



TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

Modalidad: Tesina

Alumna: Solis, Valentina Eva.

Docente Asesor: Ing. Agr. (Dra.) Susana A. Gutiérrez.

Título: Evaluación *in vitro* de aislados de *Trichoderma* sp. sobre *Sclerotium oryzae*, agente causal de la podredumbre del tallo de arroz.

RESUMEN

El arroz (*Oryza sativa*) constituye un cultivo de importancia económica regional en la provincia de Corrientes; puede ser afectado por enfermedades causadas por hongos, entre las cuales la podredumbre del tallo, causado por *Sclerotium oryzae* puede alcanzar niveles de incidencia desde 0,5 a 80 % y 100% de prevalencia. Las medidas de control de la enfermedad, comprenden el uso de prácticas culturales, fungicidas y el control biológico, siendo este último recomendado principalmente para hongos habitantes de suelo. Por ello, el objetivo de este trabajo fue evaluar la capacidad antagónica de un hongo biocontrolador (*Trichoderma* sp.) sobre el crecimiento del patógeno (*S. oryzae*), mediante la técnica de cultivos duales, antibiosis y micoparasitismo. Se analizaron aislados del patógeno, aislados del antagonista nativos de suelos de Corrientes y un formulado comercial mediante la técnica de cultivos duales, antibiosis y micoparasitismo *in vitro*. La evaluación del antagonismo se realizó calculando el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR). Todos los aislados de *Trichoderma* sp. lograron inhibir al patógeno en un 50% o más, como es el caso del aislado T1 que alcanzó un porcentaje de inhibición del 61%. En cuanto al efecto antibiótico, los porcentajes de inhibición calculados se ubicaron en el rango de 20 a 35%. Para evaluar cualitativamente la competencia por espacio se utilizó la escala de Bell et al. (1982), ubicando a todos los aislados en la clase 2 de la misma. En relación al micoparasitismo del antagonista, se observó lisis, penetración y enrollamiento sobre el patógeno. Los aislados nativos de *Trichoderma* sp. fueron tan eficaces como el producto ya aprobado para la venta (Rizoderma), debido a que no se observaron diferencias significativas estadísticas entre ellos en las mediciones realizadas al evaluar los diferentes mecanismos de acción del antagonista.

INTRODUCCIÓN y ANTECEDENTES

El arroz, *Oryza sativa*, pertenece a la familia de las Poáceas y es un cereal base para la alimentación de cientos de millones de habitantes del planeta; en el mundo se cosechan cerca de 160 millones de hectáreas, que producen aproximadamente 700 millones de toneladas de arroz cáscara. Los países que destinan mayor superficie a la producción de arroz, son también los principales consumidores del cereal (promedio mundial de consumo per-cápita 57,4 kg de arroz blanco/persona/año aproximadamente, existiendo países que alcanzan los 200 kg/persona/año), siendo por ello el mercadeo internacional solo del 8-10% del total de la producción. El consumo per cápita de arroz en la Argentina es muy bajo (7 kg de arroz blanco/persona/año), lo que significa que con el 25% de la producción nacional es suficiente para cubrir el mercado interno, pudiéndose destinar el 75% restante al comercio internacional (ACPA, 2018).

De las 23 provincias que conforman la República Argentina, sólo 5 siembran una superficie considerable de arroz, produciendo un total aproximado de 1.400.000 Tn anuales. La superficie total sembrada en el país es de 200.000 has aproximadamente (campaña 2017/2018), que se ubican principalmente en Corrientes (90.000 has) y Entre Ríos (70.000 has). Por su parte, Santa Fe ronda las 30.000 has, seguida de Formosa (7.000 has) y Chaco (4.000 has) (CREA, 2018).

La provincia de Corrientes es la principal productora de arroz de Argentina, constituyendo un cultivo de importancia económica regional (ACPA, 2018).

Las grandes extensiones de los arrozales y la lámina de agua permanente, son factores que dificultan el monitoreo de las enfermedades, motivo por el cual sus efectos pueden pasar inadvertidos, y el rendimiento del cultivo disminuir significativamente si no se las controla a tiempo. Para obtener un control adecuado de las mismas, es necesario un conocimiento previo de sus síntomas, daños, agentes causales, ciclo y condiciones ecológicas (Gutiérrez y Cúndom, 2013). El cultivo de arroz puede ser afectado por numerosas enfermedades, entre las cuales aquellas producidas por hongos habitantes del suelo, son consideradas prevalentes en las diferentes regiones de producción de Argentina, y asimismo, pueden presentarse con valores importantes de incidencia y/o severidad. Entre éstas, se destacan la podredumbre del tallo, cuyo agente causal es *Magnaporthe salvinii* (Catt.) Krause y Webster (teleomorfo), *Nakataea sigmoidea* (Cav.) Hara (anamorfo conídico), *Sclerotium oryzae* Cav. (anamorfo esclerótico) y el manchado de vainas foliares, causadas por un complejo de especies del género *Rhizoctonia* (Duarte et al., 2009; Gutiérrez y Cúndom, 2008, 2013; Gutiérrez et al., 2017).

En relación a la presencia de la podredumbre del tallo en la provincia de Corrientes, los trabajos realizados por Cúndom et al. (2008) y Gutiérrez et al. (2017) señalan que la misma puede alcanzar niveles de incidencia desde 0,5 a 80 % y 100% de prevalencia. Esta situación indicaría la importancia que representa esta enfermedad para la producción de arroz, la cual se agrava considerando que el agente causal es un habitante de suelo.

Con respecto a los síntomas de la enfermedad, éstos se manifiestan a partir del estadio de macollaje del cultivo, como pequeñas manchas negras, irregulares que afectan superficialmente las vainas inferiores, a la altura o ligeramente por encima del agua de riego. A medida que la infeción progresá, estas lesiones se agrandan y profundizan, invadiendo los tejidos del interior de los tallos, observándose muerte progresiva de vainas y hojas hacia la parte superior de las plantas (Fig. 1) (Ávila, 2000; Ou, 1985).

Los efectos de la enfermedad sobre el cultivo, se debe a que el follaje de la planta de arroz va muriendo desde la base hacia el ápice de la misma, finalizando por la hoja bandera; en las panojas, la maduración de los granos se retarda. Asimismo, a la altura de las lesiones los tallos pierden consistencia, se secan, se quiebran un poco por encima de la línea de agua y se vuelcan, originando pérdidas en rendimiento y disminución de la calidad de molienda, debido al carácter liviano y yesoso del grano (Ou, 1985; Webster y Gunnell, 1992). En esta etapa, ya se observan los esclerocios del hongo en el interior de los tallos y tejidos enfermos (Fig. 2). A la siguiente cosecha, cuando se establece la inundación permanente, los esclerocios que sobrevivieron en el suelo y/o rastrojos, flotan, se trasladan por el agua de riego y al entrar en contacto con las vainas foliares de la planta de arroz, germinan, penetran e invaden los tejidos (Ávila, 2000; Ou, 1985; Webster y Gunnell, 1992).

Entre los factores predisponentes más importantes para que ocurra la enfermedad, se citan las heridas, las condiciones de nutrición, principalmente con respecto a N, P y K, y la edad de las plantas (Ou, 1985; Webster y Gunnell, 1992).



Figura 1. Síntomas iniciales y avanzados característicos de la enfermedad podredumbre del tallo de arroz.



Figura 2. Esclerocios maduros y micelio del patógeno en restos del cultivo.

Con respecto a las medidas de control de la enfermedad, la bibliografía menciona la realización de prácticas culturales (densidad de siembra, manejo del rastrojo y de la fertilización), la utilización de fungicidas y el control biológico (Bhuvaneswari et al., 2014; Gopika et al., 2016; Nishant y Smita, 2013; Prameela et al., 2018; Pedraza et al., 2008). Considerando éste último, el biocontrol según lo definen Cook y Baker (1983), "es la reducción de la densidad de inóculo o de las actividades de un patógeno que produce una enfermedad, ya sea en su estado activo o latente, mediante uno o más organismos, lograda en forma natural o a través del manejo de las condiciones ambientales, del hospedante o de los antagonistas autóctonos, o por la introducción de uno o más microorganismos antagonistas". Entre los agentes biocontroladores se mencionan a hongos, bacterias y virus los cuales pueden ser seleccionados y re-aplicados en concentraciones mayores y en momentos oportunos para que ejerzan su acción antagonista (Danay Infante et al., 2009; Gopika et al., 2016; Martínez et al., 2008; Mondino y Vero, 2006).

Al respecto, las especies del género *Trichoderma* han sido ampliamente estudiadas por sus efectos como agente de control biológico de hongos fitopatógenos, en condiciones de invernáculo y a campo, mostrando buenas cualidades debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, y también a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos. Estos hongos basan sus propiedades antagonistas en la activación de mecanismos muy diversos, tales como competencia por nutrientes y espacio, secreción de diversos antibióticos y micoparasitismo (Danay Infante et al., 2009; Martínez et al., 2008; Mondino y Vero, 2006; Stocco, 2014). Al respecto, Bell et al. (1982) recomiendan la selección de antagonistas contra una enfermedad específica y la evaluación de mezclas de antagonistas para amplias aplicaciones.

En relación al arroz, existen antecedentes a nivel mundial que consideran al control biológico como una práctica factible de control de enfermedades, principalmente para aquellas causadas por patógenos de suelo. Respecto a *S. oryzae*, se pueden citar estudios realizados utilizando diferentes biocontroladores (hongos y bacterias) para reducir la enfermedad que ocasiona este hongo (Bhuvaneswari et al., 2014; Devi et al., 2012; Gopika et al., 2016; Nagam et al., 2015; Nishant y Smita, 2013; Shamim y Singh, 2017). Por ejemplo, Nishant y Smita (2013), observaron que aislados de *Trichoderma* sp. probados contra *S. oryzae* *in vitro*, inhibieron significativamente el crecimiento radial del patógeno a través de la producción de compuestos volátiles; mientras que Gopika et al. (2016), utilizaron a *T. viride* y a *Pseudomonas fluorescens* logrando la inhibición del crecimiento micelial de *S. oryzae* entre 75,3% y 77,2%. Por su parte, Bhuvaneswari et al. (2014), registraron 64,81% y 66,67% de inhibición sobre el patógeno al realizar un experimento similar.

Considerando al género *Trichoderma* en particular, Dennis y Webster (1971 a; 1971 b), expresan que el nivel de control de un patógeno puede variar de acuerdo con la cepa utilizada y con su adaptabilidad a las condiciones bióticas y abioticas específicas, dentro y entre especies de dicho hongo.

En Argentina, los antecedentes relacionados al tema de tesis desarrollado, son escasos; al respecto, se puede mencionar lo realizado por Pedraza et al. (2008), quienes aseguran que el uso de *Pseudomonas fluorescens* sería una alternativa ecológicamente sustentable para el manejo integrado de la podredumbre del tallo. Estos autores detectaron una disminución del índice de grado de severidad de 60-80% y 55%, a los 76 dds (principio de emergencia de panoja) y 94 dds

(floración), respectivamente; y disminuciones de la incidencia de la enfermedad de 57-75% y 30% a los 76 dds y 94 dds, respectivamente.

Por lo expuesto, este trabajo se realizó a fin de evaluar la capacidad antagónica de aislados del género *Trichoderma* sp. nativos de diferentes localidades de Corrientes, referentes en el cultivo de arroz y pertenecientes a lotes afectados por la podredumbre del tallo, de manera que éstas ya se encuentren adaptadas a las condiciones ambientales en las cuales deberán ejercer el control biológico sobre el patógeno en estudio.

OBJETIVO

Determinar la capacidad antagónica de aislados de *Trichoderma* sp. sobre el crecimiento de *Sclerotium oryzae*, mediante la técnica de cultivos duales, antibiosis y micoparasitismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de aislados de *Sclerotium oryzae*: se realizó por medio de las siembras *in vitro* de tejidos con síntoma de la enfermedad en medio de cultivo Agar Papa Glucosado (APG) 1,5%, previa desinfección en hipoclorito de sodio 1,5%. Se utilizaron muestras de tejidos enfermos procedentes de las localidades de Corrientes (Itá Ibaté, Mercedes) y Santa Fe (San Javier). Las cajas se incubaron en condiciones de laboratorio (25°C +/- 2°C; 12 hs luz/12 hs oscuridad) durante 10 días. De este modo se obtuvieron los aislados, los cuales se llevaron a tubos de ensayo con APG en pico de flauta (Couto Alfenas y Gonçalvés, 2007).

Obtención de aislados de *Trichoderma* sp.: se obtuvo por medio de la siembra de rastrojo de arroz con presencia visible de colonias características del antagonista (Fig. 3), procedentes de localidades de Corrientes (Itá Ibaté, Saladas y Perugorría). El procedimiento de la siembra *in vitro* fue similar a lo descrito anteriormente. Además, se utilizó un formulado comercial del antagonista denominado Rizoderma, como testigo comercial.



Figura 3. Colonias de *Trichoderma* sp. en rastrojos de arroz, material que fue sembrado para la obtención de aislados del antagonista.

Evaluación de la capacidad antagónica, para esta actividad se utilizaron las siguientes metodologías:

Cultivos duales: Consistió en la siembra equidistante y simultánea de discos de inóculo del patógeno y del antagonista, provenientes de colonias jóvenes de ambos hongos. Las cajas se incubaron bajo las mismas condiciones de laboratorio descrito anteriormente.

Esta técnica se utilizó para evaluar cuantitativa y cualitativamente competencia por espacio y también micoparasitismo.

Un factor esencial para que exista competencia es que haya "escasez" de un elemento, si hay exceso no hay competencia. Ésta hace referencia al desigual comportamiento de dos o más organismos ante un mismo requerimiento, siempre y cuando la utilización del mismo por uno de los organismos reduzca la cantidad disponible para los demás (Mondino y Vero, 2006).

Para evaluar cuantitativamente este mecanismo de acción, se realizaron mediciones del crecimiento radial del patógeno en cm a los 3, 6, y 9 días de iniciado el experimento. Sobre estos valores se aplicó el análisis estadístico correspondiente explicado detalladamente más adelante.

Para la evaluación cualitativa del mismo mecanismo de acción, se registraron los cambios de aspecto en las colonias de ambos hongos y a partir del análisis de esos datos, se ubicó a los aislados estudiados dentro de la escala propuesta por Bell et al., (1982), la cual consta de las siguientes clases:

Clase 1: Sobrecrecimiento de *Trichoderma* sp., que colonizó toda la superficie del medio y redujo la colonia del patógeno.

Clase 2: Sobrecrecimiento de *Trichoderma* sp., que colonizó al menos 2/3 de la superficie del medio.

Clase 3: *Trichoderma* sp. y patógeno colonizaron medio a medio (más que 1/3 y menos que 2/3), uno no se sobrepuso al otro.

Clase 4: Hongo patógeno colonizó al menos 2/3 de la superficie del medio y resistió la invasión por *Trichoderma* sp.

Clase 5: Sobrecrecimiento del hongo patógeno que colonizó toda la superficie del medio.

El micoparasitismo es la acción de un microorganismo parasitando a otro y puede ser definido como una simbiosis antagónica entre organismos. Generalmente, están implicadas enzimas extracelulares tales como quitinasa, celulasa, b 1,3-glucanasa y proteasa, que rompen las estructuras de los hongos parasitados. El parasitismo puede ocurrir mediante la penetración, engrosamiento de las hifas, producción de haustorios y desorganización del contenido celular (Fernández y Vega, 2001).

Para esta actividad, se tomaron muestras provenientes de la zona de contacto entre las colonias de los dos hongos (antagonista y patógeno) para determinar los tipos de interacción hifal (penetración, lisis y/o enrollamiento), y se observaron en microscopio óptico con aumento de 400x. Se utilizó azul de algodón para teñir las hifas de ambos microorganismos.

Antibiosis: se define como la inhibición o destrucción de un organismo por los productos del metabolismo del otro. La mayoría de las cepas de *Trichoderma* sp. producen compuestos volátiles y no volátiles tóxicos que impiden la colonización por otros microorganismos (Stocco, 2014).

Con el fin de estimar la capacidad fungistática y de actuar a distancia que posee el biocontrolador a través de la producción de metabolitos volátiles, se evaluó la presencia de dichos compuestos. Para ello, se realizó un co-cultivo del patógeno y del antagonista, en cajas de Petri con medio de cultivo. La metodología consistió en enfrentar dos fondos de cajas de Petri con APG, en el centro de la inferior se sembró un disco de 5 mm de la colonia de la cepa de *Trichoderma* sp. y en el centro superior, un disco de inóculo del patógeno (Fig. 4). Se realizaron mediciones del crecimiento radial del patógeno en cm a los 3, 6, y 9 días de iniciado el experimento. Sobre estos valores se aplicó el análisis estadístico correspondiente explicado detalladamente a continuación.

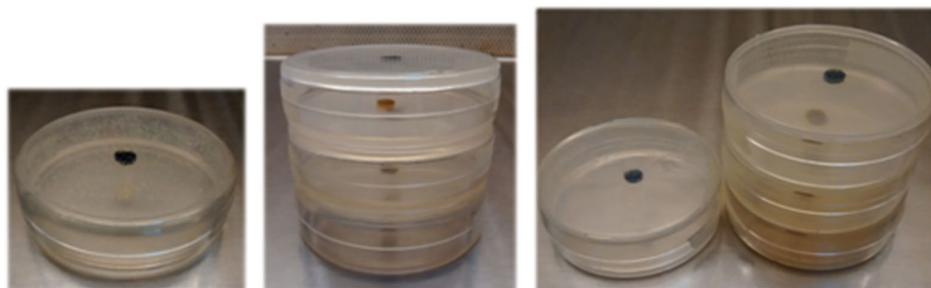


Figura 4. Detalle del testigo, tratamientos de una repetición, y una repetición completa con testigo y tratamientos correspondientes.

Análisis estadístico: En el caso de competencia por espacio y antibiosis, se aplicó un diseño completamente aleatorizado con 3 repeticiones, y como unidad experimental, una caja de Petri (8,5 cm de diámetro). El experimento se repitió tres veces. Como tratamientos, se consideraron a los aislados de *S. oryzae* enfrentados con *Trichoderma* sp. Se realizaron los testigos correspondientes con discos de APG estéril. Las observaciones se realizaron a los 3, 6, y 9 días, mediante mediciones del crecimiento radial de las colonias de *S. oryzae*. Sobre los valores de crecimiento radial de la colonia en cada tratamiento se efectuó un análisis de la varianza y prueba de Tukey para diferencia entre medias con P= 0.05, empleando para ello el software estadístico Infostat (2018).

Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) aplicando la fórmula de Skidmore y Dickinson (1976): PIC=[c1-c2/c1]X100, siendo c1= crecimiento radial del testigo y c2= crecimiento radial con tratamiento (Mondino y Vero, 2006; Martínez et al., 2008; Nagam et al., 2015; Nisham y Smita, 2013).

Las cajas se incubaron en oscuridad a 25 + 2º C y fotoperiodo de 12 hs luz/ 12 hs oscuridad durante 10 días.

RESULTADOS

Durante el trabajo desarrollado, se obtuvieron 4 aislados de *Sclerotium oryzae* a partir de tejidos enfermos de diferentes variedades de arroz, procedentes de las localidades de Itá Ibaté y Mercedes de la provincia de Corrientes, y San Javier de la provincia de Santa Fe; y 3 aislados del antagonista *Trichoderma* sp. nativos de las localidades de Itá Ibaté, Saladas y Perrugoría también de la provincia de Corrientes. Además se utilizó un formulado comercial de este biocontrolador denominado Rizoderma (Tabla 1).

Tabla 1. Aislados *in vitro* de *Sclerotium oryzae* y *Trichoderma* sp.

Aislados <i>in vitro</i>	Denominación	Procedencia	Variedad
<i>Sclerotium oryzae</i>	S1	San Javier, Santa Fe	TAIM
	S2	Itá Ibaté, Corrientes	TAIM
	S3	Itá Ibaté, Corrientes	IC 110
	S4	Mercedes, Corrientes	SC 121 CL
<i>Trichoderma</i> sp	T1	Saladas, Corrientes	IRGA 424
	T2	Itá Ibaté, Corrientes	SC 121 CL
	T3	Perugoría, Corrientes	SC 121 CL
	T4	Formulado comercial	RIZODERMA

Con respecto al patógeno, *S. oryzae* cultivado *in vitro* desarrolla colonias con micelio en parte sumergido, en parte superficial, blanco al principio, luego gris oscuro, reverso negro verdoso, de apariencia carbonosa a la madurez de los esclerocios (Fig. 5). En el hospedante, se observó la presencia de un micelio blanco en el interior del tallo, oliváceo en el exterior, formando numerosos apresorios irregulares sobre las vainas foliares. Inicialmente los esclerocios fueron blanco grisáceos, tornándose negros a la madurez, brillantes, lisos, globosos o subglobosos (Fig. 6); a veces cubiertos con una trama algodonosa de micelio blanco, de 180 a 250 µm, desarrollándose sobre sustratos naturales y en cultivo.

Por su parte, el agente biocontrolador, *Trichoderma* sp., en condiciones *in vitro* desarrolló colonias de aspecto algodonoso con micelio blanquecino al inicio, que se tornaron verde oscuro o amarillento con densa esporulación (Fig. 7). Se observó la presencia de conidióforos ramificados y verticilados, los conidios se encontraban agrupados en masas sobre fiálides que tenían forma de botella (Fig. 8).

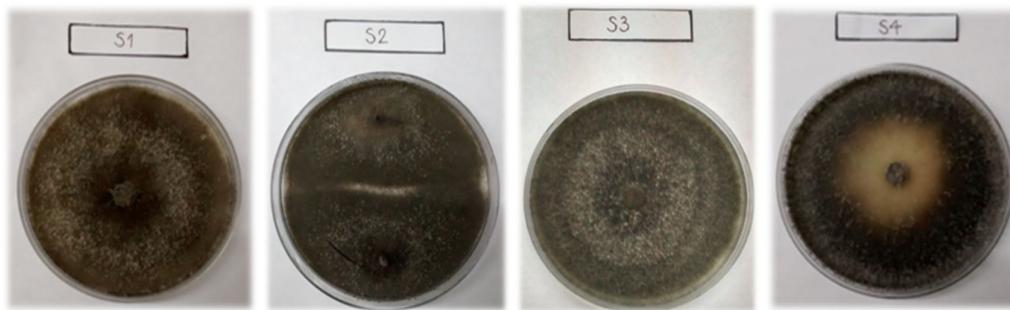


Figura 5. Aislados de *Sclerotium oryzae* desarrollados *in vitro*.

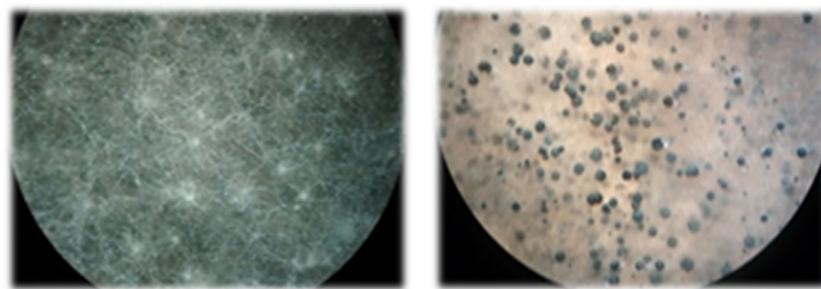


Figura 6. Esclerocios inmaduros (izq.) y maduros (der.) desarrollados en APG, vistos en lupa.

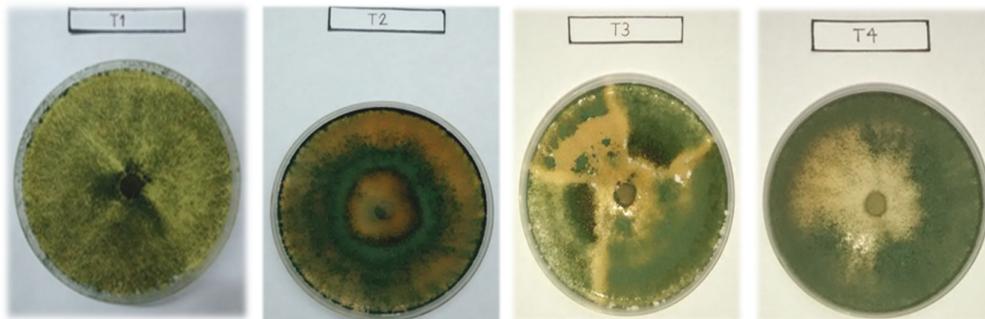


Figura 7. Aislados de *Trichoderma* sp., desarrollados *in vitro*.

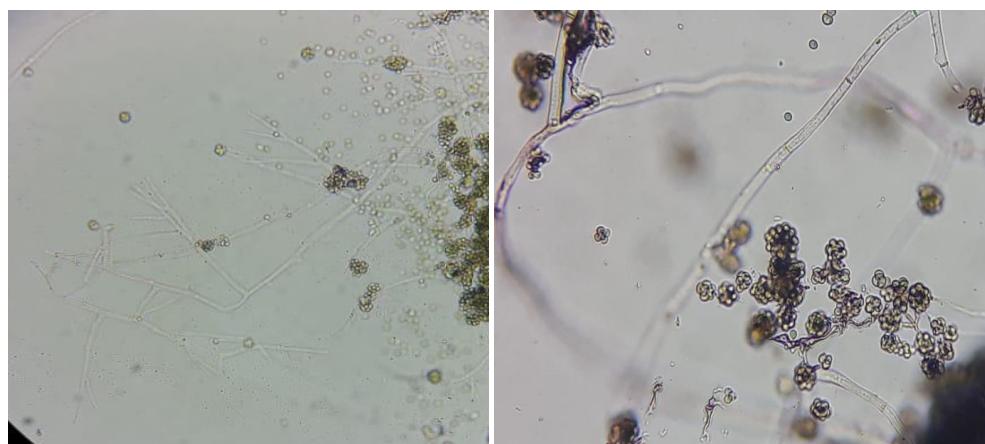


Figura 8. Conidióforos y conidios de *Trichoderma* sp. vistos al microscopio óptico (400x).

Al llevar a cabo la técnica de cultivos duales, se utilizaron todos los aislados antes mencionados, enfrentando todos los de *Trichoderma* sp. con cada aislado de *S. oryzae*. En la Tabla 2, se describen los tratamientos y sus respectivas combinaciones efectuadas.

Tabla 2. Tratamientos utilizados para evaluar competencia por espacio.

Número de Tratamiento	Tratamiento
1	<i>S1 + APG</i>
2	<i>S2 + APG</i>
3	<i>S3 + APG</i>
4	<i>S4 + APG</i>
5	<i>S1 + T1</i>
6	<i>S1 + T2</i>
7	<i>S1 + T3</i>
8	<i>S1 + T4</i>
9	<i>S2 + T1</i>
10	<i>S2 + T2</i>
11	<i>S2 + T3</i>
12	<i>S2 + T4</i>
13	<i>S3 + T1</i>
14	<i>S3 + T2</i>
15	<i>S3 + T3</i>
16	<i>S3 + T4</i>
17	<i>S4 + T1</i>
18	<i>S4 + T2</i>
19	<i>S4 + T3</i>
20	<i>S4 + T4</i>

En ésta prueba, al evaluar cuantitativamente la competencia por espacio, se observó que todos los aislamientos del antagonista disminuyeron el crecimiento radial del patógeno, diferenciándose estadísticamente de sus testigos respectivos recién a partir de la segunda medición realizada (Tabla 3). Es decir, que los aislados del biocontrolador necesitaron 6 días para ejercer un control evidente sobre el patógeno. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre dichos aislados en ninguna de las mediciones efectuadas. Los tratamientos 7 y 13 (que corresponden a los aislados T3 y T1 respectivamente) si bien no se diferenciaron entre sí, fueron los que presentaron mayor inhibición del crecimiento del patógeno (Fig. 9, Tabla 3).



Figura 9. Cultivos duales correspondientes a la primera, segunda y tercera medición del tratamiento 7 (*S1-T3*) (Testigo: caja de Petri ubicada en la zona superior; Tratamientos: cajas de Petri en la parte inferior).

Tabla 3. Promedios de crecimiento radial (cm) de *S. oryzae* en cultivo puro y en cultivo dual frente a *Trichoderma* sp. en la prueba de cultivos duales.

Número de tratamiento	Primera medición (a los 3 días)	Segunda medición (a los 6 días)	Tercera medición (a los 9 días)
1	4,24 abc *	6,19 bc	7,50 b
2	5,45 bc	7,24 c	7,95 b
3	5,72 c	7,26 c	8,11 b
4	4,73 abc	7,23 c	8,50 b
5	3,22 a	3,47 ab	3,47 a
6	3,62 ab	3,62 ab	3,62 a
7	3,00 a	3,03 a	3,03 a
8	3,21 a	3,21 a	3,21 a
9	4,30 abc	4,30 abc	4,30 a
10	3,43 ab	3,43 ab	3,43 a
11	3,43 ab	3,49 ab	3,49 a
12	3,94 abc	3,94 ab	3,94 a
13	3,13 a	3,13 a	3,13 a
14	3,41 ab	3,33 ab	3,33 a
15	3,75 abc	3,75 ab	3,75 a
16	3,76 abc	3,59 ab	3,59 a
17	3,88 abc	3,88 ab	3,88 a
18	3,63 abc	3,63 ab	3,63 a
19	3,43 ab	3,43 ab	3,43 a
20	3,61 ab	3,61 ab	3,61 a

(*) Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p>0,05$)

Los porcentajes de inhibición obtenidos indican que la gran mayoría de los aislados lograron una inhibición superior al 50%, incluso uno de ellos alcanzó el 61,46% de inhibición (aislamiento T1), siendo en algunos casos más efectivos que el formulado comercial (T4) (Gráfico 1).

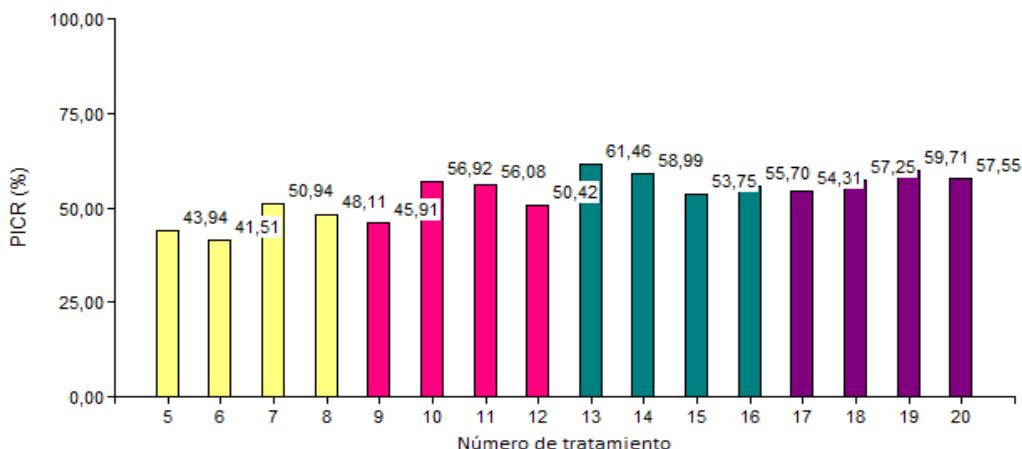


Gráfico 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del patógeno (PICR), medido a los 9 días.

En cuanto al análisis cualitativo de la competencia por espacio, todos los aislados de *Trichoderma* sp. evaluados presentaron actividad antagónica elevada, al mostrar una colonización casi total sobre *S. oryzae*, por ello recibieron calificación de 2 en la escala de clasificación de Bell et al. (1982). Una vez alcanzada la zona de interacción entre los inóculos, estas cepas continuaron su crecimiento hasta invadir 2/3 de la superficie de la colonia del hongo patógeno, sobre el que produjeron esporas.

Al analizar los diferentes preparados microscópicos (400x), procedentes de las zonas de interacción entre las colonias del patógeno y del antagonista, se observaron tres tipos de interacción hifal: lisis, enrollamiento y penetración (Figs. 10 y 11).

El micoparasitismo que realiza *Trichoderma* sp. se inicia al ser envueltas las hifas del patógeno por las del agente biocontrolador y formar apresorios que penetran en las células de *S. oryzae*. En la mayoría de los casos, las paredes celulares son degradadas por enzimas. Este mecanismo culmina con la pérdida del contenido citoplasmático de la célula del patógeno, donde el citoplasma restante está rodeando a las hifas antagonistas, mostrando síntomas de disagregación.

La capacidad de una cepa antagonista de poseer varios tipos de interacción, es una característica significativa de los aislados de *Trichoderma* sp. evaluados, ya que es un aspecto relevante para la selección del mismo como agente de control biológico.

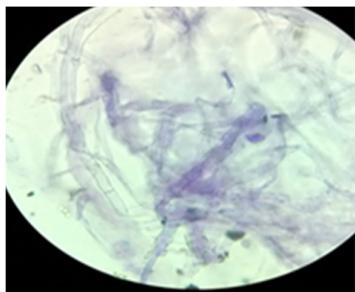


Figura 10. Lisis de la pared celular de las hifas del patógeno *Sclerotium oryzae*.

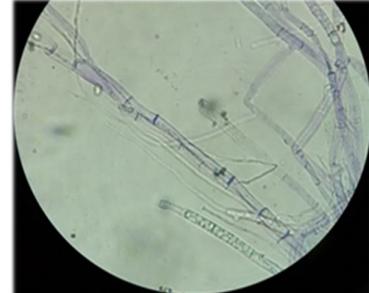
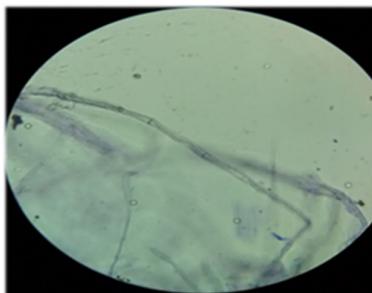


Figura 11. Enrollamiento (izq.); Penetración (der.) de una hifa del antagonista en una hifa del patógeno.

En referencia al mecanismo de antibiosis, se eligieron al azar 5 tratamientos utilizados en la prueba de cultivos duales para evaluar el efecto antibiótico que producen los aislados de *Trichoderma* sp. obtenidos (Tabla 4).

Tabla 4. Tratamientos utilizados para evaluar metabolitos volátiles.

Número de tratamiento	Tratamientos
2	S2 + APG
3	S3 + APG
4	S4 + APG
11	S2-T3
12	S2-T4
13	S3-T1
14	S3-T2
19	S4-T3

Todos los tratamientos presentaron diferencias significativas con respecto a sus testigos. Si bien no lo hicieron de inmediato, lograron diferenciarse aproximadamente a los 6 días de iniciado el experimento. Tanto en esta prueba, como en la de cultivos duales, los aislados antagonistas no presentaron diferencias significativas (Tabla 5).

Los tratamientos 12 y 13 (que corresponden al formulado comercial T4 y al aislamiento T1, respectivamente), fueron los que exhibieron mayor inhibición del crecimiento del patógeno por efecto antibiótico (Figs. 12 y 13).

Tabla 5. Promedios de crecimiento radial (cm) de *S. oryzae*, en cultivo puro y enfrentado con *Trichoderma* sp. en la prueba de metabolitos volátiles.

Número de tratamiento	Primera medición (a los 3 días)	Segunda medición (a los 6 días)	Tercera medición (a los 9 días)
2	5,54 b	7,82 bc	8,50 c
3	3,16 ab	6,80 b	8,50 c
4	5,35 b	8,50 c	8,50 c
11	4,71 b	5,45 a	6,07 ab
12	3,95 ab	5,10 a	5,52 a
13	3,04 ab	5,24 a	6,00 ab
14	1,96 a	5,13 a	6,28 ab
19	4,60 ab	6,84 b	6,84 b

Medias con una letra en común no son significativamente diferentes ($p>0,05$).



Figura 12. Primera y Segunda medición del tratamiento 13. La caja ubicada en el margen superior izquierdo de cada imagen corresponde al testigo, las restantes cajas corresponden a las repeticiones del tratamiento.

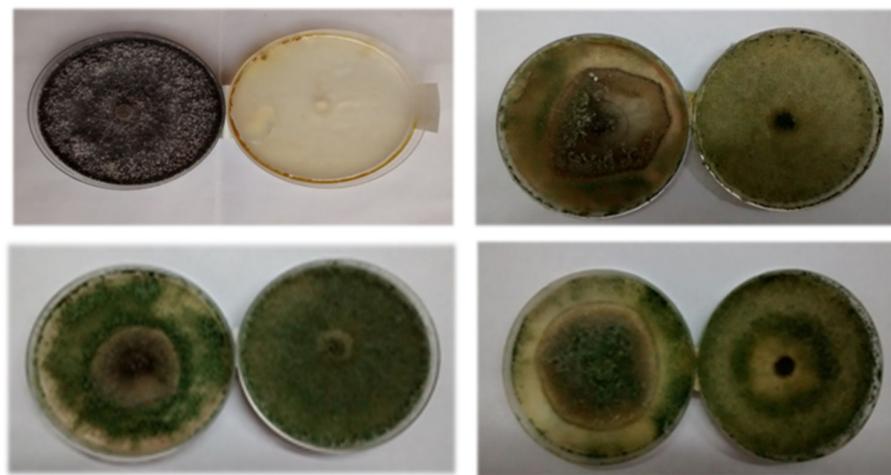
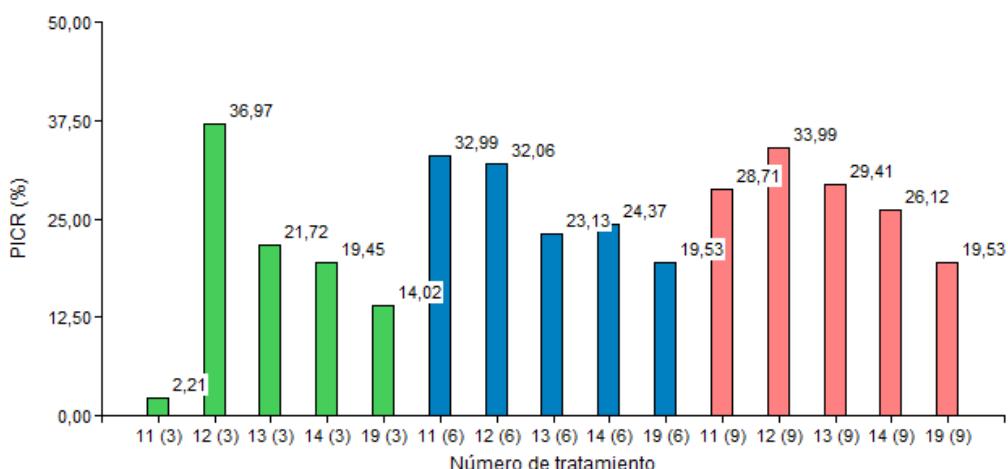


Figura 13. Detalle de la tercera medición del tratamiento 13.

Los porcentajes de inhibición obtenidos en la evaluación de metabolitos volátiles, fueron notoriamente menores en relación a los obtenidos en la prueba de cultivos duales. El mayor porcentaje de inhibición fue de 36,97%, y lo presentó el tratamiento 12 al inicio del experimento (Gráfico 2).

Gráfico 2. Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Radial (PICR %) de *S. oryzae* enfrentado con *Trichoderma* sp. para evaluar metabolitos volátiles, medido a los 3, 6 y 9 días.

DISCUSIÓN

Con respecto a los resultados obtenidos al evaluar cuantitativamente la competencia por espacio, todos los aislados de *Trichoderma* sp. lograron inhibir a *Sclerotium oryzae* en un 50% o más, como es el caso del aislado T1 que alcanzó un porcentaje de inhibición del 61,46%. Estos resultados coinciden con los logrados por Gopika et al. (2016), quienes observaron que *Trichoderma viride* presentó el mayor efecto antagonista de toda la micoflora y aislamientos bacterianos que fueron examinados, alcanzando la inhibición máxima (75,3%) del patógeno. En cuanto a la evaluación cualitativa de dicho mecanismo de acción, como ya se expuso anteriormente los aislados se ubicaron en la clase 2 de la escala de Bell et. al. (1982). En estudios realizados por Martínez et al. (2008), al evaluar aislamientos de *Trichoderma* sp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz, obtuvieron resultados similares, ubicándose en las clases 1 y 2, el 81,35% de los aislados analizados; asimismo Bell et al. (1982) observó que el 65% de las cepas

antagonistas estudiadas se ubicaron en la clase 1 y el 85%, se ubicó en la clase 2 al valorarse contra el mismo patógeno. Estos datos revelan el gran potencial de competencia que presentan los aislados de *Trichoderma* sp. dado fundamentalmente por su velocidad de crecimiento que es superior a la del patógeno.

En relación al micoparasitismo de *Trichoderma* sp. sobre *S. oryzae*, se observaron tres tipos de interacción hifal: lisis, penetración y enrollamiento. De igual modo, Martínez et al. (2008) obtuvieron como resultados que el 98,31% de los aislamientos en estudio mostraron al menos un tipo de interacción hifal con el patógeno; el 74% presentaron dos y tres tipos de interacción hifal; y sólo el 5% de los aislados mostraron cuatro tipos de interacción hifal: lisis, vacuolización, enrollamiento y penetración. Es importante tener en cuenta que la capacidad de un aislado de un antagonista de poseer varios tipos de interacción hifal, es una característica relevante si se pretende utilizarlo como agente biocontrolador.

En cuanto al efecto antibiótico de los aislados obtenidos, los porcentajes de inhibición calculados se encuentran en el rango de 20 a 35%, si bien son menores que los alcanzados en la técnica de cultivos duales, reflejan una buena capacidad antagónica. Esto es respaldado por Nishant y Smita (2013), quienes obtuvieron resultados de PICR similares (máximo de 28,88%, y mínimo de 21,11%) al enfrentar y analizar cultivos de dos días de edad del agente biocontrolador contra *S. oryzae*. La importancia de la antibiotiosis como parte de la actividad antagonista de *Trichoderma* sp., radica en que este hongo puede secretar varios compuestos antifúngicos simultáneamente y así impedir la aparición de microorganismos resistentes a estos metabolitos, aspecto importante desde el punto de vista práctico.

Mientras más modos de acción estén presentes en un aislado biocontrolador, mayor será la eficacia del mismo en el control del fitopatógeno, y por ende, menor el daño que puede causarle al cultivo (Danay Infante et al., 2009).

CONCLUSIONES

- Los aislados de *Trichoderma* sp. analizados, demostraron acción antagónica ante *Sclerotium oryzae*, por medio de los diferentes mecanismos antagónicos evaluados.
- El tratamiento 13 que correspondió al aislado T1, fue uno de los que presentó la mayor inhibición del crecimiento micelial del patógeno y PICR más alto, tanto en la técnica de cultivos duales como en la de antibiotiosis.
- Los aislados nativos de *Trichoderma* sp. (T1, T2 y T3), fueron tan eficaces como el producto ya aprobado para la venta (Rizoderma - T4) debido a que no se observaron diferencias significativas estadísticas entre ellos en las mediciones realizadas al evaluar los diferentes mecanismos de acción del antagonista.
- Estos aislados podrían ser tenidos en cuenta para futuras formulaciones biológicas comerciales, si bien se requieren ensayos a campo para evaluar la eficacia de los mismos en condiciones no controladas.

BIBLIOGRAFÍA

- Asociación Correntina de Plantadores de Arroz (ACPA). 2018. Recuperado desde: <http://www.acpaarrozcorrientes.org.ar>
- Avila, S. 2000. Una enfermedad del arroz importante en Uruguay, la podredumbre del tallo. Arroz 24:44-48. Recuperado desde: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/5526/1/Revista-Arroz-2000-24-AVILA.pdf>.
- Bell, DK, Wells, HD, Markham, CR. 1982. In vitro antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology* 72:389-372.
- Bhuvaneswari, V., KrishnamRaju, S., Praveena, PLRJ., Sridhar, TV., BharathaLakshmi, M. 2014. Evaluation of new fungicides, bio-control agents and plant extracts against *Sclerotium oryzae* Catt. Causing stem rot of rice. *Life Sciences International Research Journal* 1(1):252-258.

- Centros Regionales de Experimentación Agropecuaria (CREA). 2018. Recuperado desde: <https://www.crea.org.ar>
- Cook, JK., Baker, KF. 1983. The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens. American Phytopathological Society, St. Paul. (539 p).
- Couto Alfenas, A., Gonçalvets Mafia, R. 2007. Métodos em Fitopatología. Ed. UFV. 382 p.
- Cúndom, MA, Gutiérrez, SA, Mazza, SM, Popoff, O, López, SE. 2008. Incidencia de la podredumbre del tallo del arroz en Corrientes, Argentina, relacionada con la viabilidad de esclerocios de *Sclerotium oryzae* en suelo. En: VI Congreso Latinoamericano de Micología, Mar del Plata.
- Cúndom, MA., Gutiérrez, SA., Miño R., Duarte, JA. 2008. Prevalencia e incidencia de las enfermedades del tallo y vainas foliares del arroz en la provincia de Corrientes. En: 1º Congreso Argentino de Fitopatología, p 126.
- Danay Infante, D., Martínez, B., González, N., Reyes, Y. 2009. Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos fitopatógenos. Rev. Protección Veg. 24(1):14-21.
- Dennis, C., Webster, J. 1971 a. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* I. Production of non-volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society 57:25-39.
- Dennis, C., Webster, J. 1971 b. Antagonistic properties of species groups of *Trichoderma* II. Production of volatile antibiotics. Transactions of the British Mycological Society 57: 41-48.
- Duarte, JA, Cúndom, MA., Gutiérrez, SA. 2009. Prevalencia de spp. del género Rhizoctonia, en cultivos de arroz de la provincia de Corrientes. En: Actas Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, SGCYT, UNNE.
- Devi, HM.,Basha, ST., Eswara Reddy, NP., Bhaskar Reddy, BV. 2012. Biological control of *Sclerotium oryzae* (Cattaneo) causing stem rot of rice (*Oryza sativa* L.). Biopesticides International 8(1):71-81.
- Fernández, O., Vega, L. 2001. Microorganismos antagonistas para el control fitosanitario. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 62: 96-100.
- Gopika, R., Jagadeeshwar, V., Krishna Rao, Vijayalakshmi, K. 2016. An overview of stem rot disease of rice (*Sclerotium oryzae*Catt.) and it's comprehensive management k 2016. International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology. 7(1):111-124.
- Gutiérrez, SA., Cúndom, MA. 2013. Guía de identificación de enfermedades del cultivo del arroz. ACPA. 24 p.
- Gutiérrez, SA., Cúndom, MA., Dirchwolf, PM. 2017. Patógenos de suelo causantes de enfermedades en cultivos de arroz en Corrientes. En: XI Reunión Nacional de Biología de Suelos, FCA, UNNE. Corrientes.
- InfoStat. versión 2018. Di Rienzo, F., Casanoves, F., Balzarini, MN., Gonzales, L., Tablada, M. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina
- Martinez B., Reyes Y., Infante D., Gonzalez E., Baños H., Cruz, A. 2008. Selección de aislamientos de *Trichoderma* spp. candidatos a biofungicidas para el control de *Rhizoctonia* sp. en arroz. Protección Vegetal 23 (2): 118-125.
- Mondino P., Vero, S. 2006. Control Biológico de patógenos de plantas, Departamento de Publicaciones, Facultad de Agronomía. Montevideo, Uruguay.
- Nagam V., Ongolu S., Sani A., Tartte V., Aruga S. 2015. Isolation, screening of rhizosphere fungi antagonistic to rice stem rot disease pathogen *Sclerotium oryzae* Catt. AsianJournal of Pharmaceutical and Clinical Research 8 (5): 54-57.
- Nishant P., Smita P. 2013. Screening of fungal biocontrol agents against *Sclerotium oryzae* the causal agent of stem rot of rice. International Journal of Agricultural Sciences 9 (1):354-350.
- Ou, SH. 1985. Rice Diseases. CMI. Surrey, England. 382 p.

- Prameela, M., Rajeswari, MB., Krishnaveni, D. 2018. Efficacy of fungicides and herbicides against *Sclerotium oryzae* Catt. incitant of stem rot disease in rice. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 7(02): 1650-1653.
- Pedraza, MV., Asselborn, MN., Cattaneo, F., Liberman, CA., Clemente, GE. 2008. Alternativa biológica para el manejo de la pudrición del tallo en arroz (*Sclerotium oryzae*). En: 1º Congreso Argentino de Fitopatología. p. 180
- Skidmore, AM., Dickinson, CH. 1976. Colony interactions and hyphal interference between *Septoria nodorum* and phylloplane fungi. Transactions British Mycological Society 66:57-64.
- Shamim, MD., Singh, KN. Eds. 2017. Biotic Stress Management in Rice: Molecular Approaches Apple Academic Press, Inc. 424 p.
- Stocco, MC. 2014. Control biológico de *Mycosphaerella graminicola*, patógeno del trigo, con cepas de *Trichoderma harzianum* caracterizadas por su morfología, fisiología, actividad enzimática y molecular. Universidad de la Plata, Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Recuperado desde :
http://sedici.unlp.edu.ar/bitstream/handle/10915/42904/Documento_completo.pdf?sequence=1
- Webster R.K., Gunnell P.S. 1992. Compendium of Rice Diseases. Fourth Ed. APS Press, The American Phytopathological Society. St. Paul Minnesota, USA.