

<i>Nereis. Revista Iberoamericana Interdisciplinar de Métodos, Modelización y Simulación</i>	12	91-98	Universidad Católica de Valencia San Vicente Mártir	Valencia (España)	ISSN 1888-8550
--	----	-------	---	-------------------	----------------

## Un nuevo agente de biocontrol de *Drechslera oryzae*

### A new biocontrol agent of *Drechslera oryzae*

Fecha de recepción y aceptación: 1 de marzo de 2020, 16 de marzo de 2020

DOI: 10.46583/nereis\_2020.12.587

**F. Sempere Ferre<sup>1\*</sup> y M.<sup>a</sup> Pilar Santamarina Siurana<sup>2</sup>**

<sup>1</sup> Departamento de Estadística e Investigación Operativa. Escuela Técnica Superior de Ingeniería del Diseño. Universidad Politécnica de Valencia.

<sup>2</sup> Departamento de Ecosistemas Agroforestales. Escuela Técnica Superior de Ingeniería Agronómica y del Medio Natural. Universidad Politécnica de Valencia

\* Correspondencia: Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera, s/n, Edificio 7B. 46022 Valencia. España.

E-mail: frasemfe@upvnet.upv.es



#### RESUMEN

El hongo patógeno del arroz *Drechslera oryzae* se inoculó en un mismo sustrato junto a *Trichoderma harzianum* en distintas condiciones medioambientales. Los mecanismos ejercidos por *T. harzianum* para antagonizar a *D. oryzae* y que en algunos casos actuaron sinérgicamente fueron: competencia por el espacio y los nutrientes, micoparasitismo y posible antibiosis. La capacidad antagonista de *T. harzianum* aumentó con los valores de temperatura y actividad del agua.

**PALABRAS CLAVE:** *Drechslera oryzae*, *Trichoderma harzianum*, *antagonista*, *arroz*.

#### ABSTRACT

The rice pathogen *Drechslera oryzae* and the antagonistic fungus *Trichoderma harzianum* were inoculated in the same substratum at different environmental conditions. The mechanisms exerted by *T. harzianum* as antagonist over *D. oryzae* and that on some occasions acted synergically were: competitiveness for space and nutrients, mycoparasitism and a possible antibiosis. The antagonistic capacity of *T. harzianum* was higher as the values of water activity and temperature were increasing.

**KEYWORDS:** *Drechslera oryzae*, *Trichoderma harzianum*, *antagonist*, *rice*.

## INTRODUCCIÓN

*Drechslera oryzae* Subram. & Jain anamorfo de *Cochliobolus miyabeanus* (Ito and Kurib.) Drechs. es uno de los principales hongos patógenos del arroz que a nivel mundial produce en el cultivo pérdidas de diversa consideración.

La lucha contra enfermedades de origen fúngico en este cereal se basa, actualmente, en la obtención de variedades resistentes y el uso de productos químicos.

El éxito del uso de formulados con agentes de control biológico como alternativa o complemento al uso de productos químicos es hoy una realidad en muchos cultivos. En este sentido, el control biológico se podría utilizar para combatir las enfermedades de un cereal que constituye la base de la alimentación de dos tercios de la población mundial.

El objetivo de este trabajo fue determinar la posible capacidad antagónica de *T. harzianum* sobre *D. oryzae* en condiciones *in vitro* a distintos valores de temperatura y actividad de agua. El estudio se realizó a nivel macroscópico pero se completó con un análisis microscópico de la interacción entre las dos especies.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislado

*Drechslera oryzae* fue aislada en el laboratorio de la Unidad Docente de Ecología y Botánica del Departamento de Ecosistemas Agroforestales de muestras de granos de arroz de distintas parcelas y cooperativas de las principales zonas productoras de la provincia de Valencia. *Trichoderma harzianum* CECT 20736 fue cedida por la colección que alberga dicho laboratorio.

### Sustrato

Se utilizó Agar Extracto de Arroz (AEA) como medio base obtenido a partir de granos de arroz cáscara de la Comunidad Valenciana. La actividad de agua ( $a_w$ ) de este medio basal fue de 0,995.

Para ajustar la actividad de agua a otros valores se añadieron distintas cantidades de glicerol y agua destilada según el método descrito por Sempere y Santamarina [1].

En total se realizaron 10 tratamientos combinando cinco actividades de agua (0,85; 0,90; 0,95; 0,98; 0,995) y dos temperaturas (15 y 25 °C).

### Inoculación y ensayo Ecofisiológico

En cada una de las placas se inocularon, separados por 45 mm, dos discos de 8 mm de diámetro obtenidos de la periferia de colonias puras de *T. harzianum* y *D. oryzae* crecidas en PDA a 25 °C durante cinco días en la oscuridad, y se incubaron en las mismas condiciones durante ocho semanas.



El crecimiento fue registrado diariamente mediante la medición de dos diámetros perpendiculares por colonia fúngica. Para calcular la ratio de crecimiento ( $\text{mm día}^{-1}$ ) se realizó una regresión lineal de los radios (mm) frente al tiempo (días). El programa utilizado fue Excel 2003 (Microsoft, EE. UU.).

### **Determinación macroscópica de las interacciones fúngicas**

Después de obtener los gráficos del estudio ecofisiológico, las placas Petri se incubaron durante 7 semanas en las mismas condiciones, y se observó la evolución macroscópica de las colonias. Finalmente se estableció el tipo de interacción entre las especies. Según este, a cada hongo se le asignó un valor numérico para obtener el índice de dominancia: crecimiento en común (1); inhibición mutua por contacto o con espacio entre colonias  $< 2$  mm (2); inhibición mutua a distancia (3); inhibición de un microorganismo por contacto (4 para la especie dominante, 0 para la especie inhibida); inhibición de un microorganismo a distancia (5 para la especie dominante, 0 para la especie inhibida) [2].

### **Análisis microscópico de la interacción**

Para el estudio de la interacción se realizó un *microcultivo dual*. En este sentido, la metodología seguida fue la misma que en la técnica del microcultivo, pero se sembraron dos cepas en dos bloques de agar separadas por una distancia de 3-5 mm y se depositó un cubreobjetos sobre ellas.

Para su estudio en el microscopio electrónico de barrido de bajas temperaturas, las especies se inocularon en un mismo bloque de agar y no se utilizó cubreobjetos. Después del periodo de incubación, las muestras se montaron en un portaobjetos y se congelaron con nitrógeno líquido. Posteriormente fueron sublimadas durante 15 minutos, recubiertas con oro durante 30 segundos y visualizadas en el microscopio a 10 kV [3].

El periodo de incubación de las especies varió entre 5-30 días, dependiendo de las condiciones de temperatura y actividad de agua.

Para regular la actividad de agua en cada una de las placas se depositaron discos impregnados con soluciones con los respectivos valores: 0,98 y 0,95, y 11 y 23,5 glicerol/100 mL de agua destilada, respectivamente.

### **Análisis estadístico**

Para verificar la influencia de los factores  $a_w$ , temperatura (T) y especie (E), así como sus interacciones sobre el crecimiento fúngico dual, se realizó el test de análisis de la varianza (ANOVA) con valores de significación de  $P < 0,01$ . El programa utilizado fue Statgraphics Plus 5.0 (Stat Point, Inc., Herndon, Virginia, USA).



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Crecimiento de las colonias fúngicas

Las ratios de crecimiento de *D. oryzae* fueron siempre inferiores a las obtenidas por *T. harzianum*, excepto a  $0,95 a_w$  a ambas temperaturas y a  $0,90 a_w$   $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . A  $0,95$   $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  la velocidad de crecimiento de ambas especies fue muy similar, y a  $0,95 a_w$   $15\text{ }^{\circ}\text{C}$  el crecimiento de *D. oryzae* fue mayor porque, durante los días en los que se realizaron las medidas, el desarrollo de *T. harzianum* fue nulo. El patrón de crecimiento de *T. harzianum* frente a *D. oryzae* fue muy parecido al de la especie cuando se inoculó individualmente [1]. Se desarrolló en todas las actividades de agua, excepto a  $0,85 a_w$ , –aunque en el estudio ecofisiológico inicial no se registró en algunos valores desarrollo–, y tuvo un máximo crecimiento, independientemente de la temperatura, a la actividad de agua de  $0,995$  (figura 1).

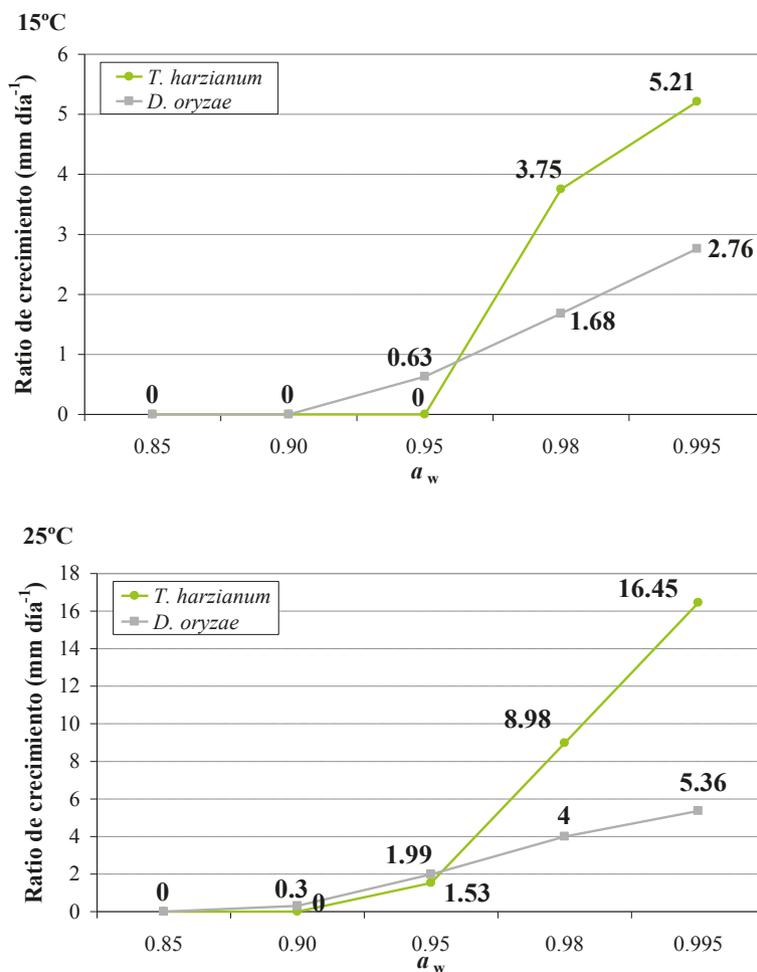


Fig. 1. Influencia de la actividad de agua ( $a_w$ ) en función de la temperatura sobre la ratio de crecimiento de *T. harzianum* y *D. oryzae* inoculados conjuntamente en agar extracto de arroz.



Los factores abióticos actividad de agua y temperatura y el factor biótico especie y sus interacciones tuvieron un efecto significativo ( $P < 0,01$ ) sobre el desarrollo miceliar medio de *T. harzianum* y *D. oryzae* en agar extracto de arroz (tabla 1).

Tabla 1. Análisis de la varianza del crecimiento dual de *T. harzianum* y *D. oryzae*; significancia de los factores simples de actividad de agua ( $a_w$ ), temperatura (T), especie fúngica (E) y factores dobles ( $a_w \times T$ ), ( $a_w \times E$ ), (T  $\times$  E). GL: Grados de libertad. CM: cuadrado medio. F-Ratio: F-Snedecor. \*\* Indica que el factor tuvo un efecto significativo ( $P < 0,01$ )

FACTOR	GL	CM	F-ratio	P-valor
$a_w$	4	4747.7	90.09	0.0000**
T	1	4290.25	81.41	0.0000**
E	1	1564.2	29.68	0.0000**
$a_w \times T$	4	1506.5	28.59	0.0000**
$a_w \times E$	4	753.013	14.29	0.0000**
T $\times$ E	1	495.063	9.39	0.0023**

Aunque inicialmente, durante el estudio ecofisiológico, la interacción no produjo una variación significativa en el crecimiento de ninguna de las especies, durante las ocho semanas de experimentación sí que lo hizo. En todas las condiciones ensayadas, salvo a  $0,95 a_w$   $15^\circ\text{C}$ , ambas especies crecieron de forma muy similar a cuando lo hicieron individualmente, pero cuando contactaron el crecimiento de *D. oryzae* fue inhibido por la presencia de *T. harzianum*. Cuanto mayor fue la ratio de crecimiento, mayor fue la inhibición del crecimiento de *D. oryzae*.

En un estudio realizado por Abdel-Fattah y col. [4], donde sembraron ambas especies en PDA y se incubaron a  $25^\circ\text{C}$  en condiciones de luz y oscuridad (12h/12h) durante ocho días, la inhibición que produjo *T. harzianum* sobre el crecimiento de *D. oryzae* tras el sexto día de inoculación fue del 48 %. Del mismo modo, al igual que en este estudio las ratios de crecimiento de *T. harzianum* fueron superiores a las registradas por *D. oryzae*.

## Determinación del índice de dominancia

*Trichoderma harzianum* inhibió a *D. oryzae* por contacto en todas las condiciones ensayadas excepto a  $0,95 a_w$   $15^\circ\text{C}$ . Ambas colonias fueron desarrollándose hasta contactar; posteriormente *T. harzianum* creció sobre el sustrato ya colonizado por *D. oryzae* (figura 2). El mecanismo involucrado por *T. harzianum* para controlar a *D. oryzae* fue competencia por el espacio y los nutrientes.



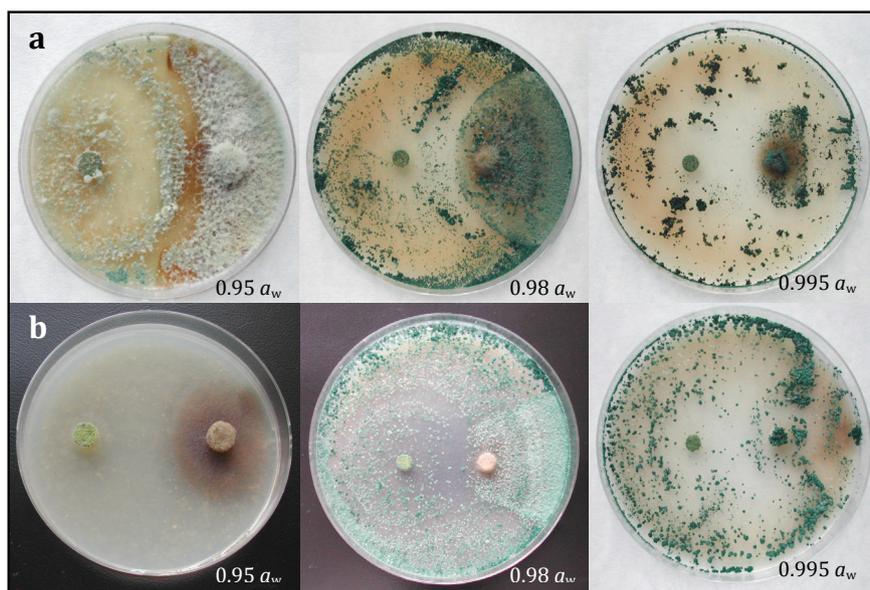


Fig. 2. Interacción entre *T. harzianum* y *D. oryzae* con un periodo de 8 semanas a distintas temperaturas y actividades de agua. Inhibición por contacto de *D. oryzae*. Véase el crecimiento de *T. harzianum* sobre esta especie. Fila a: 25 °C. Fila b: 15 °C. Izquierda: *T. harzianum*. Derecha: *D. oryzae*.

Para calcular el índice de dominancia a *T. harzianum* se le asignó un valor numérico de 4 (tabla 2).

Tabla 2. Índice de dominancia ( $I_D$ ). El  $I_D$  se obtuvo de sumar los valores asignados a cada especie según el tipo de interacción a las distintas temperaturas. Inhibición de *D. oryzae* por contacto (4 para la especie dominante –*T. harzianum*–; 0 para la especie inhibida –*D. oryzae*–). Inhibición mutua a distancia (3 para cada especie). X: El análisis de la interacción fue descartado

Temperatura	Especie fúngica	0,995 $a_w$	0,98 $a_w$	0,95 $a_w$	0,90 $a_w$	$I_D$
25 °C	<i>T. harzianum</i>	4	4	4	X	12
	<i>D. oryzae</i>	0	0	0	X	0
15 °C	<i>T. harzianum</i>	4	4	3	X	11
	<i>D. oryzae</i>	0	0	3	X	3

A 0,95  $a_w$  15 °C, según el método descrito por Magan y Lacey [2], se produjo una inhibición mutua a distancia, y se observó un espacio de separación entre las colonias superior a 2 mm. Pero según los resultados obtenidos por los autores al comparar el crecimiento de las especies cuando se inocularon individualmente, fue *T. harzianum* la especie que inhibió el desarrollo de *D. oryzae* (resultados no mostrados).

## Análisis microscópico

El estudio microscópico de la interacción mostró que los mecanismos por los cuales *T. harzianum* antagonizó a *D. oryzae* fueron una posible antibiosis a 0,95  $a_w$  15 °C y micoparasitismo en el resto de condiciones ensayadas.

*T. harzianum* contactó inicialmente con *D. oryzae*, penetró y destruyó sus estructuras y finalmente utilizó al patógeno como fuente de nutrientes.

Una clara separación entre las especies se observó en el microscopio óptico y electrónico de barrido a 0,95  $a_w$  15 °C, apareciendo degradadas las estructuras de *D. oryzae*.

Los resultados obtenidos sugieren que la cepa *T. harzianum* produce metabolitos antifúngicos y enzimas que degradan la pared celular tales como quitinasas, glucanasas o proteasas, pero se necesitan más investigaciones al respecto. La producción de estos por parte de *T. harzianum* y su importancia en los mecanismos de biocontrol ya han sido descritos por otros investigadores [5-7].

En el ensayo realizado por Abdel-Fattah y col. [4] no se observó que *T. harzianum* parasitara a *D. oryzae*, lo que sugiere que este hecho podría ser debido a la cepa antagonista utilizada o a que la interacción entre las especies no fue específica. Estos investigadores obtuvieron, aplicando una suspensión de esporas de *T. harzianum* en el campo, una reducción de la severidad e incidencia de la enfermedad producida por *D. oryzae* en las hojas, un incremento en el rendimiento, contenido en carbohidratos y proteínas del grano de arroz, y un incremento de los pigmentos fotosintéticos en las hojas de la planta del arroz (clorofila a, b y carotenoides).

## CONCLUSIONES

Este es el primer ensayo que describe la capacidad antagonista de *T. harzianum* sobre el hongo patógeno del arroz *D. oryzae*. Los mecanismos involucrados para controlar *D. oryzae* y que en algunas condiciones actuaron sinérgicamente fueron competencia por el espacio y nutrientes, micoparasitismo y una posible antibiosis. Es necesario realizar más estudios al respecto pero *T. harzianum* podría ser en un futuro un buen agente de biocontrol de *D. oryzae*.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Sempere F, Santamarina P. Microscopic and macroscopic study of the interaction between *Alternaria alternata* (Fr.) Keissler and *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome). Petch. Ann Microbiol. 2006;56:101-7.
- [2] Magan N, Lacey J. The effect of water activity, temperature and substrate on interactions between field and storage fungi. Trans Brit Mycol Soc. 1984;82:83-93.
- [3] Sempere F, Santamarina MP. Suppression of *Nigrospora oryzae* (Berk. & Broome) Petch by an aggressive mycoparasite and competitor, *Penicillium oxalicum* Currie & Thom. Int J Food Microbiol. 2008;122:35-43.



- [4] Abdel-fattah G, Shabana YM, Ismail AE, Rashad YM. *Trichoderma harzianum*: a biocontrol agent against *Bipolaris oryzae*. Mycopathologia. 2007;164:81-9.
- [5] Limón MC, Chacón MR, Mejías R, Delgado-Jarana J, Rincón AM, Codón AC, Benítez T. Increased antifungal and chitinase specific activities of *Trichoderma harzianum* CECT 2413 by addition of a cellulose binding domain. Appl Microbiol Biotechnol. 2004;64:675-85.
- [6] Montero M, Sanz L, Rey M, Monte E, Llobell A. BGN16.3, a novel acidic beta-1,6-glucanase from mycoparasitic fungus *Trichoderma harzianum* CECT 2413. FEBS J. 2005;272:3441-8.
- [7] Suárez MB, Sanz L, Chamorro MI, Rey M, González FJ, Llobell A, Monte E. Proteomic analysis of secreted proteins from *Trichoderma harzianum*. Identification of a fungal cell wall-induced aspartic protease. Fungal Genet Biol. 2005;42:924-34.

