

CARACTERIZACIÓN DE HONGOS RIZOSFÉRICOS CONTRA *PYRICULARIA* *ORYZAE* EN ARROZ

CHARACTERIZATION OF RHIZOSPHERIC FUNGI AGAINST *PYRICULARIA* *ORYZAE* IN RICE

Rito Herrera¹; Martha de Von Chong²; Jhoel Tuñón³

¹ Instituto de Innovación Agropecuaria de Panamá. Panamá. rito.herrera@up.ac.pa

<https://orcid.org/0000-0003-2509-0391>

² Universidad de Panamá. Centro Regional Universitario de Coclé. Panamá. martha.chaves@up.ac.pa

<https://orcid.org/0000-0002-1087-4196>

³ Ministerio de Ambiente. Dirección de Verificación del Desempeño Ambiental. Panamá.

jtunon@miambiente.gob.pa <https://orcid.org/0000-0003-2644-3806>

Recepción: 25 de noviembre de 2022

Aprobación: 2 de abril de 2023

RESUMEN

Se tomaron muestras de la rizósfera del arroz (*Oryza sativa*) de la variedad GAB 8, en una parcela bajo la modalidad de agricultura orgánica de subsistencia. Se aislaron hongos rizosféricos determinando diferencias significativas en el total de aislamientos para las variables ciclos de cultivo, secciones de la rizósfera (sección suelo, sección raíz, mezcla de suelo+raíz), fases fenológicas (vegetativa, floración, maduración) y diluciones (10^{-1} a 10^{-7}). Se evaluó la actividad biológica (antagonismo) de hongos rizosféricos contra *Pyricularia oryzae*. Se aislaron 20 cepas fúngicas que mostraron actividad antagónica contra *P. oryzae*, 2 cepas corresponden a la especie *Aspergillus flavus*, 3 a *Aspergillus niger*, 2 a *Aspergillus* spp, 2 a *Penicillium* sp (morfortipo r1), 5 a *Penicillium* sp (morfortipo r2) y 6 a *Trichoderma* sp (los morfortipos fúngicos se identificaron molecularmente secuenciando los genes ITS). La presente investigación desarrolló la bioprospección y caracterización de hongos rizosféricos contra patógenos de cultivares de arroz, como posible alternativa al uso de fungicidas de síntesis química.

Palabras clave: arroz, rizósfera, *Trichoderma*, *Pyricularia oryzae*, *Penicillium*, *Aspergillus*.

ABSTRACT

Samples were taken from the rhizosphere of rice (*Oryza sativa*) of the GAB 8 variety, in a plot under the organic subsistence farming modality. Rhizospheric fungi were isolated, determining significant differences in the total number of isolates for the crop cycle variables, rhizosphere sections (soil section, root section, soil+root mixture), phenological phases (vegetative, flowering, maturation) and dilutions (10^{-1} to 10^{-7}). The biological activity (antagonism) of rhizospheric fungi against *Pyricularia oryzae* was evaluated. Twenty fungal strains were isolated that showed antagonistic activity against *P. oryzae*, 2 strains correspond to the species *Aspergillus flavus*, 3 to *Aspergillus niger*, 2 to *Aspergillus spp*, 2 to *Penicillium sp* (morphotype r1), 5 to *Penicillium sp* (morphotype r2) and 6 to *Trichoderma sp* (fungal morphotypes were molecularly identified by sequencing the ITS genes). The present investigation developed the bioprospecting and characterization of rhizospheric fungi against pathogens of rice cultivars, as a possible alternative to the use of chemical synthesis fungicides.

Keywords: rice, rhizosphere, *Trichoderma*, *Pyricularia oryzae*, *Penicillium*, *Aspergillus*.

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades son una de las limitantes al aumento de la productividad de arroz en los trópicos, restringen la expansión de las áreas de cultivo y aumentan los costos por insumos en el sembrado. Aunque el arroz crece en amplio rango de condiciones -incluyendo planicies altas secas los agroecosistemas de arroz más productivos son las planicies bajas irrigadas, el resultado final es que las zonas más productivas son también las más vulnerables a las pérdidas causadas por roedores, insectos, hongos, bacterias y virus. (Barrera, 2015)

Su cultivo intensivo es afectado por numerosos factores bióticos, destacándose particularmente los agentes infecciosos, incluyendo virus, bacterias y hongos, así como plagas por diversas especies de artrópodos. Es por ello, que se requieren estudios bioprospectivos que aprovechen la diversidad y abundancia de los recursos genéticos microbianos para disminuir el uso de plaguicidas de síntesis química como es el caso de los fungicidas, lo cual se enmarca en una producción agrícola más amigable con el ambiente.

Entre las principales enfermedades del este cultivo en Panamá tenemos las causadas por agentes patógenos como la *Pyricularia grisea*, *Rhizoctonia* spp, virus de la hoja blanca, *Helminthosporium* spp, *Rhynchospodium* spp, *Cercospora* spp, *Sarocladium* spp. Además de las enfermedades provocadas por bacterias como la *Xanthomonas* spp, *Pseudomonas* spp y *Burkholderia* spp (MIDA, 2015).

P. oryzae es un hongo microscópico, perteneciente al grupo de los ascomicetos, causante de la periculariosis o tizón de la panícula del arroz. *P. oryzae* posee conidióforos generalmente epífitos, con el extremo redondeado, algo estrecho en la base, septados hacia su parte inferior y muy poco o no septados hacia arriba, coloración grisácea; conidios obclavados o piriformes, aguzados en el extremo y con base truncada o presentando un pequeño apéndice casi siempre con 2 septos, ligeramente oscuros, traslúcidos; más de un conidio puede formarse sobre el conidióforo; el número de conidio oscila entre 1 y 20. El tamaño de los conidios varía según los diferentes organismos aislados y según las condiciones ambientales (Barrera, 2015).

El conidio forma apresorios en el extremo del tubo germinativo, los cuales varían la forma y tamaño, y tienen generalmente paredes delgadas con un diámetro entre 5 y 15 μm , globosos, ovoides u oblongo. La temperatura óptima para el crecimiento del micelio es de 28 °C aproximadamente, aunque este puede crecer a temperaturas de 8 hasta 37°C, con un óptimo de óptimo de 28 °C. La temperatura óptima para la germinación del conidio oscila entre 25 y 28 °C, los conidios se forman sobre las lesiones en la planta de arroz solo cuando la humedad relativa del aire oscila entre 92 y 96%. El micelio crece mejor cuando hay un 93% de humedad del aire. La luminosidad influye de forma variable sobre la actividad fisiológica del hongo. La esporulación es estimulada por periodos alternos de luz y oscuridad y la diseminación de los conidios ocurre mayormente durante la noche. El crecimiento del micelio aumenta con la disminución de la luz, la luz solar suprime la germinación del conidio. El nombre del estado anamorfo *P. oryzae* se ha usado para el hongo que aparece en el arroz, diferenciándolo de *P. grisea* que se encuentra en otros cereales y gramíneas (Aproscello, 2013).

La Periculariosis fue reportada por primera vez en Japón 1704, en general, se distinguen dos períodos críticos en los cuales las plantas de arroz son más susceptibles: 35-40 días de edad del cultivo y en floración (Barrera, 2015). El hongo *P. oryzae* tiene un ciclo de vida corto en

la planta y por tanto múltiples infecciones se pueden llevar a cabo en un campo infectado por este patógeno. El hongo penetra por la hoja gracias a una estructura de forma semiesférica denominada apresorio. Debido a una gran presión (aproximadamente 8 MPa) ejercida sobre la superficie de la hoja, el hongo es capaz de penetrar en la planta. Una vez dentro crece de una manera biotrófica, es decir, sin afectar demasiado al crecimiento de la planta y sin matar a las células vegetales. Al cabo de unos tres días los efectos del hongo sobre la hoja comienzan a ser visibles y a generar lesiones debido a la necrosis o muerte de las células de la hoja. En ese punto, realmente podemos decir que el hongo empieza a matar a la planta y se alimenta de los restos de las células vegetales muertas (Rodríguez, 2016).

Este estadio de crecimiento se denomina necrotrófico; finalmente, a los seis o siete días, el hongo emerge del tejido vegetal y de cada lesión se generan miles de esporas al día durante dos semanas. Las esporas se diseminan por viento o agua y están listas para iniciar un nuevo ciclo de infección. Durante todo este proceso se produce una merma importante en el cultivo pudiendo afectar severamente la producción de los granos de arroz (IICA, 2009).

Dependiendo en la época o parte de la planta donde se produce el ataque, la severidad puede ser variable. Las lesiones que produce el hongo en las hojas son de forma alargada, de color marrón uniforme. Más adelante presenta centros grisáceos y bordes de color marrón. También puede producir daños en los nudos, en diferentes partes de la panícula y en los granos. En muchas ocasiones, los granos terminan vacíos o deficientemente llenos y grisáceos (Quesada y García, 2014).

Los ataques en la panícula son los más importantes puesto que la rentabilidad de la inversión requerida para la explotación de este cereal tiende a reducirse sustancialmente por la baja en la calidad y cantidad de la cosecha. No obstante, las mermas por infecciones foliares pueden incidir en los rendimientos, debido a que los daños provocan reducciones tanto en el número de macollas como en la altura de las plantas, llegando inclusive hasta la muerte parcial o total de las mismas. Como consecuencia de esta reducción del área foliar, se crean condiciones propicias para la invasión violenta de malezas que compiten con el cultivo (Barrera, 2015). Dependiendo de la variedad y las condiciones predisponentes, las pérdidas ocasionadas por la infección pueden llegar a reducir en más de un 65% los rendimientos en la producción de granos de arroz (Rodríguez, 2016).

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Colecta de campo

La colecta de las muestras (estudio de bioprospección biológica) se realizó en la localidad de Los Torres, corregimiento de Cabuya, distrito de Antón, provincia de Coclé, República de Panamá, próximo a las coordenadas UTM (Datum WGS84) 591369.06 m E; 943492.28 m N. La mayoría de los productores de arroz de esta zona, se dedican a la agricultura de subsistencia, bajo la modalidad de cultivos orgánicos, asesorados por el Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (Yau, comunicación oral, 2016). En el campo se tomarán muestras de suelo para su análisis fisicoquímico. El muestreo se efectuó en una parcela de 10 m²) cultivada con arroz, variedad **GAB 8** bajo el sistema de agricultura de subsistencia (sustento del dueño de la finca y su familia). El sitio de muestreo fue seleccionado para la bioprospección de hongos, pues presenta certificación de agricultura orgánica emitida por la alemana BioLatina S.A. Se partió del supuesto, de aislar una mayor cantidad y diversidad de microorganismos (posibles antagonistas) de un suelo que ha tenido un manejo libre de agroquímicos y/o fertilizantes de síntesis química.

2. Procesamiento de muestras

En esta etapa se procesaron las muestras de la rizósfera de las plantas de arroz, aislando hongos; se evaluó *in vitro* el potencial antagónico de los aislamientos bacterianos ante el hongo fitopatógeno (*Pyricularia oryzae*). Se identificaron las cepas con mayor potencial de inhibición y se realizó la conservación criogénica de estos hongos. Los ensayos se realizaron en el Laboratorio de Microbiología del Centro Regional Universitario de Coclé-Universidad de Panamá.

De cada una de las plantas colectadas se separaron la parte aérea de la basal; la zona rizosférica fue dividida en tres secciones: **la exorrizosfera** o suelo rizosférico que representamos con la letra “S”, **la raíz** que involucra tanto la endorizosfera y rizoplano, representada con la letra “R” y **una mezcla de suelo rizosférico con raíces** “S+R”. A partir de cada sección se pesaron 30 g de la muestra, para luego homogenizarlas en 100 ml de agua peptonada. Las suspensiones fueron colocadas en un homogenizador seward® a 200 RPM por 1 min, luego de 5 min para luego ser inoculadas en platos Petri con medio de cultivo

como agar papa dextrosa, agar V8 y agar extracto de malta. Es importante destacar que en el estudio se incluyen los estados fenológicos de vegetativo, reproductivo y de maduración.

3. Aislamiento, pruebas de antagonismo in vitro e identificación de hongos rizosféricos del cultivo de arroz (*Oryza sativa*)

3.1. Aislamiento de hongos rizosféricos

Se realizaron diluciones seriadas a partir de la muestra de 30 g tomados de cada una de las secciones de la rizósfera. La siembra se realizó por duplicado, incubando a temperatura ambiente alternando 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad (Chaves, comunicación oral, 2016).

3.2. Pruebas de antagonismo in vitro de los hongos aislados de la rizósfera frente *P. oryzae*.

Las cepas fúngicas aisladas de la rizósfera clasificadas por género y morfotipos, fueron repicadas en platos Petri con medio PDA e incubadas durante siete días, a 28 °C, alternando 18 horas de luz y seis de oscuridad. Seguidamente, se empleó el método de cultivo dual (Quirós *et al.* 2014; Castellano, 2002), se colocaron un disco de 7 mm de diámetro colonizado con cada uno de los hongos rizosféricos aislados e identificados. En sentido opuesto a 15 mm del centro del plato, se colocaron un disco colonizado de 7 mm con el patógeno *P. oryzae*, para cada cepa fúngica se hicieron 3 réplicas. Para el caso del primer control se colocaron un disco del patógeno en el centro del plato con PDA y para el segundo, se colocó un disco (7 mm) del hongo aislado en PDA, con el fin de determinar el crecimiento sin competencia (Castellano, 2002).

3.3. Identificación de hongos con actividad antagónica

Las cepas fúngicas con características macroscópicas similares se agruparon en morfotipos para su identificación taxonómica, se empleó la técnica de microcultivo en cámara húmeda incubándose a 28 °C, alternando 16 h de luz y 8 h de oscuridad, para favorecer el crecimiento de estructuras características de los hongos. Se

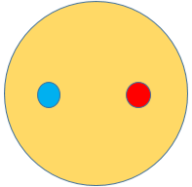



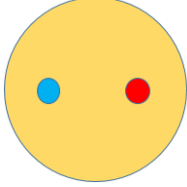



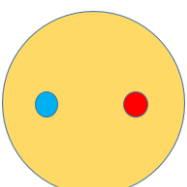



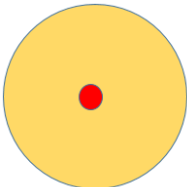


observaron las estructuras microscópicas y se clasificaron por géneros. Posteriormente, para su identificación molecular se amplificaron por PCR convencional los genes (ITS) y se secuenciaron con el fin de determinar la especie de hongo.


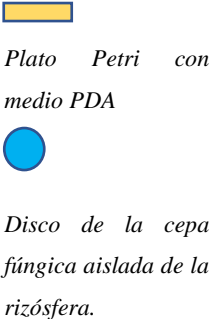
RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las cepas fúngicas aisladas de la rizósfera clasificadas por género y morfotipos, fueron repicadas en platos Petri con medio PDA e incubadas durante siete días, a 28 °C, alternando 18 horas de luz y seis de oscuridad (Chaves, comunicación oral, 2016). Seguidamente, se empleó el método de cultivo dual (Quirós *et al.*, 2014 y Castellano, 2002); se colocó un disco de 7 mm de diámetro colonizado con cada uno de los hongos rizosféricos aislados e identificados. En sentido opuesto a 15 mm del centro del plato, se colocó un disco colonizado de 7 mm con el patógeno *P. oryzae.*, para cada cepa fúngica se hicieron 3 réplicas. Para el caso del primer control se colocó un disco del patógeno en el centro del plato con PDA y para el segundo, se colocó un disco (7 mm) del hongo aislado en PDA, con el fin de determinar el crecimiento sin competencia (Tabla 1).

Tabla 1.

Esquema de las pruebas de antagonismo in vitro entre las cepas fúngicas aisladas y P. oryzae.

Enfrentamientos				
Replica 1	Replica 2	Replica 3	Controles	Observación
  Plato Petri con medio PDA  Disco de la cepa fúngica aislada de la rizósfera  Disco de la cepa de <i>P. oryzae</i>	  Plato Petri con medio PDA  Disco de la cepa fúngica aislada de la rizósfera  Disco de la cepa de <i>P. oryzae</i>	  Plato Petri con medio PDA  Disco de la cepa fúngica aislada de la rizósfera  Disco de la cepa de <i>P. oryzae</i>	Control 1  Se colocó un disco de 5mm del fitopatógeno <i>P.oryzae</i> en un plato Petri con medio PDA.  Plato Petri con medio PDA  Disco de la cepa de <i>P. oryzae</i>	Se marca una línea divisoria (centro del plato Petri), para observar la invasión del espacio de cada microorganismo. Se tomará la medida del crecimiento micelial del patógeno <i>Pyricularia</i> y se calcula el porcentaje de inhibición con la formula $PICR = \frac{R1 - R2}{R1} \cdot 100$ R1 Donde R1 es el radio mayor (radio patógeno-testigo) y R2 es el radio menor (radio del patógeno en cultivo dual). Los tratamientos se incuban a temperatura ambiente. Las mediciones se realizan los días

<p>Método: Cultivo dual</p> <p>-En PDA, se sembrará un disco (5 mm) del hongo aislado a 15 mm del centro del plato,</p> <p>-En el sentido opuesto también a 15 mm del centro, se colocará un disco de 5 mm de diámetro del patógeno <i>Pyricularia</i>.</p>	<p>Control 2</p>  <p>Se colocó un disco de 5mm de la cepa fúngica aislada de la Rizósfera en un plato Petri con medio PDA.</p>  <p>Plato Petri con medio PDA</p> <p>Disco de la cepa fúngica aislada de la rizósfera.</p>	<p>3, 5 y 8 posterior al montaje de los enfrentamientos.</p>
--	--	--

Las mediciones para considerar se tomaron en cuenta a partir del tercer, quinto y octavo día posterior a la siembra, calculando el índice de inhibición, mediante la fórmula

$$PICR = \frac{R1 - R2}{R1} \cdot 100$$

Donde R1 es el radio mayor (radio patógeno-testigo) y R2 es el radio menor (radio del patógeno en cultivo dual). (Quirós *et al.*, 2014.)

El criterio seleccionado para determinar el potencial antagónico según el porcentaje de inhibición fue tomado según la metodología propuesta por Quirós *et al.*, 2014, así:

Negativo: ausencia de zona de inhibición o un porcentaje menor de 10% y crecimiento normal de la colonia fúngica, de forma similar al control.

Baja: ausencia de zona de inhibición o con un porcentaje entre 10–39% y con disminución en el crecimiento de la colonia fúngica.

Media: ausencia de zona de inhibición o un porcentaje entre de 40–69% y con disminución en el crecimiento de la colonia fúngica.

Positivo: presencia de zona de inhibición definida o en un porcentaje entre 70–100%.

Extracción de ADN e identificación molecular de hongos rizosféricos

Se mezclaron por separado 100 mg de diferentes micelios fúngicos con 1 ml de tampón de extracción de ADN (DEB) que contiene proteinasa K (0,05 mg / ml) y se maceró en un mortero estéril. El extracto resultante se dispensó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml. 50 µl de dodecil sulfato de sodio al 20% (SDS) se añadieron al tubo y se incubó en un baño de agua a 65 ° C durante 30 min. Los tubos se dejaron enfriar temperatura ambiente antes de añadir 100 µl de acetato de potasio 7,5 M y se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes se transfirieron a nuevos tubos recién esterilizados en autoclave a los que se agregaron 2/3 volúmenes de isopropanol frío y alcohol isopropílico. Los tubos se invirtieron suavemente 3-5 veces antes de incubar a -20 ° C durante 1 hora. A partir de entonces, los tubos se centrifugaron a 13000 rpm durante 10 min y se descartó el sobrenadante. Se agregaron 500 µl de etanol al 70% encada tubo y se centrifugó durante 5 min a 13000 rpm antes de desechar cuidadosamente el sobrenadante con el sedimento de ADN intacto. Se eliminaron las trazas de etanol antes de secar los sedimentos de ADN a 37 ° C durante 10-15 min. Los gránulos de ADN fueron resuspendido en 50 µl de tampón Tris-EDTA (TE) (Awa y Oguntade, 2015).

Se Amplificó por PCR el gen de ARNr 5.8S y región espaciadora transcrita interna ITS que flanquea ITS1, 5.8S (ITS 1: 5 'TCC GTA GGT GAA CCT GCG G 3' e ITS 4: 5 'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'). Las condiciones de la PCR incluyeron un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, seguido de 35 ciclos (cada ciclo compuesto por 30 s) de desnaturalización a 94°C. El recocido de los cebadores se realizó a 55 °C durante 30 s, seguido de 1,5 min., extensión a 72 °C y una extensión final de 7min a 72°C. El segmento del gen ITS amplificado a partir de los aislados fue secuenciado en ambas direcciones a partir de productos purificados. Las muestras de ADN de PCR se secuenciaron en ambas cadenas mediante electroforesis en un ABI (secuenciador capilar de ADN automatizado). Las secuencias generadas se analizaron utilizando el software de análisis de secuenciación BioEdit 7.2.5. Las identidades de los aislamientos se confirmaron mediante NCBI / BLAST (Awa y Oguntade, 2015).

Los hongos identificados se criopreservaron en glicerol al 30% y posteriormente fueron ultracongelados a -80 °C.

Las cepas fúngicas con características macroscópicas similares se agruparon en morfotipos para su identificación taxonómica, se empleó la técnica de microcultivo en cámara húmeda incubando a 28 °C, alternando 16 h de luz y 8 h de oscuridad, para favorecer el crecimiento de estructuras características de los hongos. Se observaron las estructuras microscópicas y se clasifico por géneros.

Durante la prospección de hongos de la rizósfera del arroz, se evaluaron diferencias significativas en cuanto al número total de aislamientos para las variables ciclo de cultivo, fase fenológica, sección de la rizósfera y diluciones, se presentan las diluciones donde aislaron los hongos durante el estudio (Tabla 2).

Tabla 2.

Variables evaluadas en la prospección de hongos de la rizósfera del arroz.

CICLO DE CULTIVO	FASE FENOLÓGICA	SECCIÓN DE LA RIZOSFERA	DILUCIONES
1. Primer Ciclo (Agosto-diciembre 2016)	1. Fase vegetativa	1. Suelo	10 ⁻¹ 10 ⁻² 10 ⁻³
	2. Fase de floración	2. Suelo+Raíz	10 ⁻⁴
2. Segundo Ciclo (mayo-septiembre 2017)	3. Fase de maduración	3. Raíz	10 ⁻⁵ 10 ⁻⁶ 10 ⁻⁷

Durante la prospección de hongos rizosféricos se obtuvo un total de 112 aislamientos. Los datos obtenidos (ciclo de cultivo, fase fenológica, sección de la rizósfera y diluciones) cumplen los supuestos de normalidad, las variables empleadas explican en un 24% la presencia de hongos en la rizósfera del arroz (Tabla 3). En los tres estados fenológicos se obtuvo aislamientos de hongos.

Tabla 3. Resumen de Ajuste-Datos de la prospección de hongos rizosféricos.

Resumen del ajuste	
R cuadrado	0.310006
R cuadrado ajustado	0.243427
Raíz del error cuadrático medio	0.65621
Media de respuesta	0.569426
Observaciones (o suma de pesos)	126

Se realizó un análisis de varianza para el total de hongos aislados de la rizósfera (112), observando que existieron diferencias significativas entre los ciclos de cultivo y las diluciones empleadas, mientras que no existieron diferencias significativas entre las distintas secciones de la rizósfera y las fases fenológicas (Tabla 4).

Tabla 4.

Análisis de varianza para el total de hongos aislados de la rizósfera del arroz.

Análisis de varianza							
<i>Fuente</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>de</i>	<i>Media de los cuadrados</i>	<i>de</i>	<i>los</i>	<i>Razón F</i>
Modelo	11	22.055378		2.00503			4.6563
Error	114	49.089666		0.43061			Prob > F
C. Total	125	71.145044					<.0001

Prueba de efectos							
<i>Fuente</i>	<i>N parámetros</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>de</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>de</i>	<i>Razón F</i>	<i>Prob > F</i>
Ciclo de Cultivo	1	1		2.975785		6.9106	0.0097
Fase fenológica	2	2		0.387545		0.45	0.6388
Sección de la rizósfera	2	2		0.898724		1.0435	0.3555
Dilución	6	6		17.793325		6.8869	<.0001

Dilución

<i>Nivel</i>			<i>Media</i>
10-2	A		1.777778
10-1	A		1.5
10-3	A		1.5
10-4	A	B	0.666667
10-5		B	0.277778
10-6		B	0.277778

En el Tabla 5 se observa que la dilución 10^{-2} aportó la mayor cantidad de hongos aislados de la rizósfera del arroz, mientras que en el segundo ciclo se aisló la mayor cantidad de hongos rizosféricos.

Tabla 5.*Estimación de parámetros-Prospección de hongos rizosféricos.*

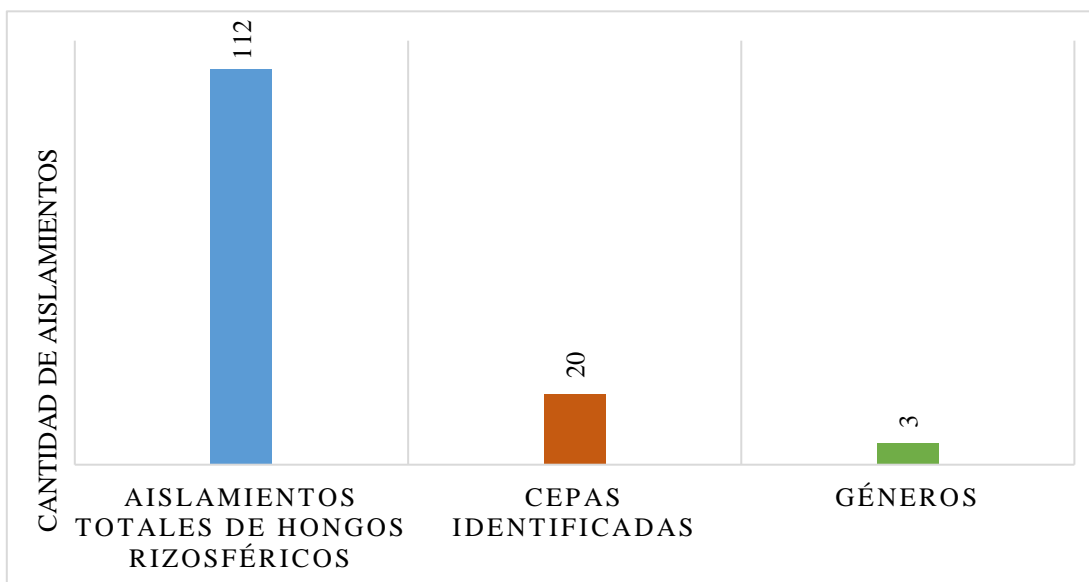
<i>Término</i>	<i>Estimación</i>	<i>Error estándar</i>	<i>Razón t</i>	<i>Prob > t </i>
Constante del modelo	0.5694257	0.05846	9.74	<.0001
Ciclo de cultivo [Primer ciclo]	-0.153679	0.05846	-2.63	0.0097
Fase fenológica[floración]	0.0338668	0.082675	0.41	0.6828
Fase fenológica[maduración]	0.0443316	0.082675	0.54	0.5929
Sección de la rizósfera[raíz]	-0.119438	0.082675	-1.44	0.1513
Sección de la rizósfera[suelo]	0.059971	0.082675	0.73	0.4697
Dilución [10 ⁻¹]	0.3966245	0.143197	2.77	0.0066
Dilución [10 ⁻²]	0.4982038	0.143197	3.48	0.0007
Dilución [10 ⁻³]	0.3722066	0.143197	2.6	0.0106
Dilución [10 ⁻⁴]	-0.141273	0.143197	-0.99	0.3259
Dilución [10 ⁻⁵]	-0.356735	0.143197	-2.49	0.0142
Dilución [10 ⁻⁶]	-0.356735	0.143197	-2.49	0.0142

Podemos señalar que posiblemente la materia orgánica desempeña un papel relevante en la cantidad y diversidad de géneros fungicos aislados de la rizósfera, debido a que los hongos utilizan la materia orgánica en descomposición como fuente de energía, un % MO bajo puede influir directamente en el desarrollo de los mismo. Castellano (2002) señaló que en suelos en donde la carencia de materia orgánica es alta, la extracción de microorganismos por medio de las trampas de arroz es muy baja.

De los 112 aislamientos, 20 cepas se lograron identificar como antagonistas significativos de *P. oryzae*, agrupados en 3 géneros (Figura 1).

Figura 1.

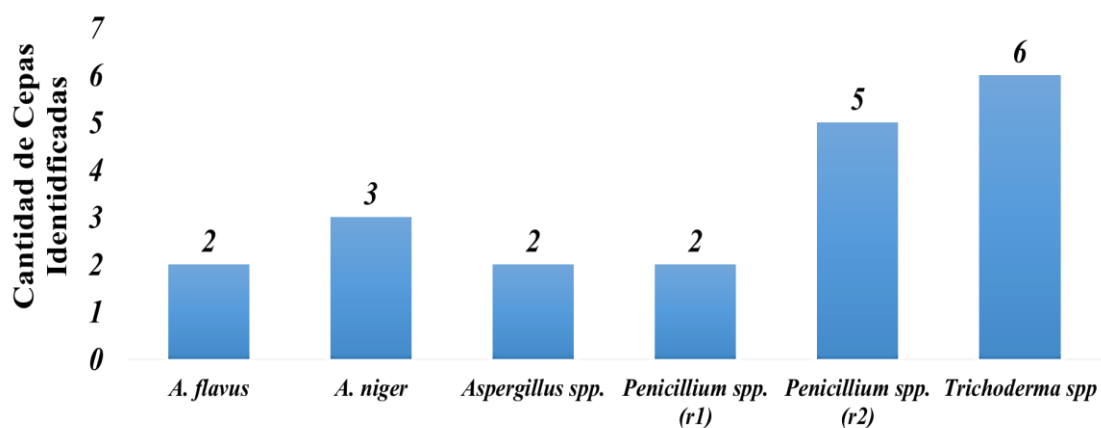
Prospección de hongos rizosféricos aislados. En total se lograron aislar 112 cepas fúngicas.



Del género *Aspergillus*, 2 cepas corresponden a *A. flavus*, 3 a *A. niger*, 2 a *Aspergillus spp.*; del género *Penicillium*, 2 cepas corresponden a *P. sp (morfo tipo r1)*, 5 a *P. spp. (morfo tipo r2)* y 6 cepas corresponden al género *Trichoderma spp.* (Figura 2).

Figura 2.

Géneros fúngicos con capacidad antagonica contra P. oryzae.



El R cuadrado ajustado (Tabla 6) nos indica que las variables involucradas en el modelo para las pruebas de antagonismo *in vitro*, explican en un 23% la inhibición del patógeno, por parte de los géneros fúngicos aislados en la rizósfera del arroz.

Tabla 6.

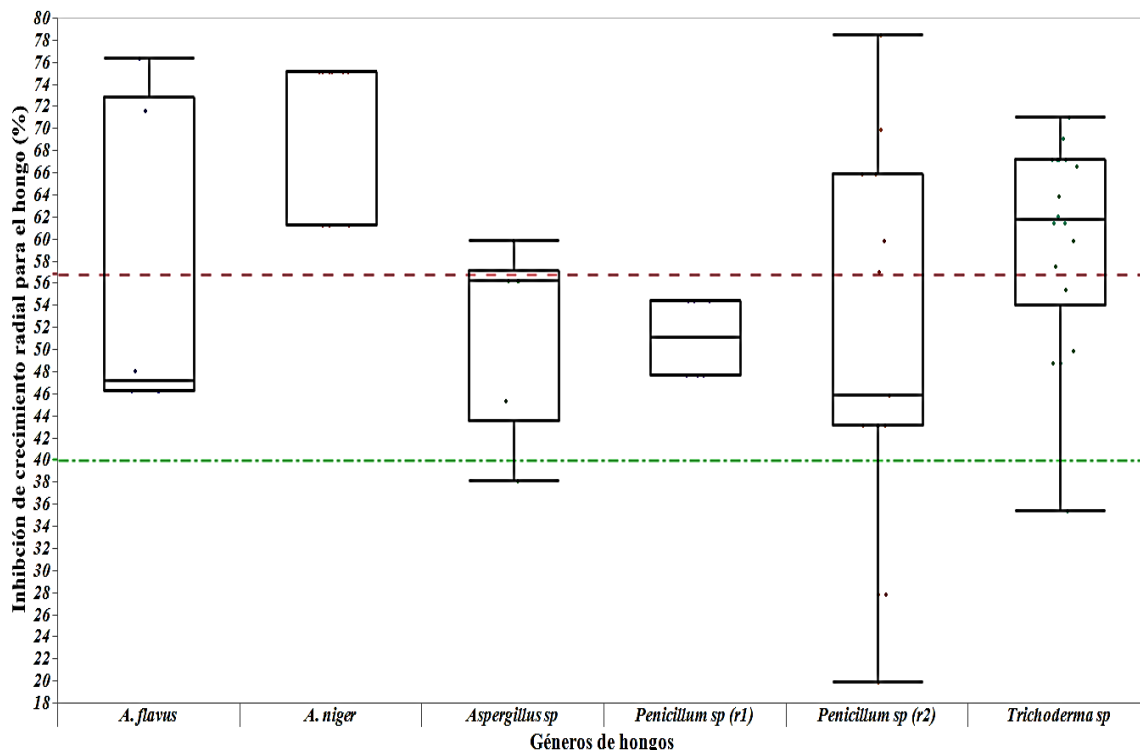
Análisis de varianza de 1 Factor

R cuadrado	0.301051
R cuadrado ajustado	0.236333
Raíz del error cuadrático medio	11.56835
Media de respuesta	56.87277
Observaciones (o suma de pesos)	60

En el gráfico caja barra (Figura 3) se observa que una de las cepas del género *Trichoderma spp*, posee la mediana por arriba del valor promedio (56.87) por lo que correspondería a la cepa con mejor poder inhibitorio.

Figura 3.

Diagrama de caja barras de las cepas identificadas. La línea roja representa el promedio del PCIR para las cepas con capacidad antagonica a P. oryzae. La línea verde corresponde al criterio utilizado para seleccionar los hongos como antagonistas positivos (PCIR ≥ 40 %).



Para comprobar lo mencionado, se efectuó un análisis de varianza (Tabla 7), para los valores de % de inhibición (a los 8 días) entre las cepas identificadas con capacidad antagonista frente a *P. oryzae*, observando que el porcentaje de inhibición promedio más elevado entre las cepas pertenece al género *A. niger*, siendo este, el género fúngico que en promedio actúa como mejor antagonista del patógeno *P. oryzae*.

Tabla 7.

Análisis de varianza-Cepas fúngicas identificadas con capacidad antagonista.

<i>Fuente</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Media de los cuadrados</i>	<i>Razón F</i>	<i>Prob > F</i>
Género 1	5	3112.649	622.53	4.6518	0.0013
Error	54	7226.642	133.827		
C. Total	59	10339.291			

<i>Nivel</i>	<i>Número</i>	<i>Media</i>	<i>Error estándar</i>	<i>Extremo inferior del IC al 95%</i>	<i>Extremo superior del IC al 95%</i>
<i>A. flavus</i>	6	55.9594	4.7228	46.491	65.428
<i>A. niger</i>	9	70.6723	3.8561	62.941	78.403
<i>Aspergillus spp.</i>	6	52.1212	4.7228	42.653	61.59
<i>Penicillium spp.</i>	6	51.1818	4.7228	41.713	60.65
<i>(R1)</i>					
<i>Penicillium spp.</i>	15	49.2386	2.9869	43.25	55.227
<i>(R2)</i>					
<i>Trichoderma spp.</i>	18	60.1201	2.7267	54.653	65.587

Se realizó la prueba de Tukey-Kramer (Tabla 8) para comparar el promedio de inhibición de los géneros identificados a los 8 días de enfrentamiento, resultando *A. niger*, *Trichoderma sp* y *A. flavus* con poder inhibitorio similares, diferenciándose del resto de las cepas.

Tabla 8.

Prueba de Tukey Kramer para las cepas fúngicas identificadas.

Nivel			Media
	<i>A. niger</i>	A	70.672269
	<i>Trichoderma spp.</i>	A B	60.120133
	<i>A. flavus</i>	A B	55.959384
	<i>Aspergillus spp.</i>	B	52.121212
	<i>Penicillium spp. (R1)</i>	B	51.181818
	<i>Penicillium spp. (R2)</i>	B	49.23861

Los géneros identificados con potencial antagonico frente a *P. oryzae*, son similares a los géneros fúngicos aislados del suelo reportados en varias publicaciones. Arias y Piñeros, (2008), observaron que, en los suelos evaluados, los aislamientos más comunes de hongos pertenecían al género *Penicillium spp.* y *Aspergillus spp.* Por su parte Pacasa-Quisbert, (2017), aislaron 44 especies de hongos filamentosos de suelo, el género *Penicillium* fueron los más abundantes (8), seguido de *Alternaria* (3) *Rhizopus* y *Mucor* (1), *Fusarium* (1) y *Trichoderma* (1).

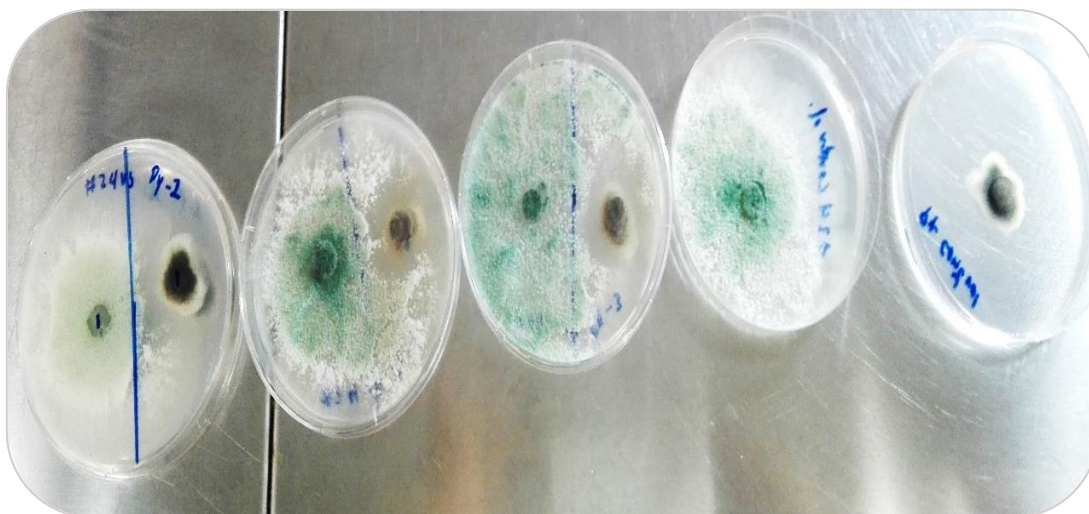
Desde los géneros identificados que inhiben el crecimiento de *P. oryzae*, podemos mencionar que el género *Trichoderma spp.* es uno de los más estudiados como controlador biológico de fitopatógenos de importancia agrícola. Las especies del género *Trichoderma spp.*, se destacan entre las más utilizadas para el biocontrol de patógenos fúngicos (Infante *et al.*, 2009).

La aplicación de materia orgánica y *Trichoderma sp* en 7 variedades de arroz, sembrados fuera de la época de siembra (febrero), para evaluar la incidencia de *B. glumae*, se obtuvieron los mejores rendimientos promedios, cuando se hizo aplicación de *Trichoderma* al suelo. Igualmente se encontró que la incidencia de la bacteria fue menor en el tratamiento de *Trichoderma* + materia orgánica esto debido a que el hongo *Trichoderma* ejerce un efecto antagonico sobre patógenos del suelo como *Rhizoctonia* y *Sarocladium*, favoreciendo la sanidad y vigor de la planta de arroz (Castellano, 2002).

En promedio las cepas del género *Trichoderma* inhibieron el crecimiento de *P. oryzae* (Figura 4) en un 60% a los 8 días de observación. En este sentido, Pérez y Chamorro (2012), hicieron referencias respecto al antagonismo de *T. harzianum* sobre *P. grisea* manifestando que a las 96 h la cepa alcanzó un PICR del hongo fitopatógeno de 93.1 % y a partir de las 120 h se alcanzó un 100 % de capacidad antagonica.

Figura 4.

Prueba de antagonismo *in vitro* *Trichoderma* spp. vs *P. oryzae*. Observación a los 5 días. De izquierda a derecha: Réplica 1, Réplica 2, Réplica 3; Control 1; Control 2.



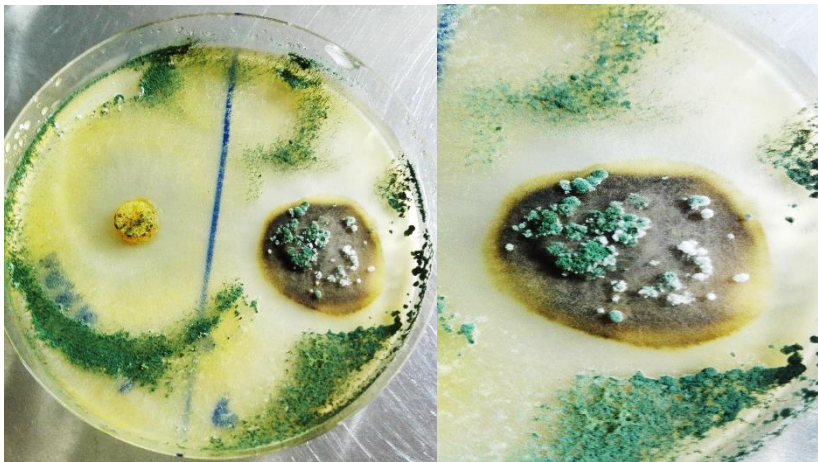
Podemos inferir que los mecanismos de acción de las cepas de *Trichoderma* spp, aisladas de la rizósfera del arroz es por competencia y micoparasitismo, ya que se observó la reducción de espacio por parte de *Trichoderma* spp, posiblemente al aprovechar los nutrientes del medio de cultivo más eficientemente por contar con una velocidad de crecimiento mayor. Infante *et al.* (2009), sostiene que *Trichoderma* está biológicamente adaptado para una colonización agresiva de los sustratos y en condiciones adversas para sobrevivir, fundamentalmente, en forma de clamidosporas. La alta velocidad de crecimiento, abundante esporulación y la amplia gama de sustratos sobre los que puede crecer, debido a la riqueza de enzimas que posee, hacen que sea muy eficiente como saprófito y aún más como agente de control biológico.

De igual forma, se observó la colonización de *P. oryzae* por esporas de *Trichoderma* spp. (Figura 5), quien posiblemente utiliza las enzimas extracelulares generadas por el

fitopatígeno. Infante *et al.* (2009) indica que *Trichoderma* durante el proceso de micoparasitismo crece quimiotrópicamente hacia el hospedante, se adhieren a las hifas de este, se enrollan en ellas frecuentemente y las penetran en ocasiones. La degradación de las paredes celulares del hospedante se observa en los estados tardíos del proceso parasítico, que conlleva al debilitamiento casi total del fitopatígeno.

Figura 5.

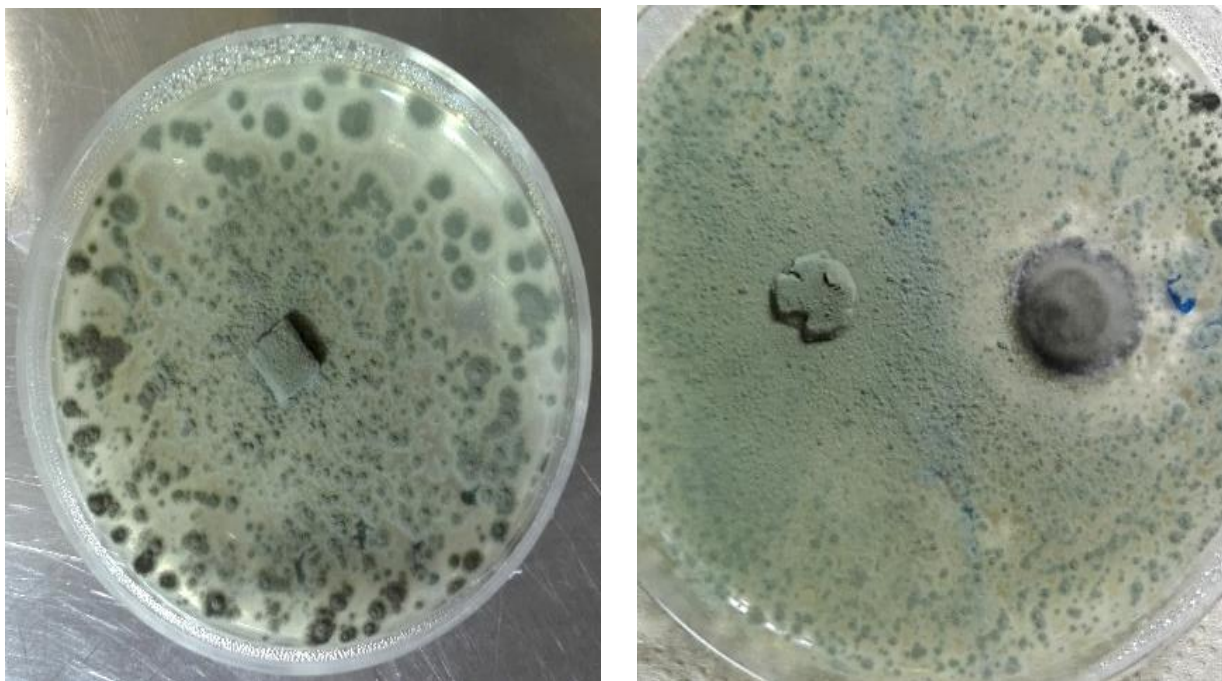
Micoparasitismo de Trichoderma sp. sobre P.oryzae.



Se obtuvieron dos cepas fúngicas del género *Penicillium* (Figura 6 y 7), identificadas como *Penicillium spp. (morfotipo r1)* con un PCIR a los 8 días de 47% y formaba micelio polvoriento y *Penicillium spp. (morfotipo r2)* formando micelio con apariencia algodonosa y con un PCIR de los 8 días de 51%. Ambas cepas de *Penicillium spp.* en los enfrentamientos duales frente a *P. oryzae* (Figura 6 y 7) mostraron un crecimiento/ desarrollo superior al fitopatígeno por lo que posiblemente el mecanismo de acción sea por competencia de nutrientes.

Figura 6.

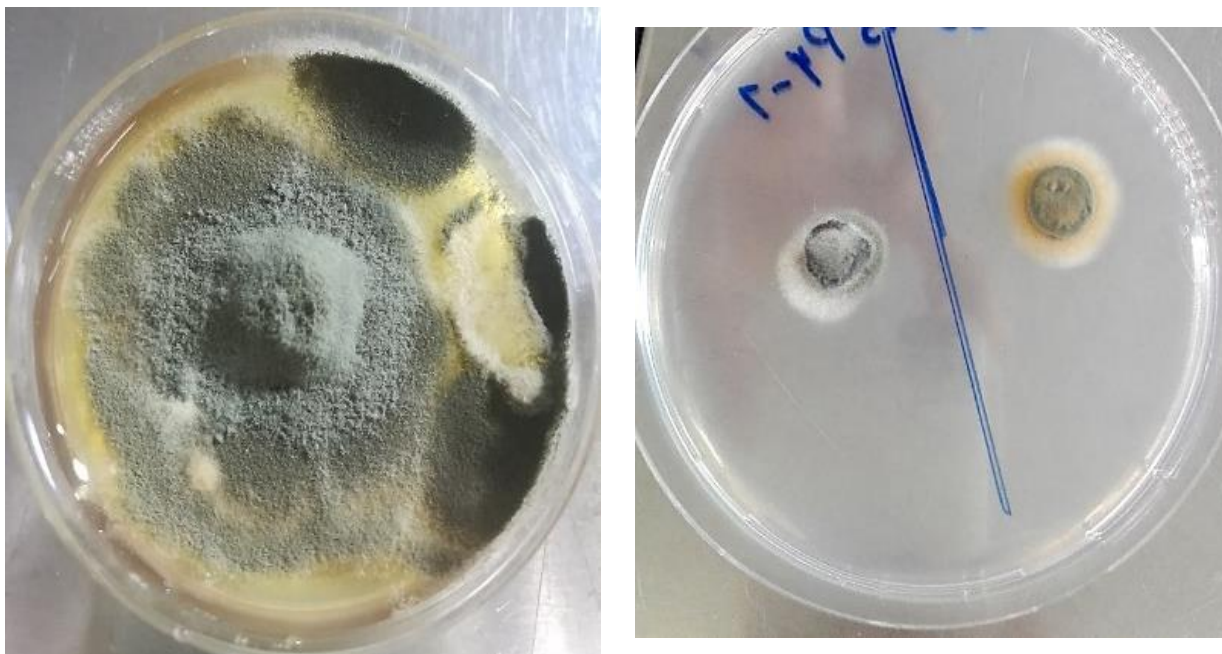
Izquierda: Cepa de *Penicillium spp.* (r1) apariencia polvorienta. Derecha: Enfrentamiento dual frente *P. oryzae* a los 8 días de observación.



La mayoría de las especies del género *Penicillium spp.*, destacan, principalmente, porque son hongos de almacén. Son los causantes de las “podredumbres azules o verdes” en cítricos, frutos de hueso y de pepita, uvas, melones, higos, cebollas, y hortalizas en general. No obstante, se pueden destacar trabajos realizados por el INIA de Madrid, sobre una cepa de *P. oxalicum* que actúa como antagonista de distintas cepas de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* que causan la fusariosis vascular del tomate. Respecto al efecto bicontrolador de *Penicillium*, en ellas se demuestra que *P. oxalicum* es capaz de inhibir el crecimiento de *Fusarium oxysporum f.sp. lycopersici* en estudios “*in vitro*” de crecimiento dual, al producir enzimas líticos que degradan la pared celular del patógeno (Infante *et al.*, 2009).

Figura 7.

Izquierda: Cepa de Penicillium spp. (r2). Apariencia algodonosa. Derecha: Enfrentamiento dual frente P. oryzae a los 3 días de observación



Castellano (2002), señala que mundialmente el género *Penicillium spp*, se ha utilizado muy poco como control biológico, a pesar, de que se ha comprobado que *P. notatum* era antagonista efectivo de *Sclerotium rolfsii* tanto en suelo natural como en condiciones de campo. Del género *Aspergillus*, el promedio de PCIR para las cepas *Aspergillus spp.* (Figura 8) fue de 52% a los 8 días de observación, mientras que para *A. flavus*, el PCIR fue de 56% y para *A. niger* (Figura 8) de 71%.

Figura 8.

Cepa de Aspergillus spp. Cepa de A. flavus. Cepa de A. niger, respectivamente.

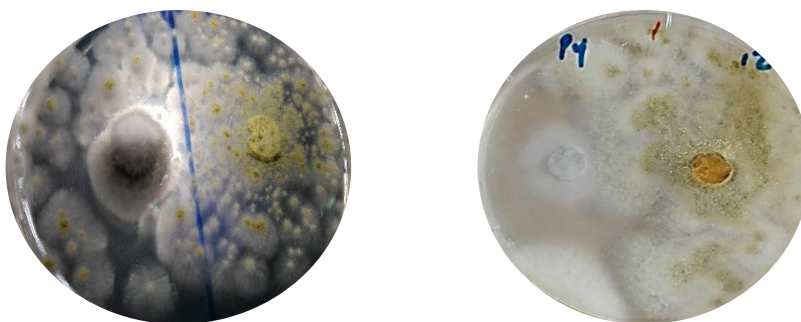


Barrera (2015) aisló posibles antagonistas fúngicos de cuatro diferentes lugares de Río Grande do Sul en Brasil, identificando cuatro géneros: *Trichoderma*, *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*. A su vez sostiene que el género *Aspergillus* tiene alta capacidad de colonización y competitividad con otras especies a nivel de suelo producto de su amplia dispersión tanto en la zona de las rizósfera como en el rizoplano de las plantas.

Para el caso de *Aspergillus spp.* (Figura 9) no se observó micelio de estos colonizando a *P. oryzae*, pero se evidenció la invasión de espacio del patógeno por parte de los biocontroladores, por los que podemos deducir que el mecanismo de acción de estos hongos rizosféricos fue por competencia de nutrientes o bien por antibiosis.

Figura 9.

Derecha: Enfrentamiento dual de cepa Aspergillus spp. vs P. oryzae. Izquierda: Enfrentamiento dual de cepa Aspergillus flavus vs P. oryzae.



Castellano (2002), hace referencia a estudios realizados en Venezuela, señalando que en la zona de la rizósfera y rizoplano de plantas de tabaco *A. flavus*, *A. candidus*, *A. terreus*, *A. niger*, y *A. ustus*. Estos mismos autores en su estudio, no descartan la posibilidad de que tanto *A. terreus* como *A. flavus* tengan posibilidades antagónicas sobre algunas especies del complejo *Fusarium* y *Rhizoctonia sp.*

CONCLUSIONES

- En cuanto a el total de hongos aislados de la rizósfera (112), se observó que existieron diferencias significativas entre los ciclos de cultivo y las diluciones empleadas, mientras que no existieron diferencias significativas entre las distintas secciones de la rizósfera y las fases fenológicas.
- En total 20 cepas fúngicas presentaron un porcentaje de inhibición significativo ($\geq 40\%$) ante el fitopatógeno *P. oryzae*. Agrupadas en tres géneros: *Trichoderma spp.*, *Penicillium spp.* (morfofoto r1) y *Penicillium spp.* (morfofoto r2), *Aspergillus spp.*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*.
- El suelo agrícola tomado como referencia en la prospección de microorganismos nativos, alberga cepas microbianas antagónicas de efectividad contra los patógenos evaluados, dentro de los que consideramos a *Trichoderma spp.*

RECOMENDACIONES

- Se sugiere incluir dentro de los planes de manejo de plagas fúngicas en arroz, el uso y aprovechamiento de microorganismos rizosféricos con actividad biológica antagonista que permitan alcanzar un balance entre rendimiento y rentabilidad para este cultivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aproscello, J. (2013). Ficha de Información sobre la especie *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr.
- Arias, E., Piñeros, P. (2008). Aislamiento e identificación de hongos filamentosos de muestra de suelo de los páramos de Huasca y Cruz Verde. Tesis de Grado. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
- Awa, O., Oguntade, O. (2015). Molecular Identification of Fungal Species Associated with Mango Anthracnose in Southwest Nigeria. *Journal of Agriculture and Environmental Science* 2, 99-103

- Ministerio de Desarrollo Agropecuario (MIDA). (2015). Carta Tecnológica Del Cultivo De Arroz A Chuzo Con Tecnología Para Variedades De Ciclo Corto De 100-110 Días. Panamá: Dirección Nacional de Agricultura-MIDA.
- Barrera, A. (2015). Control químico del manchado de grano de la variedad de arroz INIAP 15 En La Provincia De Los Ríos. Universidad Católica de Santiago de Guayaquil, Ecuador, 9.
- Castellano, L. (2002). Prospección de hongos antagonistas en la provincia de Cienfuegos. Universidad de Pamplona.
- Chaves, M. (2016). Comunicación oral. Metodología para el enfrentamiento *in vitro* de hongos.
- Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). (2009). Plan De Acción Para La Competitividad De La Cadena De Arroz De Panamá: Hacia un mecanismo de reconocimiento de la calidad. Plan De Acción Para La Competitividad De La Cadena De Arroz De Panamá. San José, Costa Rica.
- Infante, D., González, N., Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma sp*, frente a hongos fitopatógenos. Revista de Protección Vegetal, 24(1), 14-21.
- Pacasa-Quisbert, F. (2017). Recursos Genéticos de hongos. Journal of the Selva Andina Biosphere 16:1.
- Pérez, C., Chamorro, A. (2012). Bacterial Endophytes: An Alternative Biological Control In *Burkholderia glumae* Rice In Colombia. Revista Colombiana de Ciencia Animal-REICA, 4(1), 172-184
- Quesada, A., García., F. (2014). *Burkholderia glumae* In the Rice Crop In Costa Rica. 25(2), 371-381.
- Quirós, K., Montero, K., Vega, C., Madriz, J., Mendez, W. (2014). Evaluación del Antagonismo De *Trichoderma sp.* y *Bacillus subtilis* Contra Tres Patógenos Del Ajo. Revista Tecnología en Marcha, 27(2), 89-91.
- Rodríguez, J. (2016). *Magnaporthe oryzae*, Un Hongo de Difícil Control y de Efectos Devastadores en Nuestros Cultivos de Arroz. Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas UPM-INIA. Parque Científico y Tecnológico de la UPM.
- Yau, J. (2016). Comunicación Oral. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá.