de plántulas. Meneses *et al.*

(2014), han reportado que la dinámica (incidencia y severidad) de la enfermedad está influenciada por el clima y las prácticas de manejo del cultivo y de la enfermedad, la cual varía significativamente entre cada año y décadas.

6.1.1 Objetivo

El objetivo planteado en el presente capítulo fue:

- Determinar el efecto de cada uno de los tratamientos sobre un hongo patógeno foliar transmitido por semilla, en ensayos de invernáculo.

6.2 Materiales y métodos

6.2.1 Ensayos de invernáculo

Los ensayos se realizaron con los granos/semillas de la variedad Yeruá de la localidad de Los Hornos (2018). Se evaluaron cada uno de los tratamientos (biológicos, extracto de ajo, fungicida y un control con agua destilada estéril) sobre *Bipolaris oryzae* que integra el complejo causal del manchado de grano de arroz y además se transmite por semilla produciendo lesión en hoja. Tanto el hongo patógeno como las cepas de los tratamientos biológicos (*Trichoderma harzianum* y *Chaetomium globosum*) y la concentración del extracto de ajo se seleccionaron en base a ensayos previos (Tabla 1).

Tabla 1. Tratamientos y patógeno seleccionado para ensayo *in vivo*.

Hongo patógeno	<i>Bipolaris oryzae</i>
Tratamiento <i>Trichoderma harzianum</i>	Cepa T2
Tratamiento <i>Chaetomium globosum</i>	Cepa C4
Concentración extracto de ajo	13%
Fungicida	ALLEGRO (BASF)

Allegro es un fungicida sistémico para el control de enfermedades foliares en el cultivo de trigo, cebada y arroz. Es de efecto preventivo, curativo y erradicante, contiene epoxiconazole, un nuevo triazol de la familia de los inhibidores de ergosterol (IBE) con acción sistémica, de larga residualidad.

El epoxiconazole tiene un sistema acrópeta. Además, Allegro contiene kresoxim-metil, un fungicida del grupo de las estrobilurinas, que permiten disminuir el riesgo de

desarrollo de resistencia a los fungicidas IBE (triazoles) y contribuyen al control fúngico; Este fungicida actúa por inhibición de la germinación de las esporas, el desarrollo del tubo germinativo y la esporulación. Posee acción eposistémica. (Marbete del producto, consultado vía web: agrofy.com.ar/fungicida-allegror.html).

Propiedades de Allegro (consultado vía web: <https://xdoc.mx>):

- El ingrediente activo kresoxim-metil se distribuye sobre la superficie de la hoja por difusión en fase gaseosa.
- La distribución del ingrediente activo es más uniforme.
- La penetración foliar de kresoxim-metil ocurre por difusión a través de la capa cerosa de la cutícula y por vía estomática.
- Existe un efecto translaminar.

En la Tabla 2 se describe la información principal y algunos detalles técnicos del fungicida Allegro (consultado vía web: agrofy.com.ar/fungicida-allegror.html).

Tabla 2. Información principal y detalles técnicos del fungicida Allegro

Principio activo	Epoxiconazole Kresoxim metil
Forma de acción	Sistémico Contacto Curativo
Familia química	Triazoles Estrobilurina
Modo de acción	Inhibidor de la respiración Mitocondrial Inhibidor de la biosíntesis del ergosterol
Sitio de acción	Inhibición de la demetilación (DMI) Inhibidor de la transferencia de electrones en el complejo III

En la Tabla 3 se muestra la clasificación de los diferentes principios activos usados según la FRAC para el fungicida Allegro. (https://www.frac.info/docs/default-source/publications/frac-code-list/frac-code-list-2021--final.pdf?sfvrsn=f7ec499a_2)

Tabla 3. Clasificación para Allegro de los principios activos usados según la FRAC code list 2021

Modo de acción	Sitio de acción y código	Nombre del grupo	Grupo Químico	Principios activos	Código	Riesgo de resistencia (FRAC)
G: Biosíntesis de esteroides en membrana	G1: (C14-demetilasa)	DMI (Inhibidores de la metilación)	Triazoles	Epoxiconazol	3	Medio
C: Respiración	C3: Complejo III: Citocromo bc1 (Ubiquinona oxidasa)	QoI (Inhibidor externo de Quinona)	oximino-acetatos	kresoxim-metil	11	Alto

Los granos/semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 5% durante 5 minutos, se dejaron orear y se colocaron en cajas de Petri con papel de filtro estéril y se dejaron en cámara de incubación con ciclos de 12hs luz y 12 oscuridad a $21 \pm 1^\circ\text{C}$. Se sembraron a los 5 días, luego de la emergencia de la plúmula y la radícula, en macetas (5 por tratamiento) con tierra.

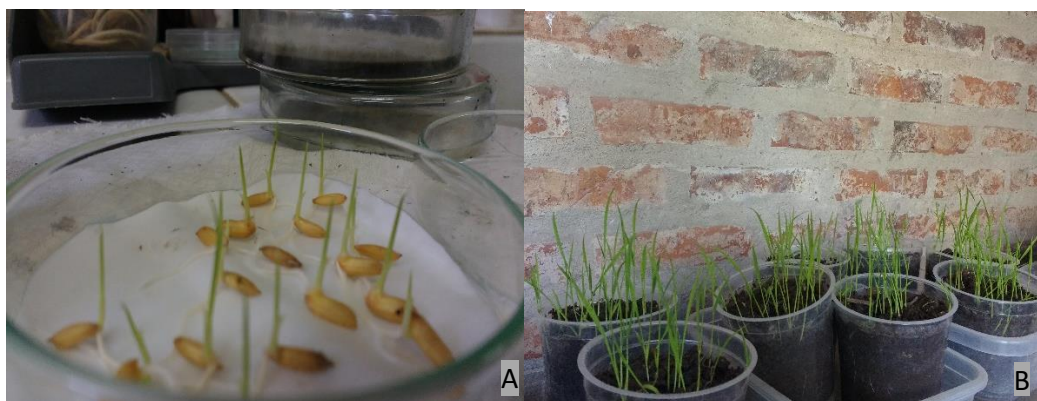


Figura 1: Germinación de semillas (A); plántulas de arroz en crecimiento (B)

6.2.2 Preparación del inóculo

Las cepas de *T. harzianum*, *C. globosum* y *Bipolaris oryzae* se cultivaron en medio de cultivo agar papa glucosado (APG) al 2% y se incubaron 10 días a $26 \pm 2^\circ\text{C}$. La preparación del inóculo se realizó inundando las cajas de Petri con las colonias de los tres microorganismos con agua destilada estéril. Luego con una varilla de vidrio estéril se realizó un raspado, con el fin de remover el micelio y las esporas y obtener la suspensión.



Figura 2: Preparación de inoculo de *C. globosum* para ensayo *in vivo*

Finalmente, estas suspensiones se filtraron a través de dos capas de gasa estéril y se ajustaron los volúmenes con agua destilada estéril. Se estandarizó la concentración de conidios con la ayuda de la cámara de Neubauer (hematocitómetro) y se les añadió 2 gotas de Tween al 1% a cada una de las suspensiones. Al tratamiento control con agua destilada estéril se le agregaron 2 gotas de Tween al 1%. Las concentraciones que se usaron se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Concentraciones de las suspensiones de conidios para el patógeno (*B. oryzae*) y los hongos antagonistas (*T. harzianum* y *C. globosum*)

Suspensión de conidios	Concentración
<i>Trichoderma harzianum</i>	2×10^8
<i>Chaetomium globosum</i>	$1,3 \times 10^6$
<i>Bipolaris oryzae</i>	2×10^5

6.2.3 Inoculación

Para la inoculación se utilizaron por tratamiento 25ml de suspensión de esporas para los tratamientos biológicos y 25 ml de preparado para los tratamientos control, extracto de ajo y fungicida. Se pulverizaron 5ml por maceta.

Los ensayos se realizaron durante los meses de octubre y noviembre con temperaturas entre los 20°C y 26 C°. Las inoculaciones se realizaron en plántulas de estadio V2/V3 (Counce *et al.* 2000), y se realizó el ensayo en modo diferido, es decir se inocularon

primero los tratamientos (biológicos, extracto de ajo, fungicida y el control) y a los 3 días el patógeno. Luego de la inoculación todas las macetas fueron cubiertas con bolsas de polietileno durante 48 hs a modo de cámara húmeda. Se evaluó la incidencia y la severidad de los síntomas observados en 10 plántulas por maceta elegidas al azar, en segunda y tercera hoja.

La incidencia de la enfermedad se calculó mediante la siguiente fórmula (Faruq *et al.* 2015):

$$\text{Incidencia de la enfermedad} = \frac{\text{Número de plántulas enfermas}}{\text{Número de plántulas evaluadas}} \times 100$$

La severidad de la enfermedad se midió en una escala de 0 a 9 (Faruq *et al.* 2015):

La escala de clasificación se muestra en la tabla 5.

Tabla 5. Escala de severidad recomendada por el IRRI (sistema de evaluación estándar para arroz)

0	Sin lesiones
1	Menos del 1% de área foliar afectada
2	1-3% de área foliar afectada
3	4-5% de área foliar afectada
4	6-10% de área foliar afectada
5	11-15% de área foliar afectada
6	16-25% de área foliar afectada
7	26- 50% de área foliar afectada
8	51-75% de área foliar afectada
9	76-100% de área foliar afectada

Para el análisis estadístico se realizó un ANOVA una vía para los porcentajes de incidencia y las medias se compararon con el test de Duncan, con una probabilidad de 5% ($p \leq 0,05$). Para la severidad al utilizar la escala de clasificación, los datos resultan no paramétricos, por lo cual se decidió utilizar el análisis de varianza de Kruskal- Wallis. En todos los casos se utilizó la versión libre de InfoStat estudiantil, año 2017 (InfoStat-Statistical Software).

6.3 Resultados

6.3.1 Incidencia y severidad de la enfermedad

La incidencia de la enfermedad para los tratamientos se muestra en la Figura 3. El tratamiento testigo, el tratamiento con *C. globosum* (cepa C4) y *T. harzianum* (cepa T2) no presentaron diferencias significativas entre sí, con valores de porcentaje de incidencia de 80%, 76% y 68% respectivamente.

El tratamiento con *T. harzianum* (cepa T2) presentó un valor de 68% que no se diferenció estadísticamente del tratamiento con extracto de ajo natural al 13% que obtuvo un valor de 58%. El extracto de ajo al 13% no presentó diferencias significativas con respecto al tratamiento con el fungicida que obtuvo un valor para el porcentaje de incidencia del 50%.

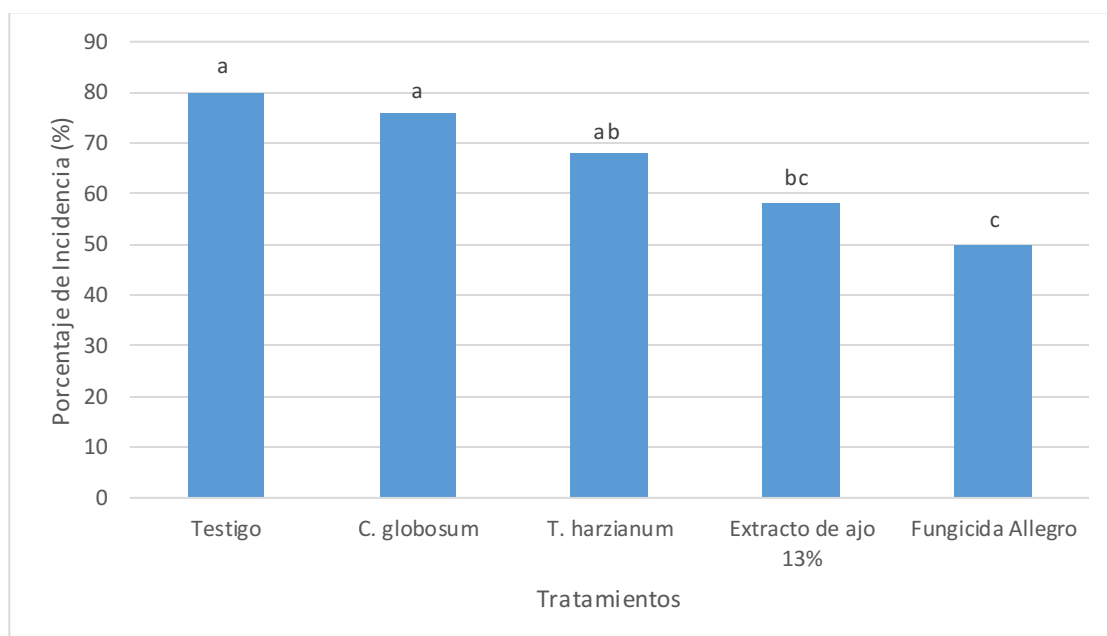


Figura 3. Porcentaje de incidencia de la enfermedad para los tratamientos biológicos (*T. harzianum* (Cepa T2) y *C. globosum* (Cepa C4)), con extracto de ajo natural, con fungicida y el testigo. Letras diferentes representan diferencias significativas según el test de Duncan ($p < 0,05$).

En la Figura 4 se muestran las plántulas en crecimiento inoculadas con los tratamientos biológicos (*T. harzianum* y *C. globosum*), el extracto de ajo, el fungicida y el testigo. En la Figura 5 se observan los síntomas de la mancha castaña producida por *Bipolaris oryzae*.



Figura 4: Plántulas inoculadas con los tratamientos. Testigo (A), *C. globosum* (Cepa C4) (B); *T. harzianum* (Cepa T2) (C); extracto de ajo al 13% (D); fungicida (E).

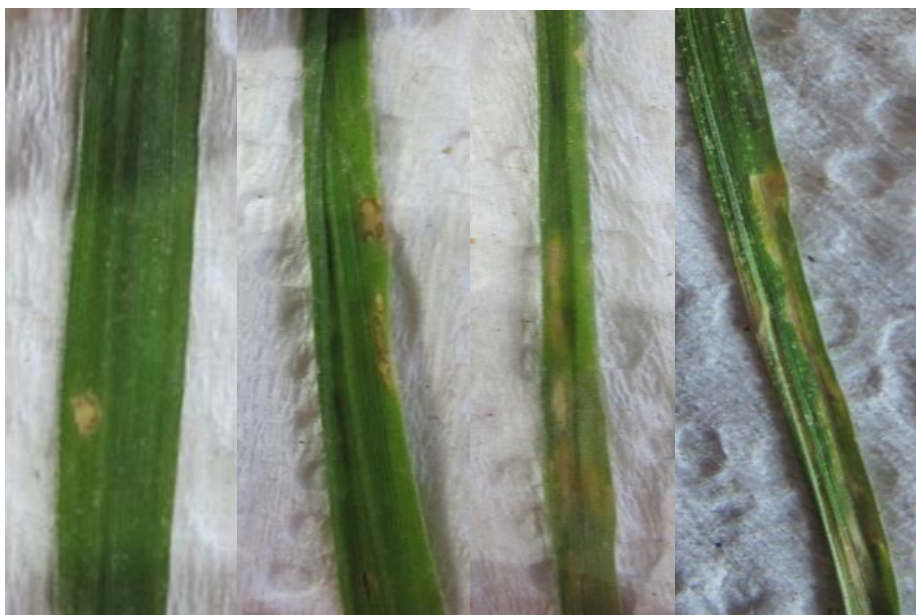


Figura 5. Hojas con síntomas de la mancha castaña producida por *B. oryzae*.

Los datos de las medianas para la severidad de la mancha castaña en grado (escala de 0-9) varió de 0,5 a 4 para las medianas del fungicida y del testigo, respectivamente. Los cuales presentaron diferencias significativas según el análisis de varianza de Kruskal Wallis.

Los tratamientos con el fungicida, el extracto de ajo al 13% y *T. harzianum* no presentaron diferencias significativas entre sí, con valores en las medianas de 0,5, 1,5 y 2, respectivamente; el tratamiento con *C. globosum* no presentó diferencias significativas con el testigo presentando valores en las medianas de 2 y 4 respectivamente. Los tratamientos biológicos y el extracto de ajo al 13% no se diferenciaron estadísticamente, con valores de 1,5, 2 y 2, respectivamente (Tabla 6).

Tabla 6. Valores para la severidad en los tratamientos con *T. harzianum*, *C. globosum*, extracto de ajo natural, fungicida y el testigo

Tratamientos	Medianas	Severidad
Fungicida Allegro	0,5a	Sin lesiones
Extracto de ajo 13%	1,5ab	Menos del 1% del área foliar afectada
<i>T. harzianum</i>	2ab	1-3% de área foliar afectada
<i>C. globosum</i>	2bc	1-3% de área foliar afectada
Testigo	4c	6-10% de área foliar afectada

Letras diferentes representan diferencias significativas según el análisis de varianza de Kruskal Wallis.

6.4 Discusión

En el presente estudio se reportó una reducción en la incidencia y severidad en hojas de las plántulas de arroz tratadas con *Trichoderma harzianum*, extracto de ajo al 13% y el fungicida.

Como patógeno foliar, *B. oryzae* afecta la actividad fotosintética de las plantas. Abdel-Fattah *et al.* (2007) mostraron que las plantas tratadas con *T. harzianum* a una concentración de 10^8 evidenciaron un aumento en los pigmentos fotosintéticos (clorofila a y b y carotenoides) y redujo significativamente la gravedad de la enfermedad de la mancha castaña bajo condiciones de invernadero; también se encontró que puede inducir resistencia sistémica y localizada, así como atacar o inhibir directamente el crecimiento de patógenos vegetales (Harman, 2006). Además este último autor menciona que *Trichoderma spp.* aumenta el crecimiento de raíces, incrementando la productividad de las plantas. En muchos casos estas respuestas son el resultado de efectos directos en las

plantas, disminución en la actividad de la microflora nociva de la raíz y compuestos tóxicos inactivados en la zona de la raíz.

Harish *et al.* (2008), han reportado que *Trichoderma* spp. ha demostrado ser eficaz para el control de la enfermedad de la mancha castaña y el aumento del crecimiento de las plantas. En Moya *et al.* (2020) se probaron las cepas de *Trichoderma* spp. que fueron empleadas en este estudio, las mismas lograron disminuir significativamente la incidencia del hongo *Pyrenophora teres* agente causal de la mancha en red de la cebada en un rango entre el 39% y el 55%. En nuestro caso, el porcentaje de incidencia para la mancha castaña fue de un 68% para el tratamiento con *T. harzianum* (cepa T2) que fue utilizada en ambos estudios. En Abdel-Fattah *et al.* (2007) las plántulas de arroz tratadas con *Trichoderma harzianum* mostraron un porcentaje de incidencia de la mancha marrón entre un 46,9% y un 53,5%. Priyadarshani *et al.* (2018) observaron incidencias mucho más bajas de la enfermedad, con valores del 5% y 15% con plántulas de arroz tratadas con *Trichoderma* spp. y *Chaetomium* spp.

Pérez-Torres *et al.* (2018) evaluaron la eficiencia de *T. harzianum* (concentración de conidios/ml 10^9 , 10^{10} y 10^{11}) y sus filtrados frente a los agentes causales de enfermedades como: la mancha castaña (*Bipolaris oryzae*), la pudrición de la vaina (*Sarocladium oryzae*) y el tizón del arroz (*Pyricularia grisea*), se evidenciaron porcentajes de eficiencia superiores al 60%, valores que incrementaron a medida que los filtrados estuvieron menos diluidos y las concentraciones se hicieron mayores; además produjeron una disminución del área bajo la curva del progreso de estas enfermedades. En Castro *et al.* (2014) se probó un bioproducto a base a *Trichoderma* spp. en plantas de banano, el cual produjo un efecto bioestimulante, la altura de la planta tuvo la media más alta en todas las evaluaciones, así como el área foliar, estos valores fueron significativamente superiores al control y no se presentaron diferencias significativas con el control químico. Este autor menciona que la aplicación foliar del bioproducto por el lado abaxial de la hoja, varias veces en el ciclo de crecimiento, podría permitir la colonización epífita de nuevas hojas con una cepa nativa y competitiva.

Los hongos endófitos como *Chaetomium globosum* mejoran el crecimiento de las plantas y reducen la incidencia de enfermedades. En Priyadarshani *et al.* (2018) se probó el efecto de endófitos de hongos aislados con mayor frecuencia en planta de arroz. Las plantas

inoculadas con dichos endófitos mostraron un aumento significativo en la altura de la planta, el peso fresco y el peso seco en comparación con las plantas no inoculadas después de 4 semanas, tiempo que podría deberse a la tasa de colonización de los hongos endófitos. Shanthiyaa *et al.* (2013) demostraron el uso potencial de *C. globosum* como agente de control biológico en el manejo de la enfermedad del tizón tardío en plantas de papa, informaron que el aislamiento Cg-6 de *Chaetomium globosum*, se aplicó como tratamiento de tubérculo, aplicación al suelo y aspersion foliar, individualmente y en combinación contra la infección por *Phytophthora*, la aplicación combinada resultó en una reducción significativa de incidencia de la enfermedad del tizón tardío (72%) en comparación con el control (100%) en condiciones de campo. Tarafdar y Gharu (2006) sugirieron que *C. globosum* produce fosfatasas y fitasas, que movilizan fósforo (P) y mejoran el crecimiento de las plantas.

El uso de preparados de ajo o alicina contra patógenos de plantas ya ha sido documentado por algunos autores, Curtis *et al.* (2004) probó el efecto del extracto de ajo en el desarrollo de la enfermedad del tizón del arroz, las hojas fueron rociadas con una dilución de 1 en 20 de extracto de ajo crudo 24 horas antes de la inoculación con esporas de *Magnaporthe grisea*, se observó una reducción de cinco veces en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, la pulverización a 1 h o 15 h después de la inoculación condujo a una reducción de la enfermedad en los controles (rociados con solución portadora) debido a la facilidad con la que las esporas pueden eliminarse de las hojas de arroz. De igual manera, se observó el efecto en el desarrollo del mildiú veloso de *Arabidopsis thaliana* causado por *Hyaloperonospora parasitica* la pulverización con extracto de ajo a las 48 h o 24 h antes de la inoculación, o 24 h después de la inoculación, condujo a una reducción de la enfermedad; el mayor efecto (reducción de 4 a 5 veces en la producción de conidióforos y oosporas) se evidenció cuando las hojas se trataron con extracto de ajo 24 h antes de la inoculación.

En Slusarenko *et al.* (2008) se reportó el control del tizón foliar del tomate por aspersion del jugo de ajo sobre las hojas de las plantas, 2 h antes de la inoculación por *P. infestans*. Este autor también expone menciona el enfoque para la formulación de extractos de plantas a través de la encapsulación que ha sido utilizada para estabilizar y establecer bioplaguicidas en el suelo, por ello realizaron experimentos usando alginato y otras formulaciones para encapsular el jugo de ajo y aplicar estas formulaciones en varias dosis

al suelo alrededor de las plántulas de tomate inoculadas con *Phytophthora infestans*, con resultados prometedores en comparación con la fumigación directa en plantas, algunas formulaciones mejoraron la actividad, mientras que otras fueron menos efectivas. Este autor menciona además que existen varios preparados a base de compuestos de ajo disponibles comercialmente, aunque estos últimos están destinados principalmente a controlar plagas en lugar de patógenos.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Fattah, G.M.; Shabana, Y.M.; Ismail, A.E.; Rashad, Y.M. (2007) *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*. *Mycopathol.* 164, 81-99.
- Castro, R., Pesántez, M., Lema, P., Quevedo, J., Arichabala, P. and Alvarado-Capó, Y. (2014). Potential use of *Trichoderma*-based bioproduct for black leaf streak disease (*Mycosphaerella fijiensis*) management in the field. *Biocontrol Science and Technology.* 25(4):481-486.
- Counce, P.A., Keisling, T.C., Mitchell, A.L., (2000) A uniform and adaptative system for expressing rice development. *Crop Science*, 40, 436-443. Madison.
- Curtis, H., Noll, U., Storman, J. and Slusarenko, A.J. (2004). Broad-spectrum activity of the volatile phytoanticipin allicin in extracts of garlic (*Allium sativum* L.) against plant pathogenic bacteria, fungi and oomycetes. *Physiological and Molecular Plant Pathology.* 65(2):79-89.
- De Farias, C.R.J., Afonso, A.P.S., Pierobom, C.R., y Del Ponte E.M. (2011) Regional survey and identification of *Bipolaris* spp. associated with rice seeds in Rio Grande do Sul State, Brazil. *Ciencia Rural* v.41, n.3, p.369-372.
- De la Paz, MAG, Goodwin, PH, Raymundo, AK, Ardales, EY y Vera-Cruz, CM. (2006) Phylogenetic analysis based on ITS sequences and conditions affecting the type of conidial germination of *Bipolaris oryzae*. *Plant Pathology*, 55:756-765.
- Duarte, Y. Pino, O. y Martínez, B. (2014) Efecto de cuatro aceites esenciales sobre hongos asociados al manchado del arroz. *Rev. Protección Veg.* Vol 29 N° 1:62-65.
- Faruq, AN., Rahman, MM., Akhtar, N., Islam, MT., Uddin, M. and Ora, N. (2015) Evaluation of imported hybrid Rice varieties against three field diseases under natural epiphytic conditions of Bangladesh. Department of Plant Pathology, Sher-e-Bangla Agricultural University, Dhaka-1207, Bangladesh.
- Harish, S., Saravanakumar, D., Radjacommar, R. Ebenezar, E.G. and Seetharaman, K. (2008) Use of plant extracts and biocontrol agents for the management of Brown spot disease in rice. *BioControl.* 53:555-567.
- Harman, G. E. (2006) Overview of mechanisms and uses of *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 96:190-194.
- Lee, F.N. (1992). Compendium of rice diseases. RK. Webster and Gunnell PS. The American Phytopathological Society. Brown spot. pp17.
- Meneses, P.R., Jacobsen de Farias, C.R, De Almeida Caniel, A.R., Schwanck, A.A. Nunes Deibler, A., Daltrozzo Funk, G. y Del Ponte, E.M (2014) Regional

and varietal differences in prevalence and incidence levels of *Bipolaris* species in Brazilian rice seedlots. *Tropical Plant Pathology*, Vol 39(5):349-356.

- Morlagh, MR and Kaviani, B. (2008) Characterization of New *Bipolaris* spp.: The Causal Agent of Rice Brown Spot Disease in the North of Iran. *International Journal of Agriculture and Biology*. 10:638-642.
- Moya, P., Barrera, V., Cipollone, J. Bedoya, C. Kohan, L., Toledo, A. and Sisterna, M. (2020). New isolates of *Trichoderma* spp. as biocontrol and plant growth-promoting agents in the pathosystem *Pyrenophora teres*-barley in Argentina. *Biological Control*. 141.104152
- Ou, S.H. (1985). *Rice Diseases*. 2nd, ed., Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, UK, 380 p.
- Pérez-Torres, E., Bernal-Cabrera, A., Milanés-Virelles, P., Sierra-Reyes, Y., Leiva-Mora, M., Marín-Guerra, S. and Monteagudo-Hernández, O. (2018). Eficiencia de *Trichoderma harzianum* (Cepa A-34) y sus filtrados en el control de tres enfermedades fúngicas foliares en arroz. *Bioagro*. 3(1):17-26.
- Priyadarshani, CDN. Deshappriya, N and Sandamali, GI. (2018) Effect of fungal endophytes of rice variety Ld 368 on growth and Brown spot disease incidence of rice. *Tropical Plant Research*. (3): 292-302. DOI: 10.22271/tpr.2018.v5.i3.037 ISSN (online):2349-1138
- Shanthiyaa, V., Saravana-kumar, D. Rajendran, L. Karthikeyan, G. Prabakar, K., Raguchander, T. (2013). Use of *Chaetomium globosum* for biocontrol of potato late blight disease. *Crop Protection*. 52:33-38.
- Sivanesan, A. (1987) Graminicolous species of *Bipolaris*, *Curvularia*, *Drechslera*, *Exserohilum* and their teleomorphs. *CAB International Mycological Institute (CMI)*. Mycological Papers 158. 1-261.
- Slusarenko, A.J., Patel, A. and Portz, D. (2008). Control of plant diseases by natural products: Allicin from garlic as a case study. *Eur. J. Plant. Pathol*. 121:313-322.
- Tarafdar, JC and Gharu, A. (2006) Mobilization of organic and poorly soluble phosphates by *Chaetomium globosum*. *Applied Soil Ecology* 32:273-283.

CONCLUSIONES GENERALES

- ✓ Las especies encontradas en este estudio: *Alternaria* spp., *Nigrospora* spp., *Epicoccum* spp., *Fusarium* spp., *Curvularia* spp., *Cladosporium* spp., *Bipolaris* spp. y *Exserohilum* spp., están asociadas al manchado de grano/semillas de arroz.
- ✓ Las semillas constituyen la principal fuente de inóculo primario de esta enfermedad, permitiendo la introducción y diseminación de los patógenos.
- ✓ La composición de la micoflora asociada al manchado del grano varía respecto al genotipo de los cultivares y a las condiciones ambientales de las regiones cultivadas.
- ✓ Las condiciones meteorológicas pueden generar un ambiente predisponente para la aparición y desarrollo de algunas especies fúngicas presentes en el manchado de grano, por tal motivo entender y conocer las interacciones hospedante-patógeno-ambiente es de particular importancia para el estudio de la ecología de cada género/especie.
- ✓ Si bien la mayor inhibición de crecimiento micelial correspondió a las cepas/aislamientos T2 y T3 de *Trichoderma harzianum* y C1 y C4 de *Chaetomium* spp. todas las cepas evaluadas podrían producir un efecto control sobre los patógenos evaluados: *Curvularia lunata*, *Bipolaris oryzae*, y *Fusarium graminearum*.
- ✓ Las cepas de *Trichoderma* spp. y *Chaetomium* spp. frente a los patógenos propuestos *C. lunata*, *B. oryzae* y *F. graminearum* inhibieron su crecimiento micelial y ejercieron mecanismos de acción a nivel microscópico que evidenciaron su efecto antagonista.
- ✓ El conocimiento de los mecanismos de acción existentes en los aislamientos de *Trichoderma* spp. frente a los patógenos se puede convertir en una herramienta eficaz para seleccionar aquellos aislamientos con mayor potencial de control.
- ✓ Los tratamientos biológicos demostraron un efecto positivo sobre la germinación de las semillas de arroz, mientras que el extracto de ajo a la concentración del 13% favoreció el vigor y la longitud de las plántulas.
- ✓ Los resultados permiten confirmar el efecto biocontrolador del extracto de ajo sobre hongos patógenos del manchado de grano de arroz. La posibilidad de un control alternativo que podría representar un avance para disminuir la propagación

de enfermedades a través de las semillas, y por ende una mejora en la calidad del grano/semilla.

- ✓ *Trichoderma harzianum* evidenció un buen comportamiento frente a los patógenos del manchado de arroz, favoreció la germinación de las semillas y el desarrollo de las plántulas de arroz infectadas con *B. oryzae*.