

Caracterización morfológica de seis haplotipos de *Pyricularia grisea* Sacc aislados para mejora genética del arroz en Cuba

Morphological characterization of six *Pyricularia grisea* Sacc haplotypes isolated for rice breeding in Cuba

Noraida de Jesús Pérez León¹, Rodolfo Isidro Castro Mendiña² y Raysa Hernández Valdés³

¹Doctora en Ciencias Agrícolas, investigadora Titular. Unidad Científico Tecnológica de Base Los Palacios, Pinar del Río, Cuba. Correo electrónico: nory@inca.edu.cu

²Doctor en Ciencias Agrícolas, investigador Auxiliar. Unidad Científico Tecnológica de Base Los Palacios, Pinar del Río, Cuba. Correo electrónico: fofi@inca.edu.cu

³Técnico medio en Sanidad Vegetal. Miembro del Buró Agroalimentaria. ANAP, Municipio Los Palacios

RESUMEN

La Piriculariosis es la enfermedad más importante que ataca al cultivo del arroz en Cuba, por tal motivo se desarrollaron investigaciones con el objetivo de obtener, en corto plazo, nuevos cultivares de arroz resistentes y con buen comportamiento agrícola, lo que lleva implícito realizar experiencias también con el patógeno que causa la enfermedad. Para ello, seis haplotipos de *Pyricularia grisea* Sacc, aislados en Cuba, fueron caracterizados por su crecimiento micelial, número y tamaño de los conidios. Los resultados mostraron un comportamiento homogéneo de las características de las colonias que no guarda relación con el agrupamiento de los haplotipos ensayados en dos familias diferentes. En todos los medios, los aislamientos crecieron mostrando formas circulares y bordes regulares, en la mayoría de ellos la textura fue semi-algodonosa, sólo en el medio con Salvado de arroz fue poco algodonosa. Los mayores valores de diámetro de la colonia se obtuvieron en el medio PDA y para los haplotipos del Linaje A. Sólo dos medios lograron esporulación del hongo y el haplotipo A18 fue capaz de esporular en los dos.

Palabras clave: *Oryza sativa*, *Pyricularia grisea* Sacc, medios para esporulación, virulencia.

ABSTRACT

Blast is the most important affecting rice cultivation disease in Cuba, as such research was undertaken in order to obtain, in short term, new resistant and good agricultural performance rice cultivars, which implies perform experiments also with the pathogen that causes the disease. For this, six *Pyricularia grisea* Sacc haplotypes, isolated in Cuba, were characterized by mycelial growth, number and size of conidia. The results showed a homogeneous behavior of colony characteristics unrelated to the grouping of haplotypes tested in two different families. In all media, isolates grew showing circular shapes and regular edges, most of them semi-cottony texture was only in the SA media was slightly cottony. The higher values of colony diameter were obtained in the PDA medium and Lineage haplotypes A. Only two media managed sporulation of the fungus (PDA and SAHA) and haplotype A18 was able to sporulate in both.

Key words: *Oryza sativa*, *Pyricularia grisea* Sacc, sporulation media, virulence.

INTRODUCCIÓN

El hongo *Pyricularia grisea* Sacc provoca pérdidas significativas en el rendimiento de cultivos de importancia económica (Galbieri y Urashima, 2008; Alves y Fernandes 2006). En el arroz ataca las hojas, tallos, nudos de la planta panículas y granos, produciendo una significativa disminución de los rendimientos agrícolas, Castejón-Muñoz *et al.* (2007) y en ocasiones la pérdida completa de la cosecha, todo lo cual lo se presenta como una seria limitación en la producción de este cultivo y es el principal problema fitopatológico en Cuba (Fuentes, 1998). En Cuba fue determinada la diversidad genética del hongo y las características estructurales de las poblaciones (linajes y haplotipos), pero no sus espectros de virulencia, lo cual es importante para establecer un programa de mejoramiento que permita ampliar las bases de resistencia genética. La utilización del concepto de linaje o familias genéticas del hongo reduce la complejidad del manejo del gran número de razas del hongo, permitiendo establecer programas de mejoramiento basados en la teoría de exclusión de linajes (Zambrano *et al.*, 2006).

Por otro lado a pesar de ser un patógeno ampliamente estudiado, presenta serias limitaciones para lograr su crecimiento y esporulación en condiciones controladas y se mencionan como los principales factores que afectan este proceso la composición del medio de cultivo, temperatura, iluminación, entre otras (Dias Neto *et al.*, 2010).

Teniendo en cuenta la problemática planteada fue concebido este trabajo, que tuvo como objetivo la caracterización morfológica de seis haplotipos de *Pyricularia grisea* Sacc identificados en Cuba, así como la selección de medios de cultivo apropiados para su crecimiento y esporulación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 6 haplotipos de *Pyricularia grisea* Sacc que fueron aislados de arroz en diferentes zonas de producción (tabla 1), y conservados en la micoteca del Centro de Aplicaciones Tecnológicas y Desarrollo Nuclear (CEADEN). Pequeñas porciones de papel de filtro (sobre el cual permanecieron almacenados a -4°C , micelios de los haplotipos) fueron sembradas en placas Petri que contenían Agar Agua, (40 g.L^{-1} de agar) después de 72 horas se transfirió una espora a un medio SA, elaborado con 20 g.L^{-1} de salvado de arroz, 5 g.L^{-1} de sacarosa y 20 g.L^{-1} de agar y se incubaron durante 7 días a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ y oscuridad.

Tabla 1. Procedencia de los haplotipos en estudio y composición de los medios empleados.

Linaje	Haplotipo	Cultivar	Localidad
A	18	IR 837	Los Palacios
A	50	Perla de Cuba	Sur del Jíbaro
A	67	IACuba - 23	Sur del Jíbaro
A	69	IACuba - 20	Sur del Jíbaro
A	95	J-104	Los Palacios
B	6	IACuba - 25	Los Palacios

A partir de los cultivos puros de los haplotipos en estudio se tomaron discos de micelio de 5 mm de diámetro y se sembraron separadamente en los medios de cultivo SPHA, SAHA, V8, (propuestos por Fabregat, 1984; Cárdenas y Hernández, 1997) y PDA, con pH de 5,6. Se utilizó un Diseño Completamente Aleatorizado con 5 repeticiones y los aislamientos se incubaron a $28\pm 2^{\circ}\text{C}$ y oscuridad continua durante 9 días.

Posteriormente, fueron descritos por aspectos morfológicos tales como forma y bordes de la colonia, textura y color del micelio y como parte de la caracterización fisiológica, fueron evaluados el crecimiento micelial y el número y tamaño de los conidios.

El diámetro de las colonias se midió con ayuda de una regla graduada en mm, restando los 5 mm del disco sembrado, a los 9 días y los datos se procesaron mediante Análisis de Varianza de Clasificación doble con arreglo factorial (6×4) donde los factores fueron haplotipos y medios

de cultivo y las medias se docimaron según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5% de probabilidad.

El conteo de conidios se realizó a los 12 días del cultivo según la técnica descrita por Martínez *et al.* (1992), para ello se vertieron 5 ml de agua destilada por placa, se raspó la superficie con una espátula y se procedió al conteo del número de conidios presentes en una alícuota de agua destilada y se expresaron los resultados en número de conidios por mililitro. Los datos se transformaron por $\sqrt{x+3/8}$ y se procesaron mediante Análisis de Varianza de Clasificación doble con arreglo factorial (3x2), donde los factores fueron haplotipos y medios de cultivo y las medias se docimaron según Prueba de Rangos Múltiples de Duncan al 5% de probabilidad.

El tamaño de los conidios se evaluó a 50 de ellos por aislamiento, con ayuda del ocular micrométrico instalado en un microscopio Olympus, expresándose los resultados en micrómetros (μm).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Al evaluar las características morfológicas de las colonias, se constató que coincidieron con las referidas en la literatura para este agente patógeno, con un comportamiento homogéneo, que no guarda relación con la diferenciación de los haplotipos ensayados, en dos familias. En todos los medios, los aislamientos correspondientes a los diferentes haplotipos, crecieron mostrando formas circulares y bordes regulares, en la mayoría de ellos la textura fue semi-algodonosa, sólo en el medio con Salvado de arroz (SA) fue poco algodonosa.

Laterell (1975), indicó que las colonias de *Pyricularia grisea* Sacc, podían mostrarse entre algodonosas (no esporulativas) a lisa-aterciopelada (esporulativas), con intermedios en forma de mosaicos (moderadamente esporulativa) y Dias Neto *et al.* (2010), al evaluar diferentes medios de cultivo, observaron un crecimiento micelial variable entre colonias ralas y algodonosas. Estudios realizados en Cuba por Fabregat (1984), mostraron el desarrollo de colonias con textura poco algodonosa, mientras que Cárdenas y Hernández (1997), observaron colonias lisas aterciopeladas cuando emplearon los medios ASHA (seudotallo de plátano y hojas de arroz) y PDA, y colonias semi algodonosas en los restantes medios evaluados.

Al referirse a las características morfológicas del patógeno desarrollado en diferentes medios, Prabhu y Filippi (2006), plantearon que las colonias pueden presentar características distintas, dependiendo del aislamiento y el medio de cultivo utilizado.

En cuanto a la coloración, existieron diferencias entre los medios, en PDA todos los haplotipos mostraron color gris oscuro, en SPHA y en SAHA se apreció coloración entre blanco y gris claro y en el V8, las diferencias se observaron entre haplotipos, dos del linaje A (18 y 95) y el haplotipo 6 del linaje B mostraron color gris oscuro, el A-67 gris claro y A-50 y A-69, blancas, todo ello, sin guardar relación con la clasificación molecular de estos haplotipos en dos familias o linajes.

Al respecto Laterell (1975), informó que las colonias pueden ser oscuras y lo correlacionó con esporulación abundante, o gris clara pobremente esporulante; Fabregat (1984), en estudios de identificación de razas del hongo *Pyricularia grisea* Sacc en Cuba, obtuvo colonias desde blanquecinas a verde oscuro oliváceo y Dias Neto *et al.* (2010), al evaluar diferentes medios de cultivo, obtuvieron resultados similares a este estudio, con colonias que variaron de gris oscuro a blanco.

El análisis factorial realizado a los resultados obtenidos para el crecimiento micelial reveló la existencia de interacción entre los haplotipos y medios evaluados, no obstante, es interesante destacar que, de manera general, independientemente del haplotipo con el que se combinó, los mayores valores de diámetro de la colonia (*tabla 2*), se obtuvieron en el medio de cultivo PDA elaborado con extracto de papa natural.

Tabla 2. Diámetro promedio de las colonias de *Pyricularia grisea* Sacc en diferentes medios de cultivo.

Haplotipos	SPHA	V8	SAHA	PDA	X
A-18	6,88 abc	6,22 def	7,08 ab	7,16 ab	6,83
A-50	6,06 ef	6,30 def	5,94 fg	7,20 a	6,37
A-67	6,48 cde	6,66 bcd	7,12 ab	7,30 a	6,89
A-69	6,00 efg	6,64 bcd	6,24 def	7,36 a	6,56
A-95	6,14 def	6,22 def	7,06 ab	7,02 ab	6,61
B-6	5,54 g	6,00 efg	5,00 h	6,50 cde	5,76
X	6.18	6.34	6.41	7.09	
X general	6,50				
ES x	0,16**				

Este resultado difiere de lo obtenido por Fabregat (1984), quien recomendó el medio SPHA para trabajos *in vitro* con este patógeno, pero coincide con lo obtenido por Cárdenas y Hernández, (1997) y otros autores en trabajos realizados con otros sistemas patógeno-cultivo (Hernández, 1987; Bernal, 2009).

Por otro lado, se apreció que también el medio con salvado y hojas de arroz (SAHA) fue adecuado para el crecimiento micelial de los haplotipos A-18, A-67 y A-95, sin diferencias significativas con el medio PDA, así como el medio SPHA, que conteníaseudotallo de plátano y hojas de arroz para el haplotipo A-18 y resaltó el hecho de que el haplotipo 18 del linaje A, creció de manera similar independientemente del medio empleado, a excepción del V8, donde obtuvo los valores más bajos con diferencias significativas con los 3 medios restantes. Los haplotipos agrupados en el Linaje A, en su interacción con los medios evaluados, de manera general, lograron valores más altos que el haplotipo 6 perteneciente al Linaje B, lo que constituye hasta el momento, en este

ensayo, la primera característica de similitud entre haplotipos pertenecientes a la misma familia y distintiva entre las dos familias evaluadas.

En la *tabla 3* se aprecia que sólo tres haplotipos en dos medios de cultivo lograron esporulación, para el resto de los ensayos no se observaron conidios. El valor máximo lo logró el haplotipo 18 del linaje A en el medio PDA, seguido del haplotipo 6 del linaje B, en el medio con salvado y hojas de arroz (SAHA), con diferencias estadísticas significativas entre ellos y con el resto de los tratamientos.

Tabla 3. Número de conidios promedio, rango de variación y valor medio del largo y ancho de los conidios (μm) presentes en las colonias de *Pyricularia grisea* Sacc crecidas en diferentes medios de cultivo.

Haplotipos	Número de conidios promedio				Largo		Ancho	
	Datos originales		Datos transformados		Rango	X	Rango	X
	SAHA	PDA	SAHA	PDA				
A-18	1.0×10^2	1.74×10^7	9,6 c	4157,8.a	26,29 - 33,8	30,42	10,16 - 13,54	12,19
A-69	0	1.0×10^3	0,6 c	31,3 c				
B-6	1.6×10^5	0	1260,24 b	0,61 c	22,53 - 30,04	28,17	9,0 - 13,1	11,76
X				910,01				
ESx				48,02**				

Resultados diferentes a los encontrados en este trabajo fueron obtenidos por Prabhu y Filippi (2006), quienes describieron los medios a base de avena y V8 como los más apropiados para la producción de esporas de *Pyricularia grisea* Sacc, Cruz y Prestes (2014) y Dias Neto *et al.* (2010) coincidieron con la propuesta del medio de cultivo a base de avena para obtener mayor esporulación.

No obstante, es interesante destacar que el número de conidios obtenidos en el presente trabajo fue también superior a lo que informan estos autores, por ejemplo Dias Neto *et al.* (2010), obtuvieron sólo $202,5 \times 10^3$ conidios.mL⁻¹, con el medio a base de avena, con un comportamiento significativamente superior al V8, salvado de arroz y PDA no comercial, en ese orden. Según estos autores, aunque el PDA no comercial no fue el más productivo, su uso se justifica por la facilidad de su preparación y la obtención de un número razonable de conidios.

Otros autores han empleado la mitad de V8, con excelentes resultados para la esporulación de *Cercospora* en maíz y plantean además que los medios PDA y avena estimularon la formación de conidióforos, pero en cantidad muy inferior a la mitad de V8 (Brunelli *et al.*, 2006).

Al evaluar el largo y ancho de los conidios se aprecian variaciones que coinciden con lo encontrado en la literatura. Al respecto Malaguti *et al.* (1972), encontraron conidios que median entre 18

- 25,5 micras de largo y 7,2 -10,6 de ancho, mientras que para otros autores el rango aproximado del largo estuvo entre 22 - 24 y 10 - 12 de ancho (CIAT, 2014).

En Cuba, Cárdenas y Hernández (1997), en trabajos realizados con un aislamiento monospórico del hongo, proveniente de una mancha típica de la enfermedad en hoja de la variedad de arroz resistente IR 75454-2-2-2, sembrada en canteros de infección de la Estación Experimental del Arroz "Los Palacios", observaron que los conidios midieron con mayor frecuencia entre 25 - 28 micras de largo, por 13 - 15 micras de ancho. Resultados similares obtuvieron Cárdenas *et al.* (2003), cuando evaluaron en este caso aislamientos procedentes de 4 localidades de la provincia de Pinar del Río (Sierra Maestra, Cubanacán, Montoto y Caribe), donde se encuentran ubicadas Unidades Básicas Económicas del Complejo Agroindustrial Arroceros Los Palacios.

Sin diferencias entre haplotipos y medios empleados, la coloración de los conidios fue hialina a gris, piriformes, tabicados, con tres células y apéndice basal visible y se observaron conidióforos simples, solitarios, tabicados y pardos.

En Cuba, Fabregat (1984), informó que los conidios presentaron coloración verde olivo claro, mientras que Mayea y Padrón (1983), observaron coloración hialina a pardo oliváceo y Cárdenas y Hernández (1997), coloración hialina, piriformes y apéndice basal visible.

Algunos autores en el mundo informan la presencia de conidios piriformes, hialinos u olivopálidos, que nacen en el ápice de conidióforos generalmente simples, no ramificados (Malaguti *et al.* (1972), mientras que para otros autores el hongo *Pyricularia grisea* Sacc posee conidióforos simples, tabicados y de color parduzco, que nacen solitarios o en grupos de tres, y en sus extremos llevan las conidias, las que son hialinas, fusiformes y están divididas en forma equidistante por dos septos. El micelio es tabicado y esponjoso (CIAT, 2014)

Con los haplotipos que fueron capaces de esporular Pérez *et al.* (2015) realizaron estudios de patogenicidad que presentaron al A18 como el más agresivo, pues ocasionó mayor porcentaje de área foliar afectada, manchas en forma de huso o diamante y de mayor tamaño. Estos autores seleccionaron el haplotipo A18 para la evaluación de cultivares en condiciones semicontroladas con inoculación artificial, y tomaron en cuenta de todas formas al haplotipo B 6 por pertenecer a otro linaje del patógeno.

CONCLUSIONES

Se logró la caracterización morfológica de los haplotipos estudiados presentándose el A18 como el más agresivo.

La utilización de los haplotipos A18 para la evaluación de cultivares de arroz, permite la selección de genes de resistencia para las poblaciones patogénicas de *P. grisea* presentes en

Cuba, así como piramidar genes que confieran resistencia a diferentes linajes y, de esta forma, lograr mayor durabilidad de la misma frente a ataques del mencionado patógeno.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, K.J. y Fernandes, J.M. (2006). *Influência da temperatura e da umidade relativa do ar na esporulação de Magnaporthe grisea em Trigo*. Fitopatologia Brasileira, 31, 579-584.
- Bernal, A. (2009). *Caracterización de aislados de Passalora fulva Braun & Crouds (Cooke) provenientes de tomate en condiciones de cultivo protegido*. Protección Vegetal. 24(1), 67-71.
- Brunelli, K.R., Fazza, A.C., Athayde-Sobrinho, C., Camargo, L.E. (2006). Efeito do meio de cultura e do regime de luz na esporulação de Cercospora zeaemaydis. Summa Phytopatologica. Botucatu, 32(1), 92-94.
- Cárdenas, R.M. y Hernández M.M. (1997). Caracterización morfológica de un aislamiento monospórico de Pyricularia grisea en diferentes medios de cultivo. *Cultivos Tropicales*, 18(2), 40-43.
- Cárdenas R.M., Hernández, M.M. y Morejón, R. (2003). Estudio de aislamientos de Pyricularia grisea Sacc., toxicogenicidad de sus metabolitos y su utilización en la diferenciación de genotipos de arroz (Oryza sativa L.). *Fitosanidad* 7(3), 67.
- Castejón-Muñoz, M., Lara-Álvarez, I. and Aguilar, M. (2007). Resistance of rice cultivars to Pyricularia oryzae in Southern Spain. (Spanish) *Journal of Agricultural Research*, 5(1), 59-66.
- CIAT. (2014). *Arroz mejorado*. [en línea]. Cali: CIAT. Recuperado de: http://webapp.ciat.cgiar.org/improved_germplasm/germoplasma/arroz.htm
- Cruz, M.F. y Prestes, A.M. (2014). *Esporulação de Pyricularia grisea em diferentes meios de cultura*. [en línea]. In: Reunião da Comissão Brasileira de Pesquisa de Trigo e Triticale, Seminário Técnico de Trigo. Instituto Agronômico do Paraná. [Consultado: 20 Junio 2014]. Recuperado de: www.abrasem.com.br/8a-reuniao-da-comissao-brasileira-de-pesquisa-de-trigo-e-triticale-8a-rcbptt-e-o-9-seminario-tecnico-de-trigo/
- Dias Neto, J.J., dos Santos, G.R., de Castro, M.D., dos Anjos, L.M., Correa A. y Ignácio M. (2010). Influência do meio de cultura na esporulação de Magnaporthe grisea e da concentração de conídios na severidade da brusone do arroz. *Biosci. J. Uberlândia*, 26(2), 173-179.
- Fabregat, M. (1984). *Aspectos bioecológicos y control de Pyricularia oryzae Cav. en el arroz* [Tesis de Doctorado]. Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias de la Habana, Facultad de Agronomía. 105 p.

- Fuentes, J.L. (1998). *Estructura y diversidad genética de poblaciones cubanas del hongo Pyricularia grísea* [Tesis de Maestría]. Centro de Aplicación Tecnológica y Desarrollo Nuclear (CEADEN). 64 p.
- Galbieri, R. y Urashima, A.S. (2008). Caracterização, compatibilidade e ocorrência de reprodução sexual entre isolados de Pyricularia grisea de diferentes hospedeiros. *Summa Phytopathologica. Botucatu*, 34(1), 22-28.
- Hernández, M.M. (1987). *Estudio de la resistencia genética a Stemphylium solana Weber en variedades de tomate Lycopersicum esculentum Mill.* [Tesis de Doctorado]. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas. 100 p.
- Latterell, F. (1975). *Phenotypic stability of pathogenic races of Pyricularia oryzae and its implications for breeding of blast resistance rice varieties*. En: Proceedings, Seminar on Horizontal Resistance to the Blast Disease of Rice. Colombia. Series CE-9. Centro Internacional de Agricultura Tropical (eds.); Cali. Colombia. pp. 199-234.
- Malaguti, G., Rodríguez, S. y Gallardo, A. (1972). Piricularia grísea en pasto elefante y otras gramíneas. *Agronomía Tropical*, 22(3), 323- 329.
- Martínez, B., Fornet, E. y Bravo, N. (1992). *Técnicas generales de Micología Vegetal*. CENSA. Cuba. pp. 4-42.
- Mayea, S. y Padrón, J. (1983). *Bacterias y hongos fitopatógenos*. Editorial Pueblo y Educación. Cuba. pp. 121-144.
- Pérez, Noraida de J., González, María C., Márquez, Ramona, Castro, R.I. y Aguilar, M. (2015). Utilización de haplotipos de Pyricularia grisea Sacc aislados en cuba para la selección de cultivares de arroz resistentes a la piriculariosis. *Cultivos Tropicales*, 36(1), 128-132.
- Prabhu, A.S. y Filippi, M.C. (2006). *Brusone em arroz: Controle genético, progresso e perspectivas*. Santo Antônio de Goiás: EMBRAPA Arroz e Feijão, p.388.
- Zambrano, A., Vegas, A., Cardona, R., Gutiérrez, Z. y Demey, J.R. (2006). Estructura genética y diversidad de linajes de Pyricularia grisea en la zona arroceras venezolana. *Interciencia*, 31(1), 62-66.

Recibido: diciembre 2016

Aprobado: febrero 2017

Dtra. Noraida de Jesús Pérez León: Doctora en Ciencias Agrícolas, investigadora Titular. Unidad Científico Tecnológica de Base Los Palacios, Pinar del Río, Cuba. Correo electrónico: nory@inca.edu.cu