

TRATAMIENTO BIOLÓGICO DEL CULTIVO DE ARROZ EN CONDICIONES DE VIVERO EMPLEANDO EL HONGO

Trichoderma spp.

Leandro Núñez Muñoz y Domenico Pavone Maniscalco

RESUMEN

El cultivo de arroz posee características especiales debido a la presencia de láminas de agua para su producción, limitando así la aplicación de agentes de biocontrol al suelo por las condiciones de anoxia del mismo. Los hongos del género *Trichoderma* poseen la capacidad de controlar patógenos del suelo y promover el crecimiento en varios cultivos. En el presente estudio se evaluó el efecto de *T. harzianum* (TV72) y *T. asperellum* (TV190) sobre la germinación, desarrollo vegetativo y producción en *Oryza sativa* L. var. Cimarrón en diferentes alturas de lámina de agua; así como el biocontrol *in vitro* de *Pyricularia*

grisea y disminución de la incidencia del manchado del grano en vivero. Ambas cepas incrementaron la velocidad de germinación, longitud y masa seca radicular de forma significativa. Se encontraron incrementos en la producción en las plantas tratadas con *Trichoderma* spp. (30-60%), así como una disminución del manchado del grano (34-45%) y del crecimiento *in vitro* de *P. grisea* (18-52%). Estos resultados evidencian la posibilidad de utilizar a *Trichoderma* spp. en las condiciones de inundación del cultivo de arroz para el manejo de enfermedades y promoción del desarrollo y rendimiento.

Introducción

El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los cereales más importantes a escala mundial, produciéndose en más de 113 países y sirviendo como alimento básico a más de la mitad de la población humana (Cárdenas *et al.*, 2010). En este cultivo existe un conjunto de enfermedades que diezman su productividad y rendimiento, entre las cuales el añublo del arroz causado por el hongo *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc. (teleo. *Magnaporthe grisea*) y el manchado del grano, son las más importantes y recurrentes (Acebo *et al.*, 2011; Palacios y Pauth, 2008). El manchado del grano en *O. sativa* es causado por un consorcio complejo de hongos (más de 30 géneros) y bacterias que proliferan bajo condiciones ambientales particulares. La enfermedad reduce comúnmente el rendimiento y calidad del grano, además de la viabilidad de la semilla. Algunos de estos microorganismos produ-

cen además compuestos tóxicos que descartan el uso del grano para el consumo humano y animal (Rodríguez *et al.*, 1988; Sisterna *et al.*, 1994). Los métodos de control tradicionales de la piriculariosis se realizan a través del empleo de variedades resistentes a la enfermedad o mediante el uso de fungicidas químicos (Kim *et al.*, 2004). Sin embargo, la resistencia génica ha sido convencionalmente superada por el fitopatógeno en pocos ciclos de cultivo; mientras que la aplicación de fungicidas químicos implica daños y riesgos considerables a nivel ambiental (Kaewchai *et al.*, 2009). Ante esta situación, el biocontrol de la enfermedad podría constituir una alternativa a este problema fitosanitario.

Dentro del género *Trichoderma* se incluyen hongos biocontroladores utilizados ampliamente en muchos cultivos, debido a que poseen mecanismos antagónicos sobre fitopatógenos, tales como competencia por nutrientes, mico-

parasitismo, antibiosis y efectos sobre las plantas, implicando la modificación de la rizosfera, colonización radical, solubilización de nutrientes, promoción del crecimiento, tolerancia a estrés de tipo biótico y abiótico, e inducción de resistencia (Howell, 2003; Benítez *et al.*, 2004; Ozbay y Newman, 2004; Annand y Reddy, 2009; Mohiddin *et al.*, 2010). La utilización de *Trichoderma* spp. en plantaciones de arroz podría promover un mejor desarrollo de la planta y un mayor rendimiento, por lo que esta investigación presenta un aporte que podría ayudar a comprender el efecto de *Trichoderma* spp. sobre *O. sativa* en las condiciones particulares que caracterizan este cultivo bajo inundación.

Materiales y Métodos

Material biológico

Se utilizaron las cepas de *Trichoderma* spp. TV72 (*T. harzia-*

num) y TV190 (*T. asperellum*) de la colección micológica de la Unidad de Investigación en Biotecnología Aplicada de la Universidad de Carabobo, Venezuela. Estas cepas fueron aisladas a partir de suelos provenientes de plantaciones de maíz de los Estados Apure (TV72) y Monagas (TV190), Venezuela. La cepa de *Pyricularia grisea* utilizada en los ensayos *in vitro* fue cedida por Alex Gonzalez (Fundación Danac, Yaracuy, Venezuela). Las semillas de *Oryza sativa* L. var. Cimarrón fueron donadas por William Castrillo (Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas, Estado Guárico, Venezuela).

Efecto antagónico *in vitro* de *Trichoderma* spp. sobre *P. grisea*

El efecto de compuestos extracelulares de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento *in vitro* de *P. grisea*, se evaluó cultivando cada cepa de *Trichoderma* en 100ml de caldo papa sacarosa

PALABRAS CLAVE / Arroz / Manchado del Grano / *Oryza sativa* L. / *Pyricularia grisea* / *Trichoderma asperellum* / *Trichoderma harzianum* /

Recibido: 28/01/2014. Modificado: 18/02/2014. Aceptado: 20/02/2014.

Leandro Núñez Muñoz. Licenciado en Biología, Universidad de Carabobo (UC), Venezuela. Estudiante de Maestría en Ciencias en Biotecnología y Bioingeniería, Centro de Investigaciones y Es-

tudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAVIPN), México e-mail: lnunezmunoz@hotmail.com.

Domenico Pavone Maniscalco. Licenciado en Biología, M.Sc.

en Agronomía y Doctor en Ciencias mención Biología Celular, Universidad Central de Venezuela. Profesor, UC, Venezuela. Dirección: Unidad de Investigación en Biotecnología Apli-

cada, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología. UC - Campus de Bárbula, Municipio Naguanagua, Venezuela. e-mail: dpavone@gmail.com.

BIOLOGICAL TREATMENT OF RICE CULTURE IN GREENHOUSE CONDITIONS USING THE FUNGUS

Trichoderma spp.

Leandro Núñez Muñoz and Domenico Pavone Maniscalco

SUMMARY

Rice culture has some special characteristics, due to the flooding required for optimal production. This fact limits the use of biological control agents because of the anaerobic conditions presents in these systems. Species of the fungal genus *Trichoderma* have the potential of controlling soil borne pathogens and promoting growth in various plants. In this study the effects of *T. harzianum* (TV72) and *T. asperellum* (TV190) on germination, vegetative growth and production of *Oryza sativa* L. var. Cimarron under different flooding conditions were evaluated, as

well as the *in vitro* biocontrol of *Pyricularia grisea* and reduction in grain spotting in greenhouse conditions. Both *Trichoderma* strains significantly increased germination rate, root length and root dried biomass. Production was also increased in plants treated with *Trichoderma* (30-60%); and reduction in grain spotting (34-45%) and *in vitro* growth of *P. grisea* (18-52%) were observed. These results suggest that the use of *Trichoderma* spp. in the flooding conditions usually found in rice cultures could help control diseases and promote growth and yield.

TRATAMIENTO BIOLÓGICO DO CULTIVO DE ARROZ EM CONDIÇÕES DE VIVEIRO EMPREGANDO O FUNGO

Trichoderma spp.

Leandro Núñez Muñoz e Domenico Pavone Maniscalco

RESUMO

O cultivo de arroz possui características especiais devido à presença de lâminas de água para sua produção, limitando assim a aplicação de agentes de bio controle ao solo pelas condições de anóxia do mesmo. Os fungos do gênero *Trichoderma* possuem a capacidade de controlar patógenos do solo e promover o crescimento em vários cultivos. No presente estudo se avaliou o efeito de *T. harzianum* (TV72) e *T. asperellum* (TV190) sobre a germinação, desenvolvimento vegetativo e produção em *Oryza sativa* L. var. Cimarron em diferentes alturas de lâmina de água; assim como o bio controle *in vitro* de *Pyri-*

cularia grisea e diminuição da incidência de mancha do grão em viveiro. Ambas as cepas incrementaram a velocidade de germinação, comprimento e massa seca radicular de forma significativa. Encontraram-se incrementos na produção nas plantas tratadas com *Trichoderma* spp. (30-60%), assim como uma diminuição de mancha do grão (34-45%) e do crescimento *in vitro* de *P. grisea* (18-52%). Estes resultados evidenciam a possibilidade de utilizar a *Trichoderma* spp. nas condições de inundação do cultivo de arroz para a manipulação de enfermidades e promoção do desenvolvimento e rendimento.

(200g de papa en 1 l de agua, ebullición por 10min, infusión diluida a la mitad, 10g·l⁻¹ de sacarosa), añadiendo 10⁶ esporas/ml de cada cepa en cultivos individuales. Se incubó a temperatura ambiente a 100rpm por siete días y posteriormente se agitó el cultivo vigorosamente en un vórtex por 30s y se filtró a través de membrana acetato de celulosa de Millipore® de 0,45µm de diámetro de poro. Se tomaron alícuotas de 100µl del filtrado y se esparcieron en placas de PDA a las que posteriormente se les colocó un disco de micelio de *P. grisea* de 4,5mm de diámetro, incubándose en oscuridad por cinco días y midiéndose el diámetro de la colonia. Para el caso del grupo control, el filtrado empleado fue caldo papa sacarosa sin *Trichoderma*. Para determinar la producción de compuestos solubles y volátiles en PDA, con efecto biocontrolador por parte de *Trichoderma* spp., otro ensayo fue desa-

rollado al enfrentar *Trichoderma* spp. y *P. grisea* en placas de Petri, determinándose la disminución del crecimiento del fitopatógeno, previo al contacto con el biocontrolador. Adicionalmente, para evaluar el efecto de compuestos volátiles inhibitorios del crecimiento de *P. grisea*, en placas de Petri divididas se sembraron discos de micelio de 4,5mm de diámetro de *P. grisea* y al otro lado de la placa *Trichoderma* spp. (10 placas por tratamiento), se sellaron con papel de parafina (Parafilm®) y se incubaron a 27°C por cinco días. Posteriormente se midió el área ocupada por la colonia de *P. grisea* y se comparó con el tratamiento control.

Inoculación de semillas de *O. sativa*

Las semillas de *O. sativa* se sumergieron durante 24h en suspensiones de las diferentes cepas

de *Trichoderma* spp., conteniendo 10⁷ esporas/ml, provenientes de cultivos esporulados en medio agar papa dextrosa (PDA). Finalmente las semillas fueron secadas al aire por 12h y utilizadas para los distintos ensayos. Para los controles sin hongo, un lote de semillas fue sumergido en agua destilada estéril por 24h, y secados al aire por 12h.

Efecto de *Trichoderma* en la germinación de la semilla y desarrollo de plántulas de *O. sativa*

Semillas de *O. sativa* inoculadas con esporas de cada una de las dos cepas de *Trichoderma* spp., se depositaron sobre papel de filtro Whatman #4 esterilizado y colocado en placas de Petri. Un sistema estéril con semillas no inoculadas con el hongo fue también procesado. El papel de filtro fue humedecido al inicio e interdiariamente. El bioensayo consis-

tió de 50 semillas por placa (réplica) y diez placas por tratamiento. En cada tratamiento se determinó la cinética de germinación durante siete días, así como la velocidad de emergencia (VE) según Maguire (1962). También se determinó, en plántulas de siete días, el porcentaje de germinación, tamaño de la radícula y del coleóptilo, biomasa seca aérea y radical. Se realizaron montajes de las raíces con Carnoy 3:1 (metanol:ácido acético) y eosina ácida 5% para observar posible colonización con *Trichoderma* spp. Para evaluar la posible presencia de hongos endófitos se procedió a realizar una desinfección superficial a 30 raicillas elegidas al azar por cada tratamiento. La desinfección implicó el lavado con cloro comercial y etanol al 70% durante 10min. Posteriormente se realizaron lavados con agua destilada estéril. Finalmente, las raicillas fueron sembradas en placas con medio PDA

por siete días a temperatura ambiente.

Sobrevivencia en suelo de Trichoderma spp., promoción del crecimiento vegetativo y variables de producción en O. sativa

En envases de plástico transparentes de 1500ml de capacidad, se añadió ~1kg de suelo proveniente de plantaciones de arroz del Estado Guárico, Venezuela. En el fondo de cada envase se colocó externamente una bolsa negra de polietileno, con la finalidad de evitar la incidencia de radiación solar sobre el suelo depositado en éstos. En cada envase se sembraron 3-4 semillas de *O. sativa* inoculadas con las cepas de *Trichoderma* spp. Una vez germinadas se dejó sólo una semilla por envase, realizándose reinoculaciones semanales de 10⁷ esporas de *Trichoderma* spp. por planta. Tres semanas después de la siembra se colocaron láminas de agua de aproximadamente 0, 5 y 15cm de altura para cada cepa de hongo estudiado y para el control sin hongo. El ensayo consistió de nueve tratamientos (dos cepas de hongos, un control y tres láminas de agua para cada uno). Para determinar la presencia de *Trichoderma* spp. luego de ocho semanas de la siembra se tomaron muestras de suelo de cada tratamiento. Posteriormente, alícuotas de 100µl de las suspensiones de las muestras de suelo (dilución 10⁻³) se sembraron en placas con medio PDA suplementado con amoxicilina (500mg·l⁻¹). Se realizaron 30 réplicas por tratamiento. Simultáneamente también se determinó, en la semana 8, la longitud de la parte aérea de la planta, número de tallos, hojas por planta, altura del tallo, ancho del tallo, longitud radical y biomasa seca aérea y radical (20 réplicas por tratamiento escogidas al azar). Empleando otro lote experimental de similares características, se determinó el tiempo promedio de aparición de la espiga y la producción promedio por planta tras previo secado de los granos en estufa a 70°C por tres días, procesándose un total de 30 plantas por tratamiento. Para evaluar la calidad de los granos se contabilizaron los granos man-

TABLE I
EFECTO INHIBITORIO DE COMPUESTOS EXTRACELULARES, VOLÁTILES Y VOLÁTILES + PERMEABLES PRODUCIDOS POR LAS CEPAS TV72 Y TV190 SOBRE EL CRECIMIENTO DE *P. grisea*

Cepas	Inhibición del crecimiento de <i>P. grisea</i> (%)		
	Compuestos extracelulares	Compuestos volátiles	Compuestos volátiles + permeables
TV72	19,91 ±2,80 a	18,79 ±1,74 a	51,87 ±2,90 a
TV190	23,25 ±2,58 a	16,80 ±1,72 a	52,73 ±2,45 a

Las comparaciones estadísticas de las variables de crecimiento están realizadas dentro de cada una de las variables, considerando todos los tratamientos empleando ANOVA (p<0,001) y prueba de comparación de medias *post hoc* de Tukey (α=0,05).

chados por cada 100 semillas en cada uno de los tratamientos, empleando 15 réplicas por tratamiento.

Análisis estadísticos

Los datos obtenidos fueron analizados a través de ANOVA, tras previa comprobación del cumplimiento de los supuestos del análisis de varianza. Se realizaron comparaciones *post hoc* de medias (Prueba de Tukey), empleando para ello el programa *SSPS Statistics* v.17.0.

Resultados y Discusión

Efecto biocontrolador in vitro de Trichoderma spp. sobre P. grisea

Se estudió la eficacia de las cepas TV72 y TV190 en el control *in vitro* de la principal enfermedad del cultivo de arroz en Venezuela y el mundo, la piriculariosis, causada por el hongo fitopatógeno *Pyricularia grisea*. Se evaluó el efecto de diferentes compuestos sobre el crecimiento del fitopatógeno; como lo son los compuestos extracelulares producidos por el biocontrolador, compuestos volátiles y compuestos volátiles + permeables (Tabla I).

El efecto de los compuestos extracelulares incluye el de aquellos metabolitos excretados constitutivamente por el hongo, al ser crecido en cultivo líquido y que presentan una actividad antibiótica sobre *P. grisea*. En el caso de las placas divididas, al realizar el cultivo dual, la inhibición del crecimiento del fitopatógeno se debería en principio a todos aquellos compuestos producidos por el hongo que podrían volatilizarse hasta el otro lado de la placa dividida, debido a que di-

cha división constituye una barrera que impide el paso de compuestos permeables en el medio de cultivo. Por último, en los ensayos con placas no divididas, toda aquella inhibición del crecimiento que ocurriese antes del contacto entre el antagonista y el fitopatógeno será debido al efecto sinérgico de los compuestos extracelulares producidos tanto de naturaleza permeable como volatizable.

Al evaluar la actividad antifúngica de las cepas TV72 y TV190 sobre *P. grisea* a nivel *in vitro* se pudo determinar que ambas cepas son capaces de producir compuestos volátiles, permeables y extracelulares inhibitorios, induciendo reducciones en el crecimiento de *P. grisea* (Tabla I). La mayor inhibición se produjo en el sistema de compuestos volátiles + permeables (~52%), seguido del sistema de compuestos extracelulares (~22%) y la menor inhibición se reportó en el sistema de compuestos volátiles (~18%). *Trichoderma* spp. ha sido reportado como organismo productor de numerosos compuestos antibióticos, como pironas, isocianatos, péptidos, peptabols, ácido harziánico, alameticinas, tricolinas, 6-pentil-α-pironas, massoilactonas, viridina, gliovirina, glisopreninas, ácido heptelídico y tricotecenos (Vey *et al.*, 2001; Ozbay y Newman, 2004; Vinale *et al.*, 2008). Los compuestos volátiles son de bajo peso molecular y pueden jugar un papel importante en el biocontrol, al crear una microatmósfera con compuestos antibióticos a nivel edáfico o foliar, que por lo general son de naturaleza fungistática, dependiendo del sitio de inoculación del antagonista (Mohiddin *et al.*, 2010). Por su parte, compuestos

secretados de forma extracelular como son enzimas líticas (tales como proteasas, amilasas, celulasas, glucanasas y quitinasas) y compuestos no volátiles difusibles en el medio de cultivo, ejercen un efecto notable sobre diferentes patógenos de plantas promoviendo eventos de micoparasitismo (Benítez *et al.*, 2004; Anand y Reddy, 2009).

Para el caso de los compuestos extracelulares, si bien se observaron actividades inhibitorias para ambas cepas, sólo se incluyen en este ensayo todos los compuestos excretados al medio que se expresan de forma constitutiva o que su producción no es inducida por la presencia del fitopatógeno. Resultaría conveniente en ese sentido, estudiar la inhibición *in vitro* del fitopatógeno por efecto de compuestos extracelulares incluyendo micelios de *P. grisea* para inducir la producción de otras sustancias de naturaleza inhibitoria, que sólo podrían producirse en presencia del fitopatógeno.

Efecto de Trichoderma spp. sobre la germinación, desarrollo de plántulas y colonización radical en O. sativa

Una de las etapas del crecimiento del arroz donde existe mayor predisposición a diferentes daños de origen biótico y abiótico es en el desarrollo inicial, cuando el follaje y otras partes aéreas aún se encuentran jóvenes y frágiles (De la Isla, 1994). Por esta razón, resulta fundamental conocer si *Trichoderma* spp. es capaz de mejorar la condición de la planta en esta etapa del desarrollo. Las variables de crecimiento en estado de plántula

TABLA II
VARIABLES GERMINATIVAS Y DE DESARROLLO DE PLÁNTULAS DE *O. sativa*,
TRATADAS CON O SIN *Trichoderma* SPP.

	Control	<i>T. harzianum</i> (TV72)	<i>T. asperellum</i> (TV190)
Germinación a los 7 días (%)	99,67 ±1,05 a	99,00 ± 1,61 a	98,67 ± 1,72 a
Longitud del coleóptilo (mm)	21,34 ±5,21 a	20,49 ± 4,49 a	19,90 ± 4,45 a
Longitud de la radícula (mm)	11,10 ±1,52 a	15,09 ± 1,52 c	13,62 ± 1,73 b
Masa seca del coleóptilo (mg)	1,50 ±0,23 a	1,70 ± 0,25 a	1,51 ± 0,19 a
Masa seca de la radícula (mg)	1,56 ±0,14 a	1,89 ± 0,17 c	1,62 ± 0,16 b
Velocidad de emergencia (semillas/día)	40,57 ±0,76 a	41,96 ± 0,56 b	43,54 ± 0,56 c

Las letras distintas indican diferencias significativas entre los tratamientos.

presentaron diferencias significativas respecto al grupo control, excepto para la longitud y peso del coleóptilo ($\chi^2= 4,635$; $p=0,099$) y la germinación de la semilla (Tabla II). La cepa que indujo mayor promoción sobre el crecimiento de la radícula fue TV72 (*T. harzianum*), tanto en la longitud (15,09 ±1,52cm) como en el peso (1,89 ±0,17g), en comparación con el control (11,10 ±1,52cm de longitud y 1,56 ±0,14g de masa seca radicular). A pesar de no haber detectado diferencias significativas en los porcentajes de germinación a los siete días, sí se logró observar diferencias en la velocidad de germinación, siendo TV190 (*T. asperellum*) la cepa con mayor efecto sobre esta variable con 43,54 ±0,56 semillas por día en comparación con el control (40,57 ±0,76 semillas por día). El efecto de *Trichoderma* spp. en la germinación de semillas de *O. sativa* y el desarrollo en estadios iniciales encontrados en este trabajo, difiere parcialmente de lo reportado por Mishra y Sinha (2000) y Khan *et al.* (2005), quienes empleando *T. virens*, *T. harzianum* y otras cepas fúngicas y bacterianas obtuvieron un incremento en la germinación entre 26,3 y 56,2%; así como un incremento de la longitud radical, altura de las plántulas y peso fresco de las mismas. Por otra parte, Windham *et al.* (1986) también observaron incrementos en las velocidades de germinación en semillas de tabaco, tomate y maíz empleando cepas de *T. koningii* y *T. harzianum*, por lo que la respuesta bioestimulante del crecimiento durante este estadio parece ser variable, dependiendo de la cepa y organismo vegetal empleado.

Colonización por Trichoderma spp. de suelo inundado, promoción del crecimiento vegetativo y variables de producción en O. sativa

En relación a la presencia y colonización de *Trichoderma* spp. en el suelo (Figura 1), se observa que en el tratamiento control en ningún nivel de lámina de agua se encontró presencia de *Trichoderma* spp., mientras que sí hubo presencia en los respectivos tratamientos con las cepas del hongo. No se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos con hongos en ninguna de las láminas de agua, a pesar de que con una lámina de agua de 15cm el porcentaje de muestras con *Trichoderma* spp. fue el más bajo (80%), probablemente debido al mayor nivel de anaerobiosis de estos tratamientos. Ha sido reportado que *Trichoderma* spp. presenta un metabolismo anaerobio facultativo (Moore-Landeker, 1996), lo cual podría permitirle permanecer viable en el material edáfico en condiciones de inundación. Algunos estudios han demostrado que diferentes especies de *Trichoderma* como *T. harzianum*, *T. viride* y *T. atroviride* son capaces de crecer y ser aislados en estos ambientes (Khalili *et al.*, 2012). Los resultados del presente estudio sugieren la inclusión de *T. asperellum* dentro de este grupo de cepas capaces de permanecer viable en suelos anegados.

En relación a la promoción del crecimiento vegetativo en *O. sativa* por parte de *Trichoderma* spp., se puede apreciar en la Tabla III los resultados de cada variable de crecimiento medidas, en función de la lámina de

agua y la cepa de *Trichoderma* utilizada.

Para el caso del número de hojas, los mayores valores fueron obtenidos sin lámina de agua (Control: 12,5 ±0,52; TV72: 14,8 ±0,36; TV190: 15,05 ±0,52), seguidos por aquellas con 5cm de lámina de agua, con una tendencia donde los controles fueron menores que las plantas tratadas con *Trichoderma* spp. Los grupos tratados con 15cm de lámina no difirieron estadísticamente por la adición de los agentes bioestimulantes.

La longitud, ancho y número de tallos presentaron resultados similares (Tabla III), donde en las plantas con 0 y 5cm de lámina de agua, aquellas tratadas con las cepas de *Trichoderma* spp. superaron a las plantas control en ~20%; sin embargo, aquellas sometidas a regímenes de 15cm de lámina de agua no difirieron

estadísticamente entre las tratadas con y sin *Trichoderma* spp. Todos estos resultados parecen sugerir la mejor actuación de *Trichoderma* spp. en condiciones de menor anegación. En efecto, el grupo más afectado por los regímenes hídricos para estas variables fue el de lámina de agua de 15cm, ya que al realizar el incremento, el número de hojas disminuye por ahogamiento (Blom y Voesenek, 1996). Hattori *et al.* (2001) describen dos estrategias principales en *O. sativa* para responder ante la inundación: una primera es denominada quiescente y permite a la planta sobrevivir por periodos cortos; y una segunda estrategia denominada de escape y elongación de los tallos que es más efectiva y que permite a la planta sobrellevar eficazmente estas condiciones de inundación, tal como lo hizo la variedad Cimarrón, empleada en esta investigación, al adquirir un fenotipo de pocos tallos, largos y gruesos, así como un menor número de hojas.

En relación a la longitud y biomasa radical, no se evidenciaron diferencias significativas entre las plantas tratadas con o sin *Trichoderma* spp. para una misma lámina de agua. Sin embargo, las raíces de menor longitud fueron aquellas sometidas a láminas de agua de 5cm (~20cm), seguidas por las de 15cm (~23cm); mientras que las de mayor longi-

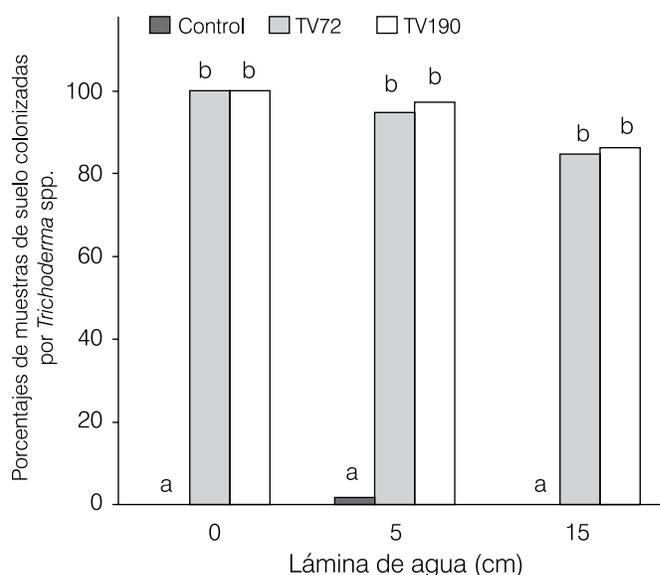


Figura 1. Porcentaje de muestras de suelo colonizadas por *Trichoderma* spp. en diferentes niveles de lámina de agua a las ocho semanas después de la siembra ($\chi^2= 60,833$; $p<0,001$).

Tabla III
 VARIABLES DE CRECIMIENTO VEGETATIVO DE *O. sativa* VAR. CIMARRÓN EN PRESENCIA DE DIFERENTES ALTURAS DE LÁMINAS DE AGUA DURANTE SU DESARROLLO, ASÍ COMO DE CEPAS DE *Trichoderma* SPP.

Lámina de agua (cm)	Cepa	Variables de crecimiento (promedio ±error estándar)						
		Nº de hojas	Nº de tallos	Longitud tallo (cm)	Ancho tallo (cm)	Longitud radical (cm)	Biomasa radical (g)	Biomasa aérea (g)
0	Control	12,50 ±0,52 c	4,80 ±0,20 c	10,19 ±0,14 a	4,95 ±0,13 a	24,35 ±0,61 cd	0,31 ±0,01 a	0,38 ±0,02 a
	TV72	14,80 ±0,36 d	6,05 ±0,20 d	10,93 ±0,13 a	5,67 ±0,09 bcd	25,16 ±0,59 d	0,35 ±0,02 a	0,48 ±0,02 ab
	TV190	15,05 ±0,52 d	5,95 ±0,38 d	11,02 ±0,22 a	5,52 ±0,11 bc	24,19 ±0,58 cd	0,37 ±0,01 a	0,42 ±0,02 ab
5	Control	9,80 ±0,47 b	3,40 ±0,17 b	12,60 ±0,25 b	5,12 ±0,10 ab	20,25 ±0,55 a	0,92 ±0,03 d	0,52 ±0,02 bc
	TV72	10,90 ±0,32 bc	4,40 ±0,21 c	13,54 ±0,22 bc	5,78 ±0,09 cd	20,93 ±0,57 a	1,07 ±0,06 d	0,66 ±0,04 de
	TV190	12,30 ±0,50 c	4,45 ±0,25 c	13,73 ±0,33 c	5,94 ±0,13 cde	21,18 ±0,61 ab	0,96 ±0,05 d	0,74 ±0,05 e
15	Control	5,80 ±0,12 a	1,80 ±0,12 a	14,44 ±0,24 cd	5,89 ±0,15 bcd	22,60 ±0,56 abc	0,61 ±0,03 b	0,44 ±0,02 ab
	TV72	5,80 ±0,12 a	2,00 ±0,16 a	14,72 ±0,12 d	6,10 ±0,14 de	23,49 ±0,48 bcd	0,61 ±0,02 b	0,50 ±0,01 bc
	TV190	5,95 ±0,09 a	2,05 ±0,09 a	14,94 ±0,22 d	6,39 ±0,17 e	23,84 ±0,40 cd	0,72 ±0,03 bc	0,61 ±0,03 cd

Las comparaciones estadísticas de las variables de crecimiento están realizadas dentro de cada una de las variables, considerando todos los tratamientos empleando ANOVA ($p < 0,001$) y prueba de comparación de medias *post hoc* de Tukey ($\alpha = 0,05$). Los valores de los Controles están resaltados en negrita.

tud fueron las crecidas bajo condiciones de secano (~25cm, independientemente de si fueron o no tratadas con *Trichoderma* spp.). En relación a la biomasa seca radical, se evidenció que aquellas plantas sometidas a condiciones de secano obtuvieron los menores valores (~0,3g). Con respecto a la biomasa seca aérea, se observaron diferencias significativas entre el control y los tratamientos con *Trichoderma* spp., siendo esta diferencia mayor a un nivel de lámina de agua de 5cm, donde el tratamiento control obtuvo 0,52 ±0,02g y los grupos con *Trichoderma* spp. 0,66 ±0,04g (TV72) y 0,74 ±0,05g (TV190), con diferencias significativas. Similar tendencia se observó en el tratamiento con lámina de agua de 15cm. En los tratamientos sin lámina de agua no se observaron diferencias significativas, con un valor para el control de 0,38 ±0,02g. Mostajeran y Rahimi (2009) destacan la importancia del régimen hídrico sobre las variables de crecimiento como la biomasa seca, donde un régimen hídrico de secano, inhibe notoriamente el desarrollo vegetal en *O. sativa*.

En este sentido, Howell *et al.* (1999) encontraron diferencias significativas en la biomasa aérea entre las plantas tratadas con y sin *Trichoderma* spp. Esta tendencia es diferente a la encontrada en las fases iniciales del desarrollo de las plántulas de *O. sativa* en la presente investigación, donde sí se evidenció un incremento en el desarrollo de las raíces de plántulas tratadas con

Trichoderma spp., pero no así en variables de crecimiento aéreo.

En *O. sativa*, el producto final de interés se centra en la producción de granos (Palacios y Pauth, 2008); por lo que se evaluó el efecto de diferentes láminas de agua, con o sin *Trichoderma* spp., en variables relacionadas con la producción: tiempo de aparición de la espiga, producción en granos por planta e incidencia del manchado del grano (Tabla IV). El tiempo de aparición de la espiga fue estadísticamente diferente entre los tratamientos en condiciones de secano (13 semanas) y con presencia de lámina de agua (8 semanas). Una diferencia notable de cerca de un mes entre los tiempos de producción podría tener una incidencia importante en términos económicos de mantenimiento del cultivo y rapidez para realizar la cosecha. No se encontraron diferencias por la aplicación de *Trichoderma* spp. para esta variable.

La producción en granos por planta presentó diferencias significativas entre el control y los tratamientos con *Trichoderma* en láminas de agua de 5 y 15cm (Tabla IV). En la última condición, los valores en el caso de TV72 llegan a duplicarse en relación al control. No se evidenciaron diferencias significativas en el tratamiento sin lámina de agua. Cuevas (2006), en un estudio de campo, reportó diferencias significativas entre tratamientos control y con *T. pseudokoningii* para la variable de producción granos descascarados. Sin embargo, Torres-Montenegro (2005), no re-

portó diferencias estadísticas en el rendimiento empleando un producto comercial con base en *T. harzianum* (Trichozam WP 8.3[®]) y realizando aplicaciones a la semilla y reinoculaciones foliares a los 30 y 60 días. Las diferencias obtenidas con respecto a estos autores pueden ser debidas a las reinoculaciones semanales al suelo y/o a una capacidad bioestimulante superior de las cepas estudiadas, por lo cual se recomienda seguir esta metodología y evaluar el intervalo de tiempo necesario entre reinoculaciones, para mantener este efecto promotor del crecimiento.

En la Tabla IV se muestran los porcentajes de granos manchados por tratamiento con lámina de agua y cepa de *Trichoderma*, observándose diferencias significativas entre el control y los tratamientos con *Trichoderma* en todas las láminas de agua. Es de hacer notar que en la lámina de agua de 15cm, el porcentaje de granos manchados es aproximadamente el doble en el tratamiento control (6,33 ±0,44%) en comparación a los tratamientos con *Trichoderma* (TV72: 3,86 ±0,31%; TV190: 3,60 ±0,41%). De esta forma se evidencia el efecto protector del antagonista en la incidencia de la enfermedad en aquellos tratamientos en condiciones de secano o con lámina de agua.

Al analizar en conjunto las variables de producción y calidad del grano, se evidencia que los menores valores de producción y mayor incidencia del manchado del grano se obtuvie-

ron en las plantas en condiciones de secano, donde los factores déficit hídrico e incidencia de la enfermedad están vinculados estrechamente, causando una baja producción. Reportes de otros autores indican que la incidencia de la enfermedad puede ocasionar una disminución de más del 40% de la producción (Palacios y Pauth, 2008).

La capacidad de *Trichoderma* spp. para controlar el manchado del grano en arroz ha sido demostrada previamente por Khalili *et al.* (2012) empleando *T. harzianum*, *T. virens* y *T. atroviride* para controlar *in vitro* e *in vivo* a *Bipolaris oryzae*, un agente causal del manchado del grano. Torres-Montenegro (2005), en condiciones de campo, encontró que *T. harzianum* (Trichozam WP 8.3[®]) no resultó efectivo en el control de esta enfermedad. La aplicación de *Trichoderma* spp. en el presente estudio condujo a una reducción en todos los tratamientos de la incidencia del manchado de grano, así como un incremento de la producción de granos, por lo que el tratamiento del cultivo de arroz con *Trichoderma* podría actuar mejorando los mecanismos de defensa de la planta, promoviendo el desarrollo e incrementando significativamente la producción y calidad de los granos.

Conclusiones

Las cepas de *Trichoderma* TV72 (*T. harzianum*) y TV190 (*T. asperellum*), incrementaron la velocidad de germinación, la

TABLA IV
VARIABLES ASOCIADAS A LA PRODUCCIÓN EN *O. sativa* VAR. CIMARRÓN EN PRESENCIA DE DIFERENTES ALTURAS DE LÁMINAS DE AGUA DURANTE SU DESARROLLO, ASÍ COMO DE CEPAS DE *Trichoderma* SPP.

Lámina de agua (cm)	Cepa	Variables asociadas a la producción		
		Aparición de la espiga (semanas)	Producción de granos con cáscara en masa seca (g/planta)	Granos manchados (%)
0	C	13,67 ±0,32 b	0,42 ±0,09 a	21,20 ±0,86 d
	TV72	13,03 ±0,31 b	0,71 ±0,08 a (41%)	13,20 ±0,81 c (38%)
	TV190	12,83 ±0,26 b	1,03 ±0,20 a (60%)	11,60 ±0,90 c (45%)
5	C	8,83 ±0,13 a	3,25 ±0,32 bc	6,20 ±0,35 b
	TV72	8,77 ±0,10 a	4,88 ±0,44 d (33%)	4,13 ±0,36 ab (34%)
	TV190	8,73 ±0,58 a	4,64 ±0,38 d (30%)	3,80 ±0,33 a (39%)
15	C	8,77 ±0,12 a	2,70 ±0,33 b	6,33 ±0,44 b
	TV72	8,56 ±0,09 a	4,61 ±0,35 d (42%)	3,86 ±0,31 a (40%)
	TV190	8,47 ±0,10 a	4,20 ±0,41 cd (36%)	3,60 ±0,41 a (44%)

Las comparaciones estadísticas de las variables de crecimiento están realizadas dentro de cada una de las variables, considerando todos los tratamientos empleando ANOVA ($p < 0,001$) y prueba de comparación de medias *post hoc* de Tukey ($\alpha = 0,05$). Los porcentajes reportados son referidos al control (C).

masa seca y longitud radicular en estadios iniciales de desarrollo de *O. sativa* var. Cimarrón, así como el crecimiento vegetativo en condiciones de secano e inundación, permaneciendo viables en estas condiciones.

En la producción y calidad del grano de *O. sativa*, se obtuvieron rendimientos bajos para secano y los mayores para una lámina de agua de 5cm. En los casos con láminas de agua de 5 y 15cm, las plantas tratadas con *Trichoderma* presentaron mayores valores de producción; así como una notable disminución de la incidencia del manchado del grano.

Las cepas TV72 y TV190 son cepas promisorias para el control de *P. grisea* por su actividad antagonista extracelular, productora de compuestos volátiles y permeables.

Se recomienda el uso de lámina de agua de 5cm al realizar aplicaciones de *Trichoderma* spp. en el cultivo de arroz, ya que con láminas de agua superiores se podría afectar la actuación del hongo.

Se requiere realizar ensayos de campo a gran escala aplicando estas cepas de *Trichoderma*, desde la semilla y con reinoculaciones durante el ciclo de cultivo, para corroborar estos efectos benéficos en condiciones de producción industrial.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a William Castrillo (Instituto Nacional

de Investigaciones Agrícolas, Guárico, Venezuela) por la donación de semillas de *O. sativa* L. var. Cimarrón y suelo de arrozal para los ensayos de vivero; a Alex González (Fundación DANAC, Yaracuy, Venezuela) por la donación de la cepa de *P. grisea*; a Asdrúbal Arcia (Universidad Central de Venezuela, Aragua, Venezuela) por el apoyo en la elaboración del marco metodológico y análisis estadísticos y a Oscar Valbuena y Carlos Moreno (Unidad de Investigación en Biotecnología Aplicada, Universidad de Carabobo) por la revisión del manuscrito.

REFERENCIAS

Acebo Y, Hernández A, Rives N, Velázquez M, Hernández A (2011) Perspectivas del uso de bacterias rizosféricas en el control de *Pyricularia grisea* (Cooke Sacc.) en el cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.). *Rev. Col. Biotecnol.* 8: 16-22.

Anand S, Reddy J (2009) Biocontrol potential of *Trichoderma* sp. against plant pathogens. *Int. J. Agric. Sci.* 2: 30-39.

Benítez T, Rincón A, Limón M, Codón A (2004) Biocontrol mechanisms of *Trichoderma* strains. *Int. Microbiol.* 7(4): 249-260.

Blom C, Voeselek L (1996) Flooding: the survival strategies of plants. *Tree* 11(7): 290-295.

Cárdenas R, Mesa S, Polón S, Pérez N, Cristo E, Fabrè L, Hernández J (2010) Relación entre la incidencia de la piriculariosis (*Pyricularia grisea* Sacc.) del arroz (*Oryza sativa* Lin.) y diferentes variables climáticas en

el complejo agroindustrial arrocero Los Palacios. *Cult. Trop.* 31: 14-18.

Cuevas V (2006) Soil inoculation with *Trichoderma pseudokoningii* Rifai enhances yield of rice. *Philp. J. Sci.* 135: 31-37.

De la Isla L (1994) *Fitopatología*. 1ª ed. Limusa. México. 384 pp.

Hattori Y, Nagai K, Ashikari M (2001) Rice growth adapting to deepwater. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 100-105.

Howell C (2003) Mechanism employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Dis.* 87: 4-10.

Howell C, Hanson L, Stipanovic R, Puckhaber L (1999) Induction of terpenoid synthesis in cotton roots and control of *Rhizoctonia solani* by seed treatment with *Trichoderma virens*. *Phytopathology* 90: 248-252.

Kaewchai S, Soyong K, Hyde K (2009) Mycofungicides and fungal biofertilizers. *Fungal Divers.* 38: 25-50.

Khalili E, Sadravi M, Naeimi S, Khosravi V (2012) Biological control of rice brown spot with natives isolates of three *Trichoderma* species. *Braz. J. Microbiol.* 43: 297-305.

Khan A, Sinha A, Rathi Y (2005) Plant growth promoting activity of *Trichoderma harzianum* on rice seed germination and seedling vigor. *Ind. J. Agric. Res.* 39: 256-262.

Kim Y, Baik J, Kim E, Kim K (2004) Sectors from *Pyricularia grisea* isolates on edifenphos and iprobenfos-amended media. *J. Plant Pathol.* 20: 244-246.

Maguire J (1962) Speed of germination. Aid in selection and evalu-

ation for seedling emergence and vigor. *Crop Sci.* 2: 176-177.

Mishra D, Sinha A (2000) Plant growth-promoting activity of some fungal and bacterial agents on rice seed germination and seedling growth. *J. Trop. Agric.* 77: 188-191.

Mohiddin F, Khan M, Bhat B (2010) Why *Trichoderma* is considered super hero (super fungus) against the evil parasites?. *Plant Pathol. J.* 9(3): 92-102.

Moore-Landeker E (1996) *Fundamentals of the Fungi*. Prentice Hall. Upper Saddle River, NJ, EEUU. 574 pp.

Mostajeran A, Rahimi E (2009) Effects of drought stress on growth and yield of rice (*Oryza sativa* L.) cultivars and accumulation of proline and soluble sugars in sheat and blades of their different stages leaves. *Am.-Euras. J. Agric. Environ. Sci.* 5: 264-272.

Ozby N, Newman S. (2004). Biological control with *Trichoderma* spp. with emphasis on *T. harzianum*. *Pak. J. Biol. Sci.* 7: 478-484.

Palacios E, Pauth M (2008) *Evaluación Avanzada de Nuevas Líneas de arroz (Oryza sativa L.) con Resistencia Al Manchado Del Grano, Valle de Sébaco, 2007-2008*. Tesis. Universidad Nacional Agraria. Nicaragua. 45 pp.

Rodríguez H, Nass H, Alemán L (1988) Incidencia y control del manchado del grano en arroz. *Fitopatol. Ven.* 1: 5-7.

Sisterna M, Lori G, Marassi J (1994) Sintomatología y hongos asociados al manchado del grano de arroz en el cultivar Irga 409. *Rev. Fac. Agron. La Plata.* 70: 13-21.

Torres-Montenegro L (2005) *Efecto de la Aplicación de Trichoderma harzianum para el Control de Rhizoctonia solani en la Variedad de Arroz INTA N1 Bajo Inundación en Sébaco, Nicaragua*. Tesis. Escuela Agrícola Panamericana. Honduras. 27 pp.

Vey A, Hogland R, Butt T (2001) Toxic metabolites of fungal biocontrol agents. En *Fungi as Biocontrol Agents: Progress, Problems and Potential*. CABI. Nueva York, EEUU. pp. 311-346.

Vinale F, Sivasithamparam K, Ghisalberti E, Marra R, Woo S, Lorito M (2008) *Trichoderma-plant-pathogen interactions*. *Soil Biol. Biochem.* 40: 1-10.

Windham M, Elad Y, Baker R (1986) A mechanism for increased plant growth induced by *Trichoderma* spp. *Phytopathology* 76: 518-521.