

EFECTO DEL OLEONIM 50 CE SOBRE EL CRECIMIENTO Y DESARROLLO *IN VITRO* DE HONGOS FITOPATÓGENOS DEL ARROZ (*ORYZA SATIVA* LIN.)

Ariel Cruz Triana y Deyanira Rivero González

Estación Experimental de Arroz. Km 1½, Carretera La Francia, Los Palacios, Pinar del Río, Cuba, CP 22 900, actriana@inca.edu.cu

RESUMEN

Las frecuentes aplicaciones de fungicidas químicos establecidas en las estrategias fitosanitarias en el arroz son cada vez más dañinas para el hombre y el medioambiente, y en muchas ocasiones no se logra el control deseado. De acuerdo con esta problemática, en el presente trabajo se evaluó el efecto *in vitro* de OleoNim 50 CE sobre el crecimiento y desarrollo de los hongos fitopatógenos *Pyricularia grisea*, *Rhizoctonia solani*, *Sarocladium oryzae*, *Bipolaris oryzae*, *Fusarium sp.* y *Curvularia lunata*, aislados a partir de granos de arroz manchados. Se comprobó que el OleoNim 50 CE ejerció efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial, la esporulación y la germinación de conidios de los hongos evaluados, lo que brinda nuevas perspectivas para el control de enfermedades fúngicas del arroz.

Palabras claves: *nim*, *Pyricularia grisea*, *Rhizoctonia solani*, *Sarocladium oryzae*, *Bipolaris oryzae*, *Fusarium sp.*, *Curvularia lunata*

INTRODUCCIÓN

Entre los principales factores que influyen en los bajos rendimientos del arroz (*Oryza sativa* L.) se encuentran las afectaciones por numerosos y diferentes enemigos naturales, entre los que se halla un extenso grupo de agentes infecciosos que causan enfermedades, las cuales en determinadas condiciones ambientales constituyen uno de los factores limitantes de mayor importancia en la explotación de este cultivo. La actividad desarrollada por estos entes (hongos, bacterias, virus, etc.) en los órganos de las plantas origina disminuciones en la calidad y en los rendimientos del cultivo [Cordero y Rivero, 2001].

Los productores utilizan numerosos fungicidas sin lograr el control deseado, situación que incrementa los costos de producción, disminuye los rendimientos y por lo tanto reduce los beneficios del productor.

Extractos obtenidos de partes vegetales del árbol nim (*Azadirachta indica* A. Juss), mayormente de los fru-

ABSTRACT

Usual applications of chemical fungicides which are established in plant health strategies on rice become more harmful for men and the environment, besides it does not get the expected control in many instances. Taking this problems into account, in the present work was evaluated the *in vitro* effect of OleoNim 50 CE, on the growth and development of plant pathogen fungi *Pyricularia grisea*, *Rhizoctonia solani*, *Sarocladium oryzae*, *Bipolaris oryzae*, *Fusarium sp.* and *Curvularia lunata*, isolated from rice spotted grains. It was proved that OleoNim 50 CE had an inhibitory effect on the mycelial growth, sporulation and conidial germination of the evaluated fungi, what offers new perspectives for the rice fungal disease control.

Key words: *nim*, *Pyricularia grisea*, *Rhizoctonia solani*, *Sarocladium oryzae*, *Bipolaris oryzae*, *Fusarium sp.*, *Curvularia lunata*

tos, así como productos comerciales elaborados, se han utilizado en forma experimental para el control de diferentes insectos plaga y hongos [Castiglioni *et al.*, 2002; Teresa y Estrada, 2005]; sin embargo, son pocas las evidencias del efecto que pudieran producir sobre hongos fitopatógenos del cultivo del arroz. Sobre la base de estos antecedentes el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto *in vitro* del OleoNim 50 CE sobre el crecimiento y desarrollo de los hongos *Pyricularia grisea*, *Rhizoctonia solani*, *Sarocladium oryzae*, *Bipolaris oryzae*, *Fusarium sp.* y *Curvularia lunata*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el laboratorio de Micología Vegetal del Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria (Censa) en el 2006. Se utilizaron aislamientos de *Pyricularia grisea* Sacc, *Rhizoctonia solani*, *Sarocladium oryzae* Sawada, *Bipolaris oryzae* Breda de Haan,

Fusarium sp. y *Curvularia lunata* Wakker, los cuales fueron obtenidos y conservados en ese laboratorio. Los aislamientos se obtuvieron a partir de granos de arroz manchados de la variedad INCA LP-5. El formulado utilizado es una emulsión del aceite extraído de la semilla de nim (OleoNim 50 CE), el cual se obtuvo en los laboratorios del Instituto Nacional de Investigaciones Fundamentales de la Agricultura Tropical (Inifat).

Para determinar el efecto de diferentes diluciones de OleoNim 50 CE sobre el crecimiento micelial de los principales hongos fitopatógenos del arroz se empleó el método de envenenamiento del medio, para lo cual se prepararon separadamente en enermeyers medio PDA (Biocen) estéril y aceite de nim, el cual se esterilizó previamente por filtración en membranas miliporos (0,45 µm). Las mezclas de aceite de nim y medio PDA se realizaron de manera que se obtuvieron diluciones efectivas del 50, 25, 10 y 5%, y se vertieron en placas Petri.

Se sembraron discos de micelio de 0,5 cm de diámetro de cada aislamiento en el centro de placas con medio envenenado, ajustado a pH 5,2 y a razón de un disco por placa con cuatro repeticiones. Los discos miceliales se obtuvieron de la periferia de las colonias, a partir de cultivos fungosos puros de cinco días de edad, en medio PDA, incubado en oscuridad, a una temperatura de 26 ± 2 °C. Se utilizó como control un tratamiento de medio PDA.

Diariamente se midió el diámetro de las colonias (cm) hasta el séptimo día; entonces se le restó el diámetro del disco sembrado y se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial mediante la fórmula:

$$\% \text{ Inhibición} = 1 - \frac{\text{Diámetro de la colonia tratada}}{\text{Diámetro de la colonia control}} \times 100$$

Se realizó un diseño completamente aleatorizado y se hizo un análisis de varianza simple. Las medias se docimaron mediante la prueba de rangos múltiples de Duncan ($p \leq 0,05$).

El efecto de OleoNim 50 CE sobre la esporulación de los hongos se determinó transcurridos siete días del ensayo de inhibición del crecimiento micelial. En cada uno de los tratamientos se añadieron 10 mL de agua destilada estéril a cada placa de cultivo con cuatro repeticiones por tratamiento, y se removieron con una espátula de vidrio flameada. Posteriormente se determinó la concentración de conidios mediante la cámara Thomas.

Los datos obtenidos se transformaron a través de la expresión $\sqrt{(x + 3/8)}$, se analizaron a través de un Anova simple y se compararon sus medias por la prueba de rangos múltiples de Duncan ($p \leq 0,05$).

El efecto de OleoNim 50 CE en la germinación de conidios se determinó a partir de cultivos de los hongos de *Curvularia lunata*, *Fusarium* sp. y *Sarocladium oryzae*, crecidos sobre medio PDA (control), con los que se prepararon suspensiones de esporas. Para ello se añadieron 10 mL de agua destilada estéril por placa y se agitó con una espátula de Drigalski flameada. La concentración se determinó y se ajustó a 5×10^5 conidios/mL. Posteriormente en cada uno de tres portaobjetos se adicionaron 20 µL de las suspensiones de conidios de cada hongo, y se mezclaron con 20 µL de diferentes soluciones madres de OleoNim 50 CE para obtener concentraciones efectivas del formulado del 50, 25, 10 y 5%, correspondientes a los tratamientos. El control consistió en la mezcla de 20 µL de las suspensiones de conidios con igual volumen de agua destilada estéril. Los portaobjetos se colocaron en condiciones de cámara húmeda, en oscuridad, a 26 ± 1 °C durante 36 h. Se evaluó el número de conidios germinados por campo a las 12, 24 y 36 h. Se utilizaron tres portaobjetos por tratamiento y se observaron cuatro campos por lámina, con al menos 50 conidios en cada campo.

Los datos obtenidos se procesaron por el análisis de varianza de clasificación simple y las medias se docimaron a través de la prueba de rangos múltiples de Duncan ($p \leq 0,05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos mostrados en la *Tabla 1* evidencian el efecto inhibitorio de la emulsión de aceite de nim (OleoNim 50 CE) sobre el crecimiento micelial de los principales hongos fitopatógenos del cultivo del arroz: *Rhizoctonia solani*, *Bipolaris oryzae*, *Curvularia lunata*, *Fusarium* sp., *Pyricularia grisea* y *Sarocladium oryzae*.

En todos los tratamientos con OleoNim 50 CE se observó reducción del crecimiento micelial del patógeno respecto al control. El porcentaje de inhibición se acentuó a medida que se incrementó la concentración del producto; sin embargo, no presentaron diferencias significativas los tratamientos 25 y 50% de OleoNim 50 CE para los patógenos *Rhizoctonia solani*, *Bipolaris oryzae* y *Curvularia lunata* (a los cinco, seis y siete días), y *S. oryzae* (a los seis y siete).

Tabla 1. Efecto de OleoNim 50 CE sobre el crecimiento micelial de los principales hongos fitopatógenos causantes del manchado del grano de arroz

Trats.	Inhibición del crecimiento micelial por día para cada patógeno (%)															
	<i>R. solani</i>				<i>B. oryzae</i>				<i>C. lunata</i>							
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Control	0 d	0 c	0 c	0 d	0 d	0 e	0 e	0 d	0 d	0 c	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
5%	26 c	8 b	16 b	5 c	7 c	4 d	3 d	14 c	12 c	13 b	8 cd	12 c	12 c	8 cd	12 c	13 c
10%	28 c	10 b	19 b	20 b	19 b	18 c	16 c	19 b	17 b	14 b	18 bc	17 b	17 b	18 bc	21 bc	19 dc
25%	58 ab	37 a	40 a	39 a	40 a	46 b	48 b	45 a	49 a	47 a	38 ab	49 a	49 a	38 ab	48 a	43 d
50%	56 b	37 a	38 a	40 a	37 a	53 a	61 a	51 a	50 a	50 a	51 a	50 a	50 a	51 a	42 a	33 bc
ESx	0,080	0,143	0,075	0,050	0,038	0,042	0,063	0,024	0,020	0,024	0,167	0,020	0,020	0,167	0,147	0,185
CV	61,0	64,2	82,2	67,3	58,7	86,2	77,9	63,9	54,7	61,8	67,2	54,7	54,7	67,2	66,8	66,1
Trats.	<i>Fusarium</i> sp.															
	<i>P. grisea</i>															
Control	0 e	0 e	0 f	0 d	0 d	0 d	0 e	0 c	0 d	0 c	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d	0 d
5%	32 d	26 d	27 d	28 c	30 c	6 cd	3 d	11 b	7 bc	9 b	7 c	7 bc	7 c	7 c	7 c	14 c
10%	40 c	33 c	34 c	36 b	38 b	14 b	7 cd	16 b	12 ab	12 ab	8 c	11 bc	8 c	8 c	8 c	12 c
25%	54 ab	57 a	58 a	60 a	63 a	14 b	17 a	14 b	12 ab	12 ab	48 b	8 bc	48 b	46 b	37 b	37 b
50%	51 b	44 b	45 b	44 b	46 b	33 a	40 b	24 a	19 a	19 a	93 a	18 a	93 a	77 a	63 a	63 a
ESx	0,022	0,017	0,019	0,023	0,013	2,161	0,065	0,058	0,078	0,078	0,049	0,033	0,049	0,088	0,108	0,108
CV	53,6	53,5	53,5	53,4	53,3	63,4	76,9	55,7	55,0	55,0	67,4	57,4	67,4	62,3	61,7	61,7

El hongo fitopatógeno *Pyricularia grisea* fue el que menos se afectó. La mayor inhibición se obtuvo con las diluciones al 50 y 25%. Independientemente de las dosis, en todos los tratamientos hubo una reducción del porcentaje de inhibición final; pero generalmente siguieron la misma tendencia de incremento respecto a la concentración, y mostraron la potencialidad del compuesto de inhibir el crecimiento micelial de los patógenos.

El uso de formulados de nim en el manejo de las enfermedades está altamente reconocido [Ahmed y Grainge, 1986]. El efecto inhibitorio de OleoNim 50 CE sobre el crecimiento micelial de los hongos evaluados fue similar al alcanzado por otros autores al evaluar el efecto de otros formulados de nim (NO 60 EC (A), NO 60 EC (C) y NO + PO 60 EC (C)) al 3% sobre los hongos fitopatógenos, *H. oryzae*, *P. oryzae* [Narasimhan *et al.*, 1998] y *S. oryzae* [Rajappan *et al.*, 2001], aunque hay que señalar que el efecto inhibitorio en el presente trabajo fue inferior. Estos mismos autores demostraron que estos productos no perdieron la actividad biológica después de ser almacenados durante nueve meses, hecho que facilita su uso en el manejo fitosanitario del cultivo.

La inhibición de la pudrición de la vaina por extractos de hojas de nim, de aceite de semillas de nim y torta de

nim, fue informado por Yesuraja *et al.* (1995), lo que conllevó a aumentos en los rendimientos del cultivo.

Govindachari *et al.* (1998) obtuvieron las fracciones de aceite de nim –azadiradione, nimbina, salannina y epoxy-azadiradione– y evaluaron su actividad sobre *Drechslera oryzae*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria tenuis*, y demostraron que por separado no tenían actividad biológica, mientras que se observaba un efecto contrario cuando se mezclaban, lo que indica el posible efecto aditivo y sinérgico de las fracciones.

En la *Tabla 2* se observa el efecto del producto OleoNim 50 CE sobre la esporulación total de los hongos patógenos del grano de arroz *Curvularia lunata*, *Fusarium sp.* y *Sarocladium oryzae*.

Al analizar la esporulación se observó que la mayoría de los tratamientos, excepto el de la menor dilución (5%), diferían significativamente del control. En todos los hongos evaluados se apreció un marcado efecto inhibitorio en la esporulación, al ser tratados con las diluciones de OleoNim 50 CE; sin embargo, la esporulación decreció a medida que disminuyó la dilución del producto. La menor concentración de conidios con respecto al control se observó en el hongo *S. oryzae*.

Tabla 2. Efecto del OleoNim 50 CE sobre la esporulación de los principales hongos fitopatógenos del grano de arroz

Hongos	Tratamientos	Concentración de conidios (x 10 ⁷ conidios/mL)
<i>Curvularia lunata</i>	Control	6,63 a
	5%	6,42 a
	10%	6,08 a
	25%	4,70 ab
	50%	3,10 b
	ESx	0,107
	CV	14,7
<i>Fusarium sp.</i>	Control	7,10 a
	5%	6,70 a
	10%	4,05 b
	25%	1,33 bc
	50%	2,60 c
	ESx	0,138
	CV	27,9
<i>Sarocladium oryzae</i>	Control	2,10 a
	5%	1,05 b
	10%	0,93 b
	25%	0,75 b
	50%	0,65 b
	ESx	0,216
	CV	32,7

Letras desiguales en columnas difieren para $p \leq 0,05$.

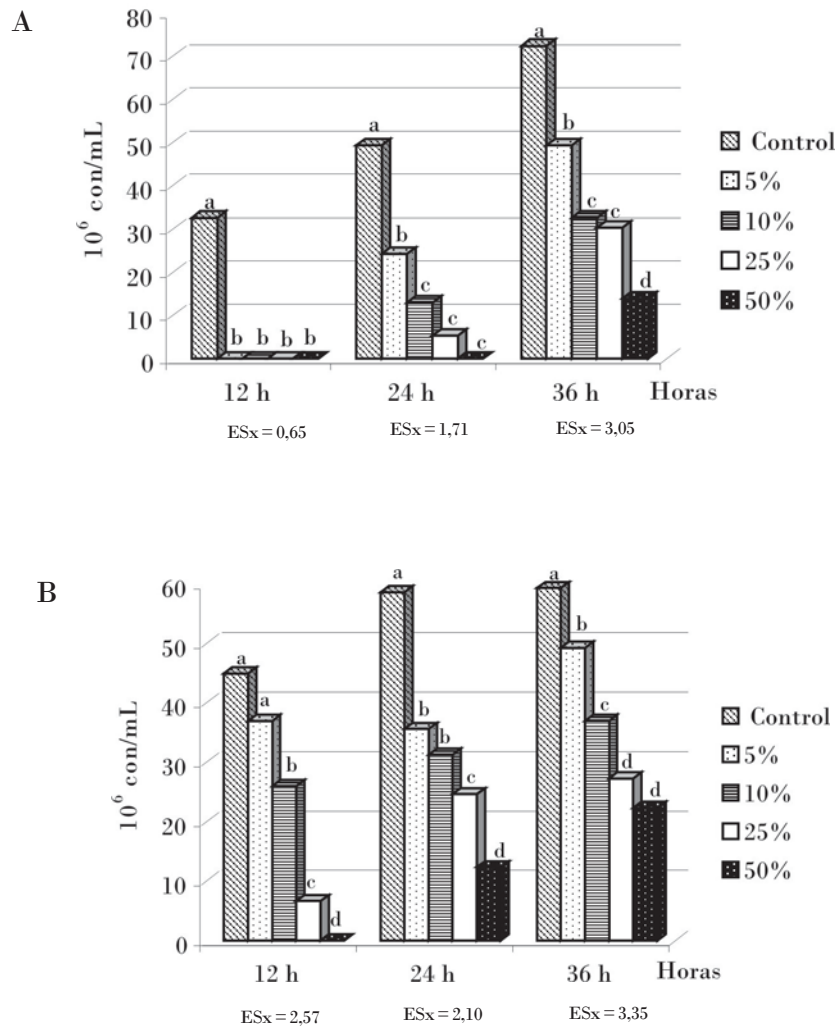
Resultados similares obtuvo Molina (2001), en el que demuestra el efecto inhibitorio sobre la esporulación de *Alternaria* sp., *Phytophthora* sp. y *Botrytis* sp. al ser tratados con un formulado de aceite de nim clarificado, hidrofóbico.

El número de conidios germinados en todos los tratamientos mostró inhibición significativa al compararlos con el tratamiento control, independientemente del hongo y el momento de la evaluación (Fig.). La germinación de conidios fue menor a medida que disminuyó la dilución del producto; sin embargo, en algunas evaluaciones no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos.

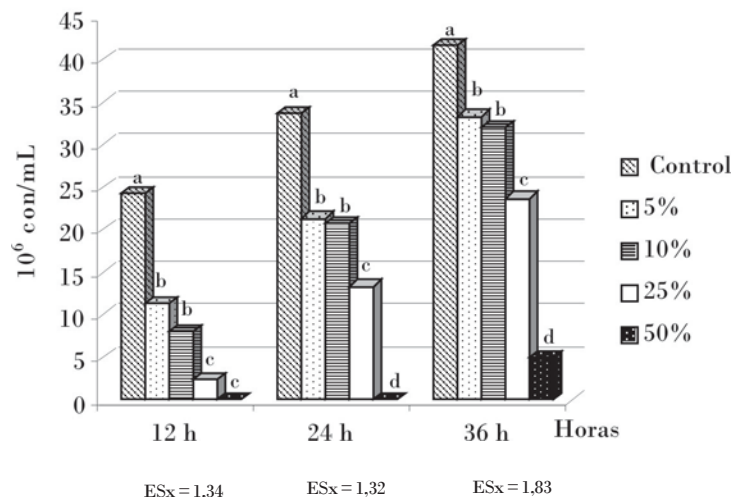
Cuando se evaluó a las 12 h, las mayores afectaciones en la germinación de conidios se observó en las suspensiones de esporas del hongo *C. lunata*; pero a las 36 h las mayores

afectaciones se obtuvieron en el hongo *S. oryzae*, seguido por *C. lunata* y *Fusarium* sp. Hay que destacar que con el tiempo disminuyó el efecto inhibitorio sobre la germinación conidial, criterio que debe tenerse en cuenta para el manejo de estos hongos en condiciones de campo.

Rajappan *et al.* (2001) demostraron la inhibición en la germinación de esporas y crecimiento micelial del hongo *Drechslera oryzae* al ser tratado con extractos de hojas de nim; sin embargo, Paul y Sharma (2002), al tratar el hongo *Drechslera graminea* con extractos de hojas de nim, cosecharon resultados diferentes a los obtenidos en el presente trabajo, lo que pudiera deberse a que los metabolitos secundarios presentes en el aceite de nim (OleoNim 50 CE) ejercen un mayor efecto inhibitorio sobre la germinación de esporas.



C



Efecto del OleoNim 50 CE sobre la germinación de esporas de hongos fitopatógenos del grano de arroz. A) *C. lunata* B) *Fusarium* sp. C) *S. oryzae*.

CONCLUSIONES

- El producto OleoNim 50 CE ejerce efecto inhibitor sobre el crecimiento micelial, la esporulación y germinación de conidios de los hongos fitopatógenos *Curvularia lunata*, *Fusarium* sp. y *Sarocladium oryzae*, lo que brinda nuevas alternativas de control para la enfermedad del manchado del grano y la pudrición de la vaina del arroz.

REFERENCIAS

- Ahmed, A.; M. Grainge: «Potential of the Neem Tree (*A. indica*) for Pest Control and Rural Developments», *Econ. Bot.* 40:201, Filipinas, 1986.
- Castiglioni, E.; J. D. Vendramim; M. A. Tamai: «Evaluación del efecto tóxico de extractos acuosos y derivados de Meliáceas sobre *Tetranychus urticae* (Koch) (Acari: Tetranychidae)», *Agrociencia* 6 (2):75-82, Uruguay, 2002.
- Cordero, V.; L. E. Rivero: «Principales enfermedades fungosas que inciden en el cultivo del arroz en Cuba», Instructivo Técnico del Arroz, Instituto de Investigaciones del Arroz, La Habana, 2001, p. 29.
- Govindachari, T. R.; G. Suresh; Geetha Gopalakrishnan; Balaganesan Banumathy; S. Masilamani: «Identification of Antifungal Compounds from the Seed Oil of *Azadirachta indica*», *Phytoparasitica* 26(2):1-8, India, 1998.
- Molina, N.: «Avances en el fomento de productos fitosanitarios no sintéticos», *Manejo Integrado de Plagas* 59:76-77, Costa Rica, 2001.
- Narasimhan, V.; K. Rajappan; C. Ushamalani; A. Abdul: «Efficacy of New EC Formulations of Neem Oil and Pungam Oil for the Management of Sheath Rot Disease of Rice», *Phytoparasitica* 26(4):301-306, India, 1998.
- Paul, P. K.; P. D. Sharma: «*Azadirachta indica* Leaf Extract Induces Resistance in Barley Against Leaf Stripe Disease», *Physiological and Molecular Plant Pathology* 61(1):3-13, India, 2002.
- Rajappan, K.; C. Ushamalani; N. Subramanian; V. Narasimhan; Kareem A. Abdul: «Management of Grain Discoloration of Rice with Solvent-Free EC Formulations of Neem and Pungam Oils», *Phytoparasitica* 29(2):20, India, 2001.
- Teresa, María; J. Estrada: «Los bioinsecticidas de nim en el control de plagas de insectos en cultivos económicos», *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo*, XXXVII(2):41-49, Argentina, 2005.
- Yesuraja, I.; V. Mariappan; K. Sethuraman: «Field Evaluation on Efficacy of Neem Products on Management of Fungal Diseases of Rice», *Neem for the Management of Crop Diseases*, Mariappan, V., Ed. Associated Publishing, India, 1995, pp. 11-17.