

Aislamiento y caracterización de *Pyricularia grisea* de variedades de arroz cultivadas en el Departamento San Javier¹

Manuel Bouvet²

²Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Litoral (UNL), Kreder 2805, Esperanza (3080HOF), Argentina

Área: Ingeniería.

Sub-área: Agronomía.

INTRODUCCIÓN

En la mayoría de los lugares donde se siembra arroz, *Pyricularia grisea* es un organismo causal de una de las enfermedades principales que dañan al cultivo. La enfermedad ocasiona desde una simple reducción de calidad en el producto final hasta una pérdida de más del 80% en rendimiento y calidad (Livore y Arguissain, 2004).

Según Pedraza (2013) los síntomas pueden aparecer en cualquier estado de desarrollo, afecta hojas, nudos de tallos, base de la lámina de la hoja bandera (collar) y panoja (raquis principal y secundarios y glumas).

En algunos casos la observación directa es insuficiente para identificar el patógeno; otras veces puede revelar la presencia de organismos contaminadores los cuales pueden estar o no relacionados con la enfermedad. Es necesario entonces realizar el aislamiento y la obtención de cultivos puros de los patógenos presentes, para lograr el diagnóstico correcto del agente causal de la enfermedad observada.

OBJETIVO

Aislar y caracterizar fenotípica y morfológicamente cepas de *Pyricularia grisea* obtenidas a partir de muestras recolectadas en lotes comerciales de arroz del Departamento San Javier, Provincia de Santa Fe.

METODOLOGÍA

Recolección de muestras a campo y su conservación

El estudio se realizó a partir de 5 muestras infectadas con *Pyricularia grisea*, recolectadas en 3 sitios diferentes del Departamento San Javier, Provincia de Santa Fe, durante la campaña 2014 – 2015. En la Tabla 1 se listan los datos de origen de cada una de las muestras.

Para la recolección, se seleccionó material con síntomas típicos de la enfermedad: a) en hojas, lesiones en forma de rombo, con centro gris, borde marrón y de tamaño variable (de 4 mm a 4 cm); b) en panojas, pudrición de cuello (Pedraza, 2012). Para el reconocimiento de dichos síntomas a campo se consultó el Manual de Reconocimiento de Enfermedades Fúngicas en el Cultivo de Arroz (2012) y una vez seleccionado el material a recolectar se siguió el procedimiento desarrollado por el Programa de Patología de arroz del CIAT, (Aricapa y Correa, 2004) para su traslado hasta el laboratorio y su posterior conservación a -18°C hasta el momento de realizar los aislamientos.

¹ **Título del proyecto:** Recursos hídricos y tierras vulnerables. Sostenibilidad de la producción agroalimentaria en humedales de la Cuenca de los Saladillos (Santa Fe).

Director del Proyecto: Marano, Paulo Roberto.

Director de la Cientibeca: Marano, Paulo Roberto.

Co-Directora de la Cientibeca: Maumary, Roxana Lorena.

Co-Autores: Pedraza, María Virginia y Asselborn, Miriam.

Tabla 1. Establecimiento y cultivar de arroz del punto de muestreo, fechas de recolección, estado fenológico del cultivo y parte de la planta que se colectó con lesiones sospechosas de *Pyricularia grisea*.

N° de muestra	Establecimiento	Cultivar del cuál fue recolectado	Fecha de recolección	Estado fenológico del cultivo (*)	Parte de la planta
1	Waldo	GURÍ INTA CL	13/03/2015	R9	Cuello de panoja
2	La Milagrosa	GURÍ INTA CL	19/12/2014	R0	Hojas
3	La Milagrosa	GURÍ INTA CL	05/02/2015	R8	Cuello de panoja
4	San Antonio	PUITÁ INTA CL	13/03/2015	R9	Cuello de panoja
5	San Antonio	PUITÁ INTA CL	13/03/2015	R9	Hojas

(*)Escala fenológica utilizada: Counce, et. al (2000).

Aislamiento de *Pyricularia grisea*

Se realizó en el Laboratorio de Fitopatología de la Estación Experimental Agropecuaria Concepción del Uruguay (INTA) siguiendo un procedimiento similar al desarrollado por el Programa de Patología de arroz del CIAT, (Aricapa y Correa, 2004).

Se seleccionaron lesiones de las muestras conservadas y se sometieron a una desinfección seriada. Posteriormente, entre 2 y 4 trozos de tejido enfermo fueron sembrados en cajas de Petri con agar-salvado de arroz con antibiótico (ASA+Ant) e incubados a 26°C de temperatura, bajo iluminación blanca constante, durante 48 h. El micelio con características de *Pyricularia grisea* crecido sobre el tejido fue repicado sucesivas veces (entre 2 y 4) hasta obtener cultivos con apariencia pura.

Seguidamente, se realizaron cultivos monospóricos a partir de los aislamientos previamente logrados, siguiendo el "método de ubicar en placas" (French y Hebert, 1980). Se realizaron suspensiones de esporas de cada aislamiento en 2 mL de agua destilada estéril dentro de tubos Eppendorf y se agitaron en un Vortex durante 5 minutos. Se vertió la suspensión en placas de Petri con agar-agua y con una espátula de Drigalsky se separaron las esporas sobre la superficie del medio de cultivo. Luego, con un microscopio Zeiss (400-1000X) se ubicaron esporas germinadas aisladas y con un sacabocado (Keyworth Isolator), montado en lugar del objetivo 100X, se procedió a cortar pequeños cilindros de agar que las contenían, transfiriéndolos separadamente con una aguja estéril a nuevas placas con ASA+Ant para que se desarrollen cultivos monospóricos.

Almacenamiento del hongo en papel filtro

Se realizó el almacenamiento de los cultivos monospóricos siguiendo el procedimiento descrito por Aricapa y Correa (2004). De esta manera se logró conservar de forma ordenada varias réplicas de cada aislamiento monospórico obtenido, colocando los sobres dentro de cajas plásticas, en heladera a 4°C, para su posterior utilización.

Caracterización fenotípica y morfológica del agente causal

Se utilizó una lupa estereoscópica binocular (40X) para observar las características macroscópicas de desarrollo de las colonias (aspecto del micelio, color y forma). Para caracterizar las estructuras asexuales del hongo (conidios) se observaron preparados del mismo en un microscopio óptico binocular Olympus CH30 (400 – 1000X) con uno de sus oculares micrométrico calibrado. Sobre estos preparados se tomaron fotografías con una cámara Sony DSC-HX30V con zoom óptico de 20X para ser luego

analizadas con el software Image – Pro Plus 6.0. Los parámetros evaluados fueron: longitud y ancho de conidios, forma, cantidad de tabiques y color de los conidios.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Aislamientos logrados

De todos los sitios muestreados, solo se pudo lograr aislamientos en 3 de ellos (muestras 2, 3 y 4 de la Tabla 1). El cultivo de la muestra 5 se contaminó con hongos saprófitos y se descartó. La muestra 1 no fue considerada debido a que las muestras efectivamente consideradas tenían la representatividad necesaria para el estudio en cuestión. En las Figuras 1 y 2 se puede observar cómo se preparan los aislamientos para su conservación.

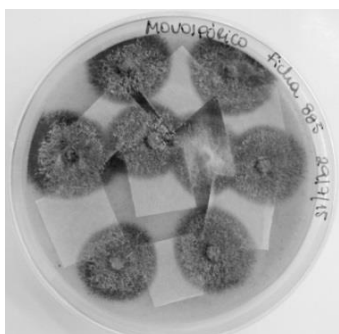


Figura 1. Colonias de *Pyricularia grisea* colonizando trozos de papel de filtro para su almacenamiento.

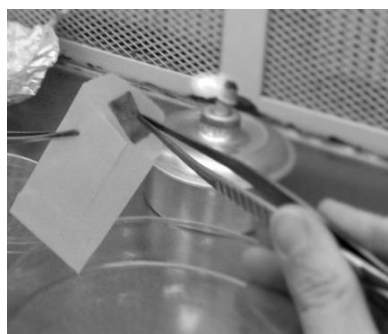


Figura 2. Colocación de papeles de filtro dentro de sobres de papel estériles para su conservación.

En Argentina, la EEA Concepción del Uruguay del INTA dispone de una colección de 335 aislamientos monospóricos de *Pyricularia grisea*, realizados desde el año 2000 a 2013, de toda el área argentina productora de arroz y países vecinos. En su mayoría son de Corrientes, Entre Ríos, Formosa y solo 12 pertenecen a la provincia de Santa Fe. Considerando que en la zona de San Javier (Santa Fe) la enfermedad se presenta con mayor frecuencia, la incorporación de aislamientos de dicho lugar realizados en el presente trabajo, enriquece y aporta valioso material para ser utilizado, por ejemplo, en la caracterización poblacional del patógeno, en el estudio del comportamiento de variedades comerciales a las formas presentes del patógeno en la región, o en el mejoramiento por resistencia a esta enfermedad.

Caracterización

Las características macroscópicas de las colonias presentaron una gran alteración según el aislamiento y el medio de cultivo utilizado. Si bien no existe una técnica que permita cuantificar el micelio aéreo, visualmente se observaron diferencias en espesor y densidad, desde formas delgadas y compactas hasta gruesas y de menor densidad (consistencia algodonosa). En cuanto a colores, se observaron tonos blancuzcos o crema, pasando por gris, hasta oliva oscuro, coincidiendo estas observaciones con las detalladas por Ou (1984).

Los conidios resultaron ser variables en tamaño y forma (Figura 3), generalmente piriformes, de base redondeada, ápice reducido, con dos tabiques, a veces ligeramente constreñidos en los tabiques, casi hialinos a un color oliva pálido. Se observó que los conidios germinaron desde la célula apical o basal y, con menos frecuencia, desde la célula media. Las dimensiones de los conidios (n=10) están

comprendidas en un rango de: 17,1 – 21,8 x 6,4 – 8,9 μm (promedio: 18,9 x 7,3 μm), magnitudes que también fueron documentadas por Ou (1984).

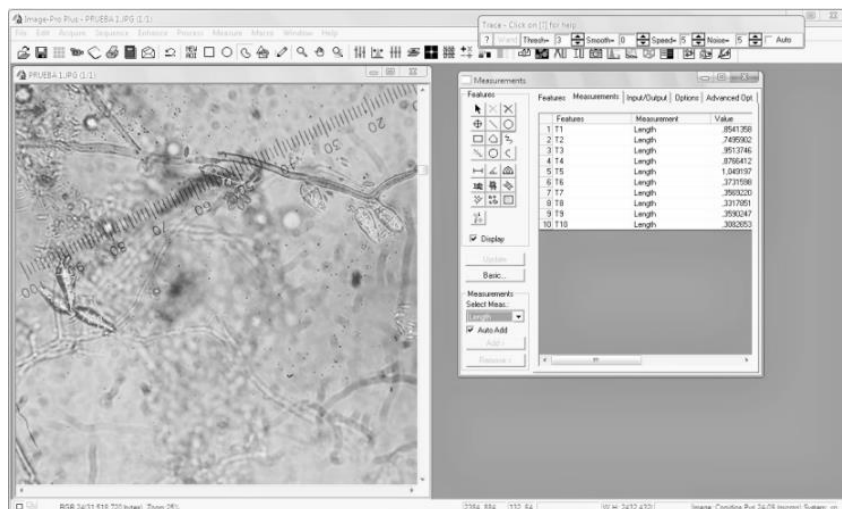


Figura 3. Dimensionamiento de conidios con el Software Image-Pro Plus a partir de imágenes tomadas al microscopio (400X).

CONCLUSIONES

Se logró una colección regional de aislamientos monospóricos de *Pyricularia grisea* obtenidos de muestras recolectadas bajo diferentes condiciones, que se agrega a la extensa colección existente en la EEA Concepción del Uruguay (INTA). Estos aislamientos permanecen conservados para ser reactivados cuando se desee y utilizados en diversos tipos de experimentos.

La descripción fenotípica y morfológica permitió identificar el hongo a nivel de especie. Se encuentran en marcha pruebas de patogenicidad sobre líneas diferenciales con genes de resistencia conocidos, para determinar razas dentro de la especie.

BIBLIOGRAFÍA

- Aricapa M. G., Correa F. V.,** 2004. Recolección de muestras para aislar *Pyricularia grisea* (Sacc.). Protocolo inédito, 1-3.
- Counce P., Keisling T. C., Mitchell A. J.,** 2000. A Uniform, Objective, and Adaptive System for Expressing Rice Development. Published in Crop Sci. 40, 436–443 [online] Disponible en la World Wide Web en http://bumperscollege.uark.edu/test_cses2012/ricepaper.pdf. Acceso 14 septiembre 2014.
- French E. R., Hebert T. T.,** 1980. Métodos de Investigación Fitopatológica. Ed. IICA. San José, Costa Rica. 154-167.
- Livore A., Arguissain G.,** 2004. El quemado del arroz, Control químico y estrategia de mejoramiento genético. Rev. INTA IDIA XXI (6), 195-201 [online] Disponible en la World Wide Web en <http://anterior.inta.gov.ar/ediciones/idia/cereales/arroz03.pdf>. Acceso 14 septiembre 2015.
- Ou S. H.,** 1985. Rice Diseases. Segunda edición. Ed. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Inglaterra. 109-201.
- Pedraza M. V.,** 2012. Reconocimiento de Enfermedades Fúngicas en el cultivo de Arroz. Boletín técnico: Serie Producción Vegetal N° 52, 1-5.
- Pedraza M. V.,** 2013. Alerta en arroz. Cartilla electrónica. Fundación Proarroz, 1-5 [online] Disponible en la World Wide Web en http://www.proarroz.com.ar/down/2013_01_17gacetillaARROZ.doc. Acceso 16 septiembre 2015.